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

Efeito da liofilização sobre a estrutura e a atividade enzimática da L-asparaginase de *Escherichia coli*

Regiane da Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Ronaldo N. M. Pitombo

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Silva, Regiane da
S586e Efeito da liofilização sobre a estrutura e a atividade enzimática da L-asparaginase de *Escherichia coli* / Regiane da Silva. -- São Paulo, 2002.
88p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador : Pitombo, Ronaldo Nogueira de Moraes

1. Liofilização : Tecnologia química 2. Enzimologia industrial I. T. II. Pitombo, Ronaldo Nogueira de Moraes, orientador.

660.28426 CDD

Regiane da Silva

Efeito da liofilização sobre a estrutura e a atividade enzimática da L-aspaginase de *Escherichia coli*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo
orientador/presidente

_____
1°. examinador

_____
2°. examinador

São Paulo, junho de 2002.

O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.

Ele me refrigera a alma e ainda que

eu ande pelo vale da sombra da morte,

Não temerei mal algum pois, Ele está comigo

À Deus

Com todo meu amor

Aos meus pais Alcides e Dádiva

E aos meus irmãos Tatiana e Sandro

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ronaldo Nogueira de Moraes Pitombo pela orientação, amizade e incentivo.

À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

Ao Prof. Dr. José Abrahão Neto, pelo apoio e ajuda nos testes e análises de atividade enzimática.

À Faculdade de Saúde Pública, pela utilização do aparelho para os ensaios de ressonância magnética.

À grande amiga Adriana Célia Lucarini, pela inestimável amizade, ajuda e apoio.

Aos meus grandes amigos Chiu Chih Ming, Denise D'agostini e Ana Maria I. B. Ayrosa, pelo carinho e amizade.

Ao técnico Gledson Manso Guimarães, pela colaboração nos trabalhos de liofilização.

Às funcionárias Miriam Lopes e Ivani Aparecida Raphael, pela paciência, amizade e constantes cooperações.

Aos funcionários do bloco 16 pela amizade e convivência agradável.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

Aos meus pais Alcides e Dádiva e aos meus irmãos Tatiana e Sandro por terem acreditado em mim e me incentivado sempre

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS v

LISTA DE TABELAS xiii

NOMENCLATURA xv

RESUMO xvi

ABSTRACT xviii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1. Liofilização 3
2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 7
2.3. Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) 10

3. OBJETIVOS 12

3.1. Objetivos gerais 12
3.2. Objetivos específicos 12

4. MATERIAL E MÉTODOS 13

4.1. MATERIAL 13
4.1.1. Aparelhos 13
4.1.2. Reagentes 14
4.2. MÉTODOS 14
4.2.1. Preparo das amostras 14
4.2.2. Congelamento 15

4.2.3. Liofilização 15
4.2.4. Curvas de congelamento 15
4.2.5. Determinação da atividade enzimática 16
4.2.6. Inóculo e condições de cultivo 16
4.2.7. Preparo das amostras para o microscópio 17
4.2.8. Ensaio por RMN 17
4.2.9. Ensaio por FT-IR 17

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 18

5.1. Retenção de atividade enzimática no congelamento e liofilização 18
5.2. Curvas de congelamento 39
5.3. Análise por RMN 47
5.3.1. Curvas de congelamento por RMN 63
5.4. Análise por FT-IR 65

6. CONCLUSÕES 81

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83

Lista de Figuras **Página**

Figura 01 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* congeladas rapidamente, em que foi utilizada sacarose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. A figura mostra os valores de retenção tanto para as amostras liofilizadas (azul) quanto para as amostras congeladas (vermelho). 22

Figura 02 - Células de *E.coli* coradas com fucsina utilizando sacarose como aditivo na concentração de 150 mM, congeladas rapidamente e observadas ao microscópio. 23

Figura 03 - Células de *E.coli* e sacarose na concentração de 150 mM, congeladas rapidamente e liofilizadas,coradas com fucsina. 24

Figura 04 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* congeladas lentamente, em que foi utilizada sacarose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. A figura mostra os valores de retenção tanto para as amostras liofilizadas (azul) quanto para as amostras congeladas (vermelho). 25

Figura 05 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* (azul) e para as amostras contendo a enzima purificada (vermelho) congeladas rapidamente em que foram utilizados os aditivos sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM 28

Lista de Figuras **Página**

Figura 06 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* (azul) e para as amostras contendo a enzima purificada (vermelho) congeladas na velocidade média em que foram utilizados os aditivos sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. 29

Figura 07 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo a enzima na forma purificada em que foi utilizada maltose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento: rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo) e liofilizadas . 31

Figura 08 - Valores de retenção de atividade (%) para as amostras contendo a enzima na forma purificada em que foi utilizada lactose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento: rápida (azul), intermediária (vermelho) e lenta (amarelo) e liofilizadas em seguida. 32

Figura 09 - Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* em que foi utilizado manitol como aditivo nas concentrações de 30, 90 me 150 mM quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento: rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo) e liofilizadas 34

Lista de Figuras **Página**

Figura 16 - Curvas de resfriamento do inositol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. 43

Figura 17 - Curvas de resfriamento do manitol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. 44

Figura 18 - Curvas de resfriamento da trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. 45

Figura 19 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-maltose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 48

Figura 20 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-lactose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 49

Figura 21 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-inositol congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 50

Lista de Figuras **Página**

Figura 22 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-manitol congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 51

Figura 23 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-trealose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 52

Figura 24 - Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-sacarose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo). 53

Figura 25 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-maltose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30, 90 e 150mM. 55

Figura 26 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-lactose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de lactose 30, 90 e 150mM. 56

Lista de Figuras **Página**

Figura 27 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-inositol congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de inositol 30, 90 e 150mM. 57

Figura 28 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-manitol congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de manitol 30, 90 e 150mM. 58

Figura 29 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-trealose congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de trealose 30, 90 e 150mM. 59

Figura 30 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-sacarose congelados lentamente, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM. 60

Figura 31 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-sacarose congelados na velocidade média, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM. 61

Figura 32 - Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-sacarose congelados rapidamente, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM. 62

Lista de Figuras **Página**

Figura 33 - Curvas de congelamento por RMN dos sistemas água-sacarose (azul), água-manitol (vermelho) e água-trealose (amarelo) na concentração de 30mM. 63

Figura 34 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* da enzima L-asparaginase liofilizada sem aditivo. 67

Figura 35 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* do sistema trealose-enzima na concentração de 150mM congelado lentamente. 68

Figura 36 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* do sistema trealose-enzima na concentração de 150mM congelado rapidamente. 69

Figura 37 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* do sistema inositol-enzima na concentração de 150mM congelado lentamente. 70

Figura 38 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* do sistema inositol-enzima na concentração de 150mM congelado na velocidade média. 71

Figura 39 - Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* do sistema inositol-enzima na concentração de 150mM congelado rapidamente. 72

Lista de Figuras **Página**

Figura 40 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema manitol-enzima na concentração de 150mM congelado na velocidade média. 73

Figura 41 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema manitol-enzima na concentração de 150mM congelado rapidamente. 74

Figura 42 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema maltose-enzima na concentração de 90 mM congelado rapidamente. 75

Figura 43 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema maltose-enzima na concentração de 150mM congelado lentamente. 76

Figura 44 - Espectro de infravermelho na região *fingerprint* do sistema maltose-enzima na concentração de 150mM congelado na velocidade média. 77

Figura 45 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema lactose-enzima na concentração de 150mM congelado lentamente. 78

Figura 46 - Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' do sistema lactose-enzima na concentração de 150mM congelado na velocidade média. 79

Lista de Tabelas **Página**

Tabela 01 - Propriedades físicas e químicas dos aditivos. 18

Tabela 02 - Retenção de atividade nos sistemas célula-sacarose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 20

Tabela 03 - Retenção de atividade nos sistemas célula-sacarose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento. 21

Tabela 04 - Retenção de atividade nos sistemas célula-maltose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 26

Tabela 05 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-maltose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 26

Tabela 06 - Retenção de atividade nos sistemas célula-trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 27

Tabela 07 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 27

Lista de Tabelas **Página**

Tabela 08 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-maltose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 30

Tabela 09 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-lactose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos às três velocidades de congelamento e liofilizados. 30

Tabela 10 - Retenção de atividade nos sistemas célula-manitol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 33

Tabela 11 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-manitol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 33

Tabela 12 - Retenção de atividade nos sistemas célula-inositol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e liofilizados. 36

Tabela 13 - Retenção de atividade nos sistemas enzima-inositol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos às três velocidades de congelamento e liofilizados. 36

NOMENCLATURA

- **Atcél** Atividade inicial das células de *E.coli*
- **Atenz** Atividade inicial da L-asparaginase
- **Da** Dalton
- **FT-IR** Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
- **ino** Inositol
- **IV** Infravermelho
- **lac** lactose
- **mal** maltose
- **man** manitol
- **min** minuto
- **mL** mililitro
- **mM** milimolar
- **mmoles** milimoles
- **mT** militorr
- **$[NH_3]_F$** Número de mmoles de NH_3 formado
- **RF** Rádio Frequência
- **RMN** Ressonância Magnética Nuclear
- **sac** sacarose
- **T_g** Temperatura de transição vítrea
- **trea** trealose
- **UI** Unidade Internacional
- **U/L** Unidade Internacional de atividade por litro
- **µL** microlitro
- **µmol** micromol
- **µs** microsegundo

RESUMO

As L-asparaginases bacterianas (L-asparaginase amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) são enzimas de alto valor terapêutico devido ao seu uso no tratamento de leucemia linfocítica aguda. A L-asparaginase da *Escherichia coli* por ser uma enzima periplásmica com alta afinidade, é particularmente efetiva em certas terapias de câncer infantil. Muitos agentes terapêuticos recentes são proteínas e peptídeos que surgiram do design molecular de drogas e tecnologia de DNA recombinante. Numerosos estudos têm demonstrado que aditivos preservam a estrutura e a atividade biológica de cada molécula destas proteínas. Entretanto, o mecanismo de proteção, pelo qual estes aditivos funcionam, não tem sido totalmente elucidado. O objetivo do presente trabalho é investigar detalhadamente o efeito da liofilização sobre a estrutura e a atividade enzimática da L-asparaginase, tanto em células íntegras de *Escherichia coli*, como na enzima purificada. Até recentemente a maneira para se avaliar o comportamento de um aditivo e o comportamento da água na estabilização de uma proteína durante a liofilização consistia na medida dos parâmetros de atividade após a reidratação, porém atualmente modernas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixa resolução são utilizadas para se entender o comportamento da água nas interações com proteínas. E a Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier apresenta grande potencial no estudo de estabilização de proteínas durante a liofilização. Utilizou-se o cálculo de porcentagem de retenção de atividade para expressar os valores de atividade enzimática estudados. Estes cálculos foram realizados para os sistemas congelados e para os sistemas congelados e liofilizados. Os sistemas foram tratados em velocidades de congelamento diferentes (20°C/min, 5°C/min e 2°C/min), sendo em seguida liofilizados por 24 horas. São apresentados resultados sobre o efeito das diferentes velocidades de congelamento e o efeito da liofilização nos diferentes sistemas aditivo-enzima e aditivo-célula. Utilizaram-se os aditivos: sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose testados em diferentes concentrações

(30, 90 e 150mM). Para identificar quais as condições e os aditivos que apresentaram uma crioproteção satisfatória. Nos sistemas maltose-enzima e trealose-enzima observou-se um aumento da crioproteção com o aumento da concentração de aditivo. Para os sistemas maltose-enzima, congelados lentamente, os resultados de retenção de atividade foram: 8,67%, 14,02% e 30,80% respectivamente para 30, 90 e 150mM. O sistema enzima-maltose (150mM) congelado rapidamente e liofilizado apresentou a maior retenção de atividade (111,11%) e também o maior valor de T_2 (81μs) nos resultados referentes a RMN. Nos sistemas trealose-enzima nas concentrações de 90 e 150mM apresentaram retenção de atividade 89,93% e 79,74%, respectivamente.

ABSTRACT

Bacterial L-asparaginase (L-asparaginase amidohydrolase, E.C. 3.5.1.1) are enzymes of high therapeutic value due to their use in the treatment of lymphocytic acute leukemia. Escherichia coli L-asparaginase is a periplasmic enzyme of high affinity, particularly effective in some kinds of childhood cancer therapies. Several studies have showed that there are specific stabilizing additives preserve the structure and the biological activity of protein molecules (lyoprotectant). However, the protection mechanism for these excipients has not been totally elucidated yet. The aim of this work was investigate the effect of freeze-drying on the enzymatic activity of L-asparaginase using both the purified enzyme as well as intact cells of Escherichia coli. Until recently the way to evaluate the behavior of an addictive one and the behavior of the water in the stabilization of a protein during the freeze-drying consisted of the measure of the activity parameters after the reidratação, even so now modern techniques of the Nuclear Magnetic Resonance of low resolution have been used to understand the behavior of the water in the interactions with proteins. It is Infrared Spectroscopy for FourierTransformed it presents a great potential in the study of stabilization of proteins during the freeze-drying. The calculation of percentage of activity retention was used to express the studied values of enzymatic activity.These calculations were accomplished for the frozen systems and for the frozen systems and freeze-dryied. The systems were treated in three speeds of different freezing (20°C/min, 5°C/min and 2°C/min), being the freeze-drying for 24 hours. Results are presented on the effect of the freeze-drying in the different systems addictive-enzyme and addictive-cell. The addictive ones were used: sucrose, maltose, lactose, inositol, manitol and trehalose tested in different concentrations (30, 90 and 150mM), to identify which the conditions and the addictive ones that presented a satisfactory cryoprotection.For the systems enzyme-maltose, frozen slowly, the results of activity retention were: 8,67%, 14,02% e 30,80% to 30, 90 e 150mM,respectively .

The system enzyme-maltose (150mM) frozen quickly and freeze-dryied presented the largest activity retention (111,11%) and also the
largest value of T_2 (81μs) in the referring results NMR. The systems enzyme-trealose in the concentrations of 90 and 150mM they presented retention of activity 89,93% and 79,74%, respectively.

1. INTRODUÇÃO

As L-asparaginases bacterianas (L-asparaginase amido hidrolase E.C. 3.5.1.1) são enzimas de alto valor terapêutico, devido ao seu uso no tratamento de leucemia linfocítica aguda. A L-asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da L-asparagina produzindo ácido L-aspártico e amônia. Células leucêmicas estão impossibilitadas de produzir asparagina e são dependentes da asparagina externa ou exógena que circula no sangue. A administração parenteral de Elspar® causa, literalmente, fome nas células leucêmicas (BROOME, 1981; RAVINDRANATH *et al.*, 1992).

Muitas bactérias produzem L-asparaginase, embora nem todas essas espécies de enzimas tenham propriedades anti-tumorais. A variação na atividade anti-tumoral tem sido relacionada à afinidade da enzima pelo substrato e ao tamanho de espécies particulares de enzimas. As enzimas utilizadas comercialmente são obtidas de *Escherichia coli* (MARLBOROUGH *et al.*, 1975). A L-asparaginase de *Escherichia coli* é um tetrâmero de quatro subunidades idênticas com uma massa molecular de 135000 Da. Na estrutura tetramérica a quantidade de água é pequena, então quando ocorre a liofilização, no estado desprotegido, o tetrâmero se dissocia em quatro subunidades idênticas que perdem a atividade e cada monômero possui uma massa molecular de 34000 Da. A dissociação pode ser prevenida incluindo-se elementos protetores (aditivos) na formulação a ser liofilizada. (HELLMAN *et al.*, 1983).

Sendo a liofilização um método de secagem extremamente útil para a conservação de materiais biológicos, tais como as enzimas, o interesse no uso da L-asparaginase liofilizada é muito grande. As enzimas podem sofrer desnaturação durante o processo de liofilização, então aditivos, como açúcares, aminoácidos e surfactantes, podem ser utilizados para prevenir a inativação durante a liofilização. Estes aditivos são chamados de substâncias crioprotetoras.

As L-asparaginases estudadas neste trabalho são utilizadas comercialmente e podem ser obtidas a partir das células de *Escherichia coli* e sob a forma purificada comercial Elspar®.

Para que a enzima mantenha sua atividade biológica, estes aditivos devem conservar sua atividade enzimática e, se possível, amenizar qualquer alteração na sua estrutura. No caso de alguma alteração estrutural, foi possível identificá-la através de técnicas modernas de espectroscopia como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de baixa resolução, e também através da espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Liofilização

A liofilização é um método de secagem que consiste na retirada da água por sublimação, o que ocorre à temperatura e pressão reduzidas. Sua utilização é extremamente útil para a conservação de materiais biológicos como alimentos, microrganismos e medicamentos. Sua aplicação reveste-se de maior importância no caso de materiais em que se pretenda a manutenção de viabilidade ou atividade biológica no estado desidratado. Dentre as aplicações deste método de conservação para propósitos médicos destacam-se a liofilização de soro, tecidos, células vermelhas e órgãos (AKAHANE *et al.*, 1981). Porém, o processo de liofilização pode provocar danos ou alterações sensoriais e nas propriedades funcionais de alimentos, em preparações biológicas como células vermelhas, soro e microrganismos.

Há um interesse crescente na aplicação destas técnicas, especialmente no que se refere aos microrganismos geneticamente modificados. Aplicações à temperatura ambiente incluem proteção de plantas, e outras necessidades da indústria e agricultura. Um grande número de organismos é necessário para cada uso, e a liofilização é um dos métodos usados para produzir uma grande quantidade de produtos concentrados. Entretanto, depois da secagem alguns microrganismos ficam sensíveis à exposição ao ar no estado seco e perdem sua capacidade reprodutiva (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1978).

A liofilização é um processo de não-equilíbrio que, quando bem conduzida, está sob controle cinético e envolve estado vítreo metaestável ao invés de equilíbrio termodinâmico de fases (FRANKS, 1991). A liofilização, um processo freqüentemente considerado suave pelas baixas temperaturas empregadas, é na realidade um processo que pode danificar o produto, no qual as fases individuais, ou seja: pré-congelamento, secagem primária, secagem secundária e armazenamento, deveriam ser considerados como uma série de etapas impostas a uma biomolécula lábil.

A Biotecnologia resultou na produção de várias proteínas para propósitos farmacêuticos. Porém, proteínas são quimicamente e fisicamente instáveis, o que causa problemas durante sua purificação, formulação e armazenamento. A liofilização é freqüentemente utilizada para que formulações de proteína alcancem uma estabilidade desejada a longo prazo (PIKAL, 1990).

No desenvolvimento de uma proteína com efeitos terapêuticos é essencial projetar uma formulação que seja estável durante o transporte e armazenamento a longo prazo. Obviamente, uma formulação aquosa, ou seja, na forma farmacêutica de solução é mais fácil e econômica de ser produzida, e é uma das mais convenientes para o usuário final. Porém, muitas proteínas são suscetíveis a substâncias químicas (por exemplo, oxidação) e/ou degradação física (por exemplo, precipitação) e em formulações líquidas (MANNING *et al.*, 1989). Pode ser possível projetar uma formulação aquosa de forma a reduzir a velocidade de degradação de proteínas. Porém, durante o transporte, quando um controle preciso de condições não é possível, o produto pode ser submetido a numerosas tensões passíveis de desnaturar a proteína. Nestas incluem-se: agitação, variações de temperatura e congelamento (ARAKAWA *et al.*, 1993). Além disso, embora uma formulação e sistemas de transporte pudessem ser projetados para evitar os danos destas tensões, ainda assim pode não ser possível inibir suficientemente os danos causados durante armazenamento por longo período. Por exemplo, há casos onde condições que minimizam a degradação química favorecem danos físicos e vice-versa (ARAKAWA *et al.,* 1993). Sendo assim, pode ser que em determinados casos seja impossível encontrar as condições que permitam esta requerida estabilidade em longo prazo.

As enzimas também sofrem com freqüência desnaturação durante o processo de liofilização, como foi mostrado por estudos anteriores realizados neste Departamento; houve perda de atividade durante o congelamento e armazenamento (BREDA *et al.,* 1991 e 1992; PITOMBO *et al.,* 1994). Embora a vida de prateleira possa ser melhorada por liofilização, algumas proteínas são inativadas durante este processo.

Podem ser utilizados aditivos: açúcares, aminoácidos e surfactantes para prevenir a inativação durante a liofilização (ARAKAWA *et al.*, 1991). Açúcares e aminoácidos protegem proteínas em solução contra efeitos termodinâmicos desnaturantes (CARPENTER *et al.*, 1988) e também podem ter um efeito protetor durante o congelamento-descongelamento. Aditivos iônicos, por exemplo, os aminoácidos, protegem as enzimas através da mudança do pH de soluções congeladas. Dentre os muitos elementos aditivos efetivamente usados para a manutenção de atividade biológica, durante o congelamento/descongelamento, as chamadas substâncias criopotetoras podem ser, com muita freqüência, ineficientes na proteção durante a liofilização (PITOMBO *et al.*, 1994).

Aditivos somados a formulações para proteger bio-produtos sensíveis podem cristalizar ou permanecer como um vidro (massa amorfa) quando a solução é pré-congelada. A resposta precisa de um aditivo depende de sua natureza química, concentração inicial, interação com outros solutos e do regime de congelamento adotado. Foi observada a cristalização de alguns elementos aditivos (por exemplo, manitol) e de vários sais (FRANKS, 1989). Sem cristalização, os solutos mantêm o estado amorfo durante a liofilização e possuem atividade protetora, a manutenção de amorfismo foi apontada como uma propriedade essencial para estabilização do produto. Por exemplo, açúcares e ciclodextrinas que permanecem amorfos sob liofilização protegem o hormônio de crescimento humano recombinante (PIKAL *et al.*, 1991). A manutenção do estado amorfo também é importante para estabilizar proteínas durante o armazenamento (PITOMBO *et al.*, 1994).

A instabilidade inerente de muitas proteínas, incluindo as recombinantes necessita de um estudo intensivo na formulação do produto farmacêutico proposto (MANNING *et al.*, 1989; HANSON; ROUAN, 1992). Formulações liofilizadas contendo excipientes como açúcares, polióis e aminoácidos são freqüentemente selecionados em proteínas farmacêuticas (FORD; DAWSON, 1993; ARAKAWA, 1991). Estes excipientes protegem as proteínas contra a inativação durante o congelamento (ARAKAWA, 1991), liofilização (ARAKAWA, 1991; PIKAL, 1990) e armazenamento (FORD; DAWSON, 1993; PIKAL, 1990). Alguns excipientes geralmente cristalizam durante a liofilização, dependendo da sua concentração e do método empregado (GATLIN; DELUKA, 1980; IZUTSU *et al.*, 1993).

Dentre as características desejáveis de um produto farmacêutico liofilizado está um produto cuja formulação use excipientes eticamente aceitáveis para preservar as propriedades biológicas essenciais. O produto resultante deve ser estável, e prontamente solúvel após reconstituição formando uma solução clara e de volume compatível com o uso. A liofilização apresenta uma série de vantagens sobre outros métodos de conservação dentre as quais destacam-se:

- Armazenamento à temperatura ambiente, desde que a embalagem seja adequada.
- Simplificação na distribuição e economia de energia durante a estocagem.
- Economia considerável no transporte.
- Alto índice de retenção da morfologia, cor e aroma.
- Facilidade na reconstituição.

Deve-se procurar obter uma formulação correta do produto liofilizado para diminuir possíveis dificuldades durante o processo. No produto pronto devem ser evitadas reações de degradação ou pelo menos reduzir a velocidade de degradação, para que o produto protéico permaneça estável por meses ou anos em temperatura ambiente (PIKAL, 1990).

2.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

O conceito de que certos núcleos tem um momento magnético ou spin foi postulado pela primeira vez em 1924 por Wolfgang Pauli, mas, somente em 1946 o efeito sobre substâncias mais volumosas foi apresentado através de estudos conduzidos por Felix Bloche da Universidade Stanford (1946) e Edward Purcell da Universidade de Harvard (1946). Eles conduziram um trabalho sobre os fundamentos experimentais da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Qualquer núcleo com um número quântico não nulo, quando colocado num campo magnético, pode absorver e emitir energia através de radiação eletromagnética, a qual pode ser detectada por espectroscopia de RMN (RUAN; CHEN, 1998).

A maioria dos elementos tem pelo menos um isótopo que pode ser detectado por ressonância magnética nuclear. O núcleo ^{1}H, especialmente o próton, é o núcleo mais comumente utilizado em RMN, devido a sua facilidade de observação, ser o mais abundante na natureza além do fato de estar presente na maioria das amostras, especialmente nas biológicas.Um núcleo não nulo tem uma rotação que gera um pequeno campo magnético, chamado de momento magnético.

O experimento de RMN induz a transição entre os níveis de energia da vizinhança por absorção ou emissão de um fóton. Esta energia indispensável é aplicada na forma de um campo magnético rotacional ou pulso de radio freqüência (RF), e causa absorção ressonante ou emissão de energia pelo núcleo. Este efeito ressonante é chamado ressonância magnética nuclear. No tempo que segue a absorção ressonante causada pelo pulso RF, os spins retornam ao seu estado de equilíbrio ou distribûição. A maioria dos spins do nível mais alto de transição, que originalmente, tem o nível mais baixo de energia retorna ao estado de equilíbrio pela perda de energia na forma de uma onda RF através de vários processos de transição de baixa radiação chamados processos de relaxação.

Há dois tipos de processos de relaxação: *relaxação spin-rede* (ou longitudinal) e *relaxação spin-spin* (ou transversal). As constantes de tempo são descritas como exponencial no processo de relaxação e são conhecidas como

tempo de relaxação. O tempo de relaxação spin-rede é designado por T_1 e o tempo de relaxação spin-spin é designado por T_2. O tempo de relaxação é uma função do tipo do spin e dois meios químico e físico em torno dos spins. Em outras palavras, as constantes do tempo de relaxação são uma propriedade fundamental da amostra. Por essa razão, as análises de T_1 e T_2 de uma amostra permitirão o estudo das propriedades físicas e químicas da mesma. Um alto valor de T_1 ou T_2 indica uma baixa relaxação; um baixo valor de T_1 e T_2 indica uma rápida relaxação. As medidas de T_1 e T_2 podem ser efetuadas através de várias seqüências de pulso. Os sinais, normalmente chamados intensidade, são registrados depois que um ou mais pulsos são aplicados aos spins. O tempo de cada etapa durante a seqüência de pulso é da maior importância para que se tenha uma aquisição de dados correta e uma análise de dados significativa (RUAN; CHEN, 1998).

A importância do entendimento das interações da água com proteínas globulares tem sido reconhecida por muitos anos. A água ligada com hidrogênios carregados ou sítios polares em moléculas de proteínas cujas interações com sítios apolares causam mudanças na ligação água-água são referidas como 'ligação hidrofóbica'. A aproximação mais direta para estudar a influência da proteína em água, é para avaliar as mudanças na mobilidade da molécula de água usando medidas de RMN (Ressonância Magnética Nuclear). A teoria de Beoembergen, Pound e Purcell relata diretamente próton ou tempo de relaxação do núcleo do hidrogênio para um tempo de correlação específica, T_C. Deste modo, pela medida do tempo de relaxação tem-se uma determinação direta do tempo ou correlação da molécula de água num dado ambiente.

A RMN de baixa resolução tem se desenvolvido rapidamente nos últimos tempos permitindo à obtenção de um grande número de informações a respeito da composição e mobilidade dos componentes sólidos e líquidos do produto. Através da avaliação da contribuição do relaxamento dos vários componentes do produto, informações das características dinâmicas e estruturais em sistemas complexos como podem ser obtidas de maneira rápida, não invasiva e de forma precisa (BELTON, 1995).

Algumas evidências experimentais indicam que a estrutura da água próxima à interface (superfície) de um sólido é diferente da água disponível. Drost-Hansen (1969) reportou que a água adjacente a uma superfície mostrou mudanças repentinas nas propriedades físicas a temperaturas discretas (15, 30 e 45 °C). Longas pesquisas reconhecem que, a água em alimentos mostra diferentes propriedades tanto na água livre quanto na disponível. Isto tem sido chamado de 'água-ligada', um termo usado indiscriminadamente por alguns cientistas de alimentos (FENNEMA, 1976). Um dos critérios mais comuns da 'água-ligada' é a incongelabilidade. Estudos de RMN têm mostrado que uma certa quantidade de água em alimentos permanece incongelável igualmente em temperaturas muito baixas (LEUNG; STEINBERG, 1979). Outras propriedades da 'água-ligada' incluem baixa pressão de vapor, alta energia de ligação, indisponibilidade com o solvente, mobilidade molecular reduzida e mudanças nas propriedades espectroscópica e dielétrica comparadas a água livre (LABUZA, 1977).

Tentativas para entender a água em sistemas biológicos têm sido extensas. O RMN tem sido um importante instrumento nesta área, porque abastece potencialmente informações estruturais e dinâmicas (KUNTZ; KAUZMAN, 1974; COOKE; KUNTZ, 1974). Determina se as propriedades da água associadas com a superfície da proteína, observadas em cristais de proteína, são únicas para a fase cristal ou são características das interações água-proteína em geral. O aparecimento do sinal dominante da água livre pode ser eliminado pelo congelamento da solução de proteína concentrada e estudado o sinal restante da RMN (KUNTZ *et al.*, 1969).

2.3. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Até recentemente, o único modo para avaliar a capacidade de um elemento aditivo na estabilização de uma proteína durante a liofilização era medir os parâmetros de atividade após a reidratação. Atualmente está claro que a espectroscopia por Transformada de Fourier via Infra-Vermelho tem grande potencial no estudo de estabilização de proteínas durante a liofilização e na prevenção dos fenômenos de agregação induzida, assim como na investigação dos efeitos da secagem sobre a estrutura protéica em células intactas (LESLIE *et al.*, 1995).

Muitos grupos funcionais em moléculas orgânicas mostram vibrações características, que correspondem a faixas de absorção nas regiões definidas do espectro IV. Estas vibrações moleculares estão essencialmente localizadas dentro do grupo funcional e não se estendem para o resto da molécula. Deste modo, cada grupo funcional pode ser identificado por suas faixas de absorção. Este fato aliado a uma simples técnica de medida faz da espectroscopia IV o mais simples, mais rápido e mais confiável método de determinação de substância para uma classe particular de compostos. Geralmente é possível determinar imediatamente se há a presença de um álcool, amina, cetona, composto alifático ou aromático. De uma observação mais detalhada da posição e intensidade das faixas, é possível tirar conclusões mais detalhadas, como por exemplo, o tipo de substituição dos aromáticos, ou a presença de ácido carboxílico, éster ou funções amida. Além disso, hoje existe uma grande coleção de espectros de referência disponível em catálogos ou bases de dados para comparação.

Vibrações e rotações moleculares podem ser excitadas por absorção da radiação na região de infravermelho do espectro eletromagnético. Isto leva a comprimentos de onda maiores do que na região visível. A radiação de infravermelho (IV) está também relacionada ao calor radiante, desde que este seja detectado pela superfície como calor. A posição da faixa de absorção no espectro IV pode ser expressa em unidades de comprimento de onda λ (em μ ou μm) de radiação absorvida.

Dois tipos basicamente diferentes de espectrômetros IV são normalmente usados, o tradicional de barras ou prisma (scanning) tem sido largamente substituído por um mais eficiente, que é a Transformada de Fourier (FT-IR).

Ambos os tipos trabalham sob o mesmo princípio básico. Uma fonte IV emite radiação, que é reduzida em força passando pela amostra. Esta redução de frequência dependente corresponde a vibrações moleculares excitadas. A radiação residual é medida com um detector e eletronicamente convertida dentro do espectro.

A técnica FT é um desenvolvimento da espectroscopia IV usando as possibilidades de uma moderna tecnologia de computador para armazenar e processar uma grande quantidade de dados. Este tem estabelecido um método padrão e substituiu os espectrômetros convencionais fabricados. O prinçipio básico é uma coleção simultânea de dados de todas as frequências do espectro IV, eliminando assim o tempo de scanning requerido através de frequências diferentes. Isto é conseguido usando um interferômetro para converter a intensidade, multifrequência de radiação IV, que é constante com o tempo, dentro do interferograma, que não é uma função da frequência, mas do tempo. Depois esta radiação 'preparada' passa através da amostra no interferograma e é convertido de volta ao espectro por uma operação matemática de transformada de Fourier. Um computador extrai a informação contida na freqüência do interferograma por transformação de Fourier e produz uma faixa de espectro interpretável (HESSE *et.al*,.1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

• Liofilizar sistemas ternários "água-enzima-aditivo" e "água-células-aditivo", em diferentes composições, utilizando os seguintes aditivos: sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose.

• Estudar a mobilidade molecular da água com o uso de técnicas relaxométricas de RMN de baixa resolução.

3.2. Objetivos específicos

• Investigar em detalhes o efeito da liofilização e do congelamento sobre a atividade enzimática da L-asparaginase, purificada e presente em células intactas de *Escherichia coli*.

• Estudar a interação entre os diversos sistemas propostos e também das alterações na estrutura da enzima através de técnicas de RMN.

• Determinar as interações moleculares entre a proteína e os aditivos utilizados para proteção durante a liofilização utilizando Transformada de Fourier por Espectroscopia de Infravermelho (FT-IR).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Aparelhos

As liofilizações foram realizadas em dois liofilizadores: liofilizador SECFROID, modelo Lyolab G e liofilizador EDWARDS, modelo L-4KR. As liofilizações das amostras utilizadas no ensaio de RMN foram realizadas no liofilizador EDWARDS.

As determinações espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro acoplado a um banho circulante termostatizado, com uma variação de temperatura de $\pm$ 0,2°C.

Os perfis de congelamento foram realizadas em liofilizador microprocessado FTS Systems, utilizando software 'Lyphoware for Windows'

Os cultivos de microorganismos foram realizados em incubador rotativo NEW BRUNSWICK, modelo G25KC e em biorreator LH, modelo 502M.

As fotos das células de *Escherichia coli* apresentadas foram feitas no microscópio OLYMPUS, modelo BX 60 com refletor de fluorescência BX – FLA.

As análises de RMN e as curvas de congelamento foram realizadas em aparelho MARAN, Microprocessado, Ressonance Instruments, de 23MHz.

As análises de FT-IR foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da USP, em aparelho BOMEM MB-100 com software compatível.

4.1.2. Reagentes

A L-asparaginase purificada foi obtida na forma de concentrado Elspar® com a enzima liofilizada (Merck, Sharp e Dohme, Pensilvânia, E.U.A.) em frascos de 10 mL com 10000 UI, por Prodome. O aspartato e os criopotetores testados: trealose, sacarose, maltose, lactose, manitol e inositol, grau P.A., foram obtidos da Sigma Chemical Co, St. Louis, E.U.A. Todos os outros reagentes analíticos foram da Merck (Darmstadt, Germany) e da Quimitra do Brasil (RJ, Brasil).

A cepa utilizada de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi obtida junto ao departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo das amostras

As amostras a serem congeladas e liofilizadas foram preparadas em dois lotes, utilizando-se no primeiro células de *Escherichia coli* e no segundo L-asparaginase na forma purificada e liofilizada. Em ambos os casos a enzima/célula foi adicionada em soluções de aditivo. Os aditivos testados foram: sacarose, maltose, lactose, manitol, inositol e trealose, nas concentrações previamente estabelecidas de 30, 90 e 150 mM. Para os ensaios com a enzima purificada foram adicionados para um volume de 1 mL de solução de aditivo um volume de 0,8 µL de solução enzimática, e este volume correspondia a 2 UI de atividade da enzima na amostra a ser liofilizada. Esta solução enzimática foi preparada através da diálise da enzima purificada Elspar® em solução fisiológica. Para os ensaios com a célula foram adicionados para um volume de 1 mL de solução de aditivo um volume de 100 µL de suspensão celular, preparada conforme item 4.2.6 e armazenada em ultrafreezer (-50°C). Tanto para a enzima purificada como para as células os ensaios foram realizados em tripilicata, e em todas as preparações foi determinada a atividade enzimática inicial das amostras, para determinação da retenção de atividade após o tratamento (congelamento ou liofilização).

4.2.2. Congelamento

As amostras foram congeladas em três velocidades de congelamento: rápido, médio e lento. No congelamento rápido, os frascos foram mergulhados em nitrogênio líquido e as amostras congelaram a uma velocidade de 20 °C/min, no congelamento médio as amostras foram mergulhadas em álcool etílico previamente congelado e a velocidade de congelamento foi de 5 °C/min e no congelamento lento, as amostras foram colocadas no ultrafreezer (-50°C) e congelaram a uma velocidade de 2 °C/min.

4.2.3. Liofilização

As amostras preparadas para liofilização, conforme item 4.2.1, foram colocadas dentro de frascos de vidro para liofilização e congelados nas velocidades citadas no item 4.2.2. Depois de congeladas as amostras foram colocadas no liofilizador e liofilizadas sob pressão de 40 mT por 24 horas e a temperatura da placa de –40°C. Os produtos secos foram armazenados a –40 °C. Para o ensaio de atividade da enzima, as amostras secas foram reconstituídas ao volume original com 1 mL de água deionizada.

4.2.4. Curvas de congelamento

As curvas de congelamento foram realizadas para determinação do perfil de congelamento das amostras. A temperatura das placas no liofilizador foi abaixando até –40°C, e a temperatura das amostras foi acompanhada minuto a minuto até que o sistema atingisse uma temperatura constante. No caso das curvas por RMN as amostras dos sistemas estudados foram colocadas no aparelho de ressonância na temperatura de 10°C e foi-se abaixando a temperatura a cada 5°C até –40°C.

4.2.5. Determinação da atividade enzimática

A L-asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise da L-asparagina, produzindo o ácido L-aspártico e amônia. Os ensaios de determinação da atividade

enzimática foram realizados da seguinte forma: em tubo de ensaio adicionava-se 1,7 mL de tampão Tris/HCl 100mM pH 8,6 e 200 μL de solução de L-asparagina 100mM e equilibrando a temperatura a 37°C, em um banho termostatizado. Adiciona-se a seguir 100 μL da amostra contendo a enzima. Após o tempo adequado de incubação (10 minutos a 37°C) da enzima com o substrato, a reação era interrompida adicionando 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M e 6,5 mL de água deionizada. Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 mL de Reagente de Nessler, para a determinação, da concentração de amônia (mmoles/L) produzida, em espectrofotômetro, a 480 nm a partir de uma curva padrão previamente construída com sulfato de amônio. Uma Unidade Internacional (UI) de L-asparaginase equivale à quantidade de enzima capaz de liberar 1μmol de amônia por minuto a 37° C (WRISTON, 1985; WADE; PHILLIPS, 1971).

A atividade enzimática foi medida em três condições: na preparação inicial sem tratamento; nas amostras congeladas, e após a liofilização.

4.2.6. Inóculo e condições de cultivo

As bactérias foram mantidas em: 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1 mL de NaOH 1N e 20g de bacto Agar. O inóculo foi preparado transferindo-se quantitativamente 2,5 mL da suspensão para 80mL do meio BSM (meio sintético basal [ROBINSON ; BERK, 1969]). Um litro deste meio contém 2g de NH_4Cl, 3g de NaCl, 3g de KH_2PO_4. $12H_2O$, 10mg de $MgCl_2$, 30mg de Na_2SO_4. $10H_2O$, 0,5g de Extrato de Levedura, 2,0g de Peptona Bacteriológica e 4 mL de glicerol. Incubou-se sob agitação (incubador rotativo) a 150 rpm à temperatura de 37°C. Após incubação durante a noite, nas condições acima, foi efetuada leitura espectrofotométrica a 540 nm até obter-se 0,4 mg de células/mL de cultura em termos de peso seco (calculados a partir de uma curva padrão de crescimento previamente estabelecida). A suspensão obtida serviu de inóculo para a produção em incubador rotativo e bioreator. Parte das células obtidas foram centrifugadas e submetidas a várias condições de estudo de liofilização.

4.2.7. Preparo das amostras para o microscópio

Para serem levadas ao microscópio as amostras foram previamente preparadas em lâminas específicas. Foi adicionado 100 µL de corante fucsina em 100 µL da amostra a ser analisada, agita-se em agitador de tubos por aproximadamente dois minutos. Em seguida toma-se uma alíquota de 8,6 µL coloca-se sobre a lâmina e sobre a gota uma lamínula para ser observada no microscópio. Se houver necessidade de lavagem deve-se utilizar aproximadamente 1,0 mL de água deionizada. A relação entre corante e solução deve ser 1:1 ou 1: 0,5.

4.2.8. Ensaio por RMN

Para serem analisadas por RMN, as amostras contendo 5 mL de solução aditivo-enzima foram congeladas nas velocidades de congelamento estudadas (rápida, intermediária e lenta)

4.2.9 – Ensaio por FT-IR

Para as análises por IR, depois de congelados e liofilizados,os sistemas contendo 5mL de solução aditivo-enzima e também da enzima pura, foram analisados pelo método KBr por se tratarem de amostras sólidas. As amostras foram escolhidas com base nos resultados obtidos nos ensaios de retenção de atividade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Retenção de atividade enzimática no congelamento e liofilização

Os resultados apresentados neste item representam a média calculada de três repetições de cada ensaio com o respectivo desvio padrão. A metodologia dos ensaios apresentados foi estabelecida após um estudo prévio detalhado das condições favoráveis para os testes estudados.

Nas figuras e tabelas a seguir são apresentados resultados sobre o efeito do congelamento bem como da liofilização sobre a atividade enzimática da L-asparaginase, tanto em células intactas de *Escherichia coli*, bem como na enzima purificada. São apresentados resultados sobre o efeito dos diferentes tipos de congelamento e liofilização dos sistemas aditivo-enzima e célula-aditivo em diferentes concentrações. Foram identificados em quais condições os aditivos apresentaram uma crioproteção satisfatória. A Tabela 01 mostra algumas das propriedades físicas e químicas dos aditivos utilizados.

Tabela 01: Propriedades físicas e químicas dos aditivos.

ADITIVOS	Massa Molar (g/mol)	Composição (%)	Fórmula molecular
Sacarose	342,30	C-42,11; H-6,48; O-51,41	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Maltose	360,32	C-42,11; H-6,48; O-51,41	$C_{12}H_{22}O_{11}.\ H_2O$
Lactose	342,30	C-42,11; H-6,48; O-51,41	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Manitol	182,17	C-39,56; H-7,75; O-52,70	$C_6H_{14}O_6$
Inositol	180,16	C-40,00; H-6,71; O-53,20	$C_6H_{12}O_6$
Trealose	378,33	C-42,11; H-6,48; O-51,41	$C_{12}H_{22}O_{11}.\ 2H_2O$

Muitos dos crioprotetores amplamente utilizados são açúcares, monossacarídeos e dissacarídeos, embora muitos trabalhos acreditam que os dissacarídeos são mais eficientes na proteção de um material biológico.

Dos aditivos aqui estudados, quatro deles são dissacarídeos: *sacarose* (é solúvel em água e álcool, possui um sabor adocicado e é estável ao ar); *lactose* (é obtida cristalizando concentrações de α-lactose abaixo de 93,5°C e é um acúcar redutor); *maltose* (monohidratada, solúvel em água, levemente solúvel em álcool e praticamente insolúvel em outras substâncias, é obtido por degradação enzimática do amido, e também é um açúcar redutor) e a *trealose* (dihidratada, solúvel em água e álcool quente e possui ponto de fusão entre 96,5 – 97,5°C). A trealose foi utilizada para proteger biomembranas e proteínas do congelamento e secagem (CROWE *et al.,* 1987 e 1984). A *Escherichia coli* pode utilizar tanto a trealose como um carbono como fonte de crescimento e sintetizar trealose intracelularmente para proteger-se da alta força osmótica no meio do crescimento (BOOS *et al.*, 1990). A trealose protege severamente as membranas dos danos durante a secagem, porque ela repõe a água que é removida entre os grupos polares dos fosfolipídios (CROWE *et al.,* 1990).

E dois dos aditivos são monossacarídeos: *manitol* (solúvel numa mistura de água quente e álcool, possui sabor adocicado e seu ponto de fusão está entre 166 – 168°C) e *inositol* (levemente solúvel em água, anidro, praticamente insolúvel em outros solventes orgânicos e possui ponto de fusão entre 225 – 227°C).

Foi sugerido que a relativa superioridade da trealose como protetor durante a desidratação está conectada com as características de vitrificação deste açúcar (T_g entre 100 e 107°C) para o açúcar anidro. Maltose e lactose também possuem altas temperaturas de transição vítrea, 92°C e 101°C, respectivamente. No entanto, esses dissacarídeos são açúcares redutores e podem participar de reações com proteínas que podem prejudicar a funcionalidade protéica (AGUILERA *et. al.*, 1997).

Nas Tabelas 02 e 03 são apresentados os resultados de retenção de atividade das amostras congeladas rapidamente contendo os sistemas célula-aditivo liofilizados (Tabela 02) e dos sistemas célula-aditivo não-liofilizados (Tabela 03). Nas Tabelas 04 e 05 são apresentados os resultados de retenção de atividade das amostras congeladas lentamente contendo os sistemas célula-aditivo liofilizados (Tabela 04) e dos sistemas célula-aditivo não-liofilizados (Tabela 05).

Os resultados de retenção de atividade foram obtidos segundo a fórmula:

$$\text{Re}\,tenção\ de\ atividade = \frac{atividade\ \ da\ \ amostra\ \ (At_{am})}{atividade\ \ inicial\ (célula/enzima)\ (At_{in})} \times 100$$

Sendo a atividade inicial da célula 66,38 (U/L) e da enzima 41,50 (U/L).

Tabela 02. Retenção de atividade nos sistemas **célula-sacarose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	8,29	5,12	29,53
90	1,36	4,82	15,82
150	100,93	4,97	14,91

Tabela 03. Retenção de atividade nos sistemas **célula-sacarose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	4,82	9,79	3,46
90	1,66	13,89	6,48
150	3,16	15,82	19,58

Na Tabela 02 pode-se observar um aumento significativo da retenção de atividade para o sistema célula-sacarose liofilizado na concentração de 150 mM, sendo que o mesmo não aconteceu com o sistema congelado (Tabela 03). Na tentativa de explicar o aumento acentuado de retenção da atividade na amostra liofilizada, quando comparada com a que foi apenas congelada (Figura 01), observou-se microscopicamente células de *E.coli*, previamente coradas, congeladas (Figura 02) e liofilizadas (Figura 03).

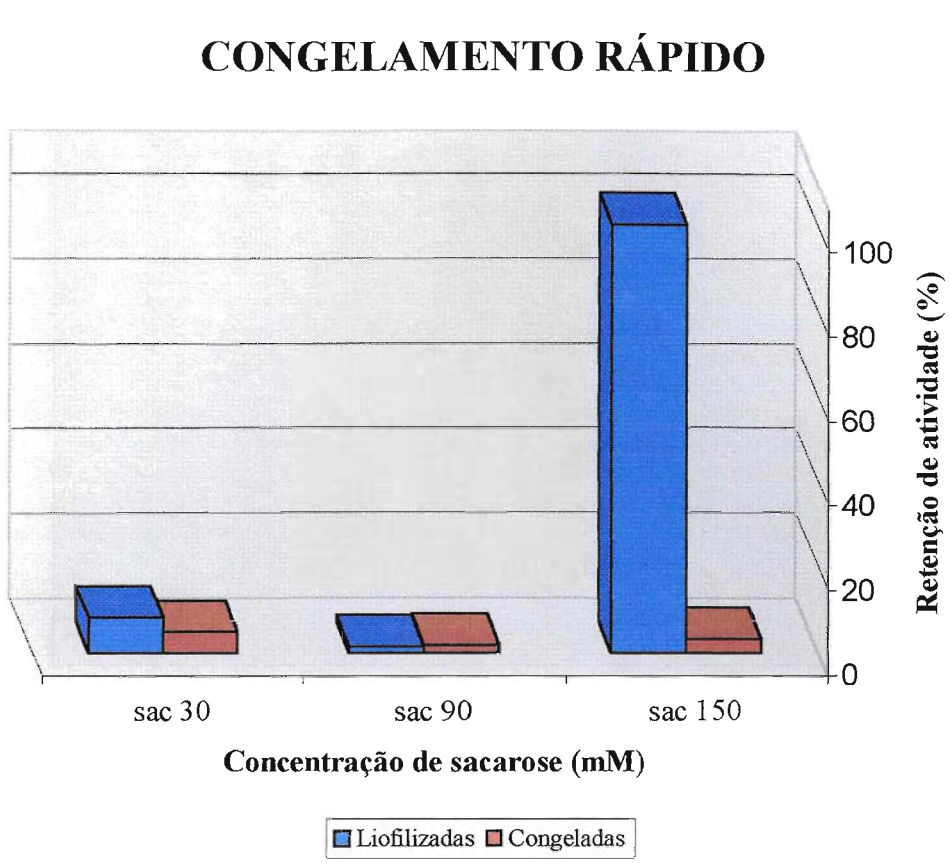

Figura 01. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* congeladas rapidamente, em que foi utilizada sacarose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. A figura mostra os valores de retenção tanto para as amostras liofilizadas (azul) quanto para as amostras congeladas (vermelho).

Pode-se concluir que o aumento na retenção total da atividade da amostra liofilizada deve-se ao fato de ter ocorrido um rompimento da célula durante a liofilização. Esse rompimento pode ter causado as manchas escuras que são observadas nas células liofilizadas (Figura 03). Com o rompimento celular houve uma liberação da enzima, que é intracelular e está situada no espaço periplásmico da célula, acarretando aumento na retenção da atividade.

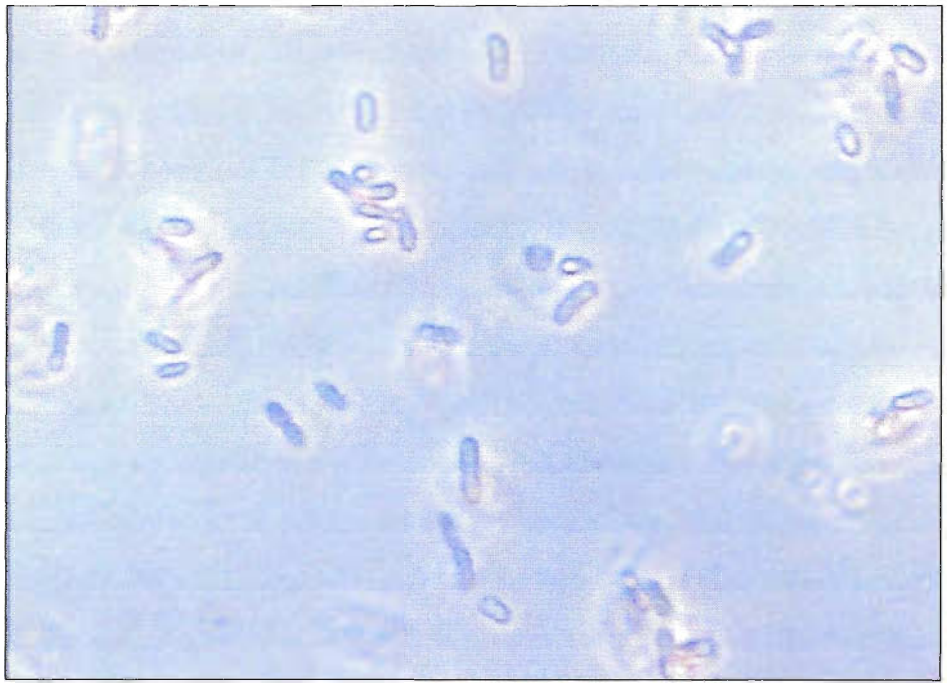

Figura 02. Células de *E.coli* coradas com fucsina utilizando sacarose como aditivo na concentração de 150 mM, congeladas rapidamente e observadas ao microscópio.

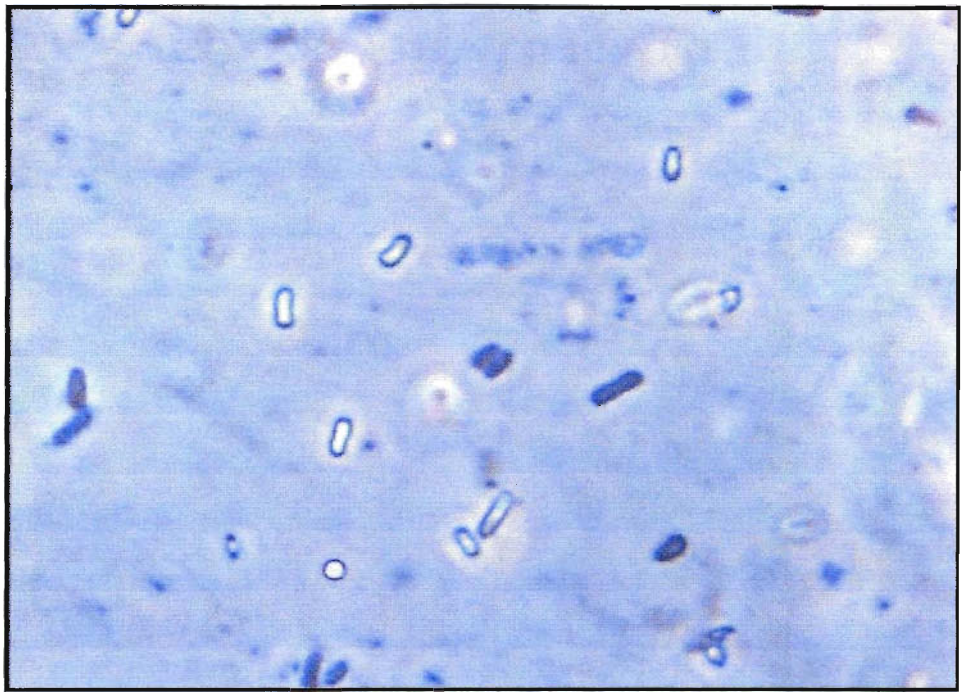

Figura 03. Células de *E.coli* e sacarose na concentração de 150mM, congeladas rapidamente e Liofilizadas, coradas com fucsina.

Considerando as amostras de células contendo sacarose que foram congeladas lentamente, não se observou o mesmo comportamento do congelamento rápido, já que a retenção de atividade decresceu com a concentração nas amostras liofilizadas. Nas amostras apenas congeladas a retenção de atividade sofreu um leve acréscimo com o aumento da concentração de sacarose (Figura 04). Apesar de não ter sido observado ao microscópio, supõe-se que não houve rompimento celular, devido ao congelamento lento.

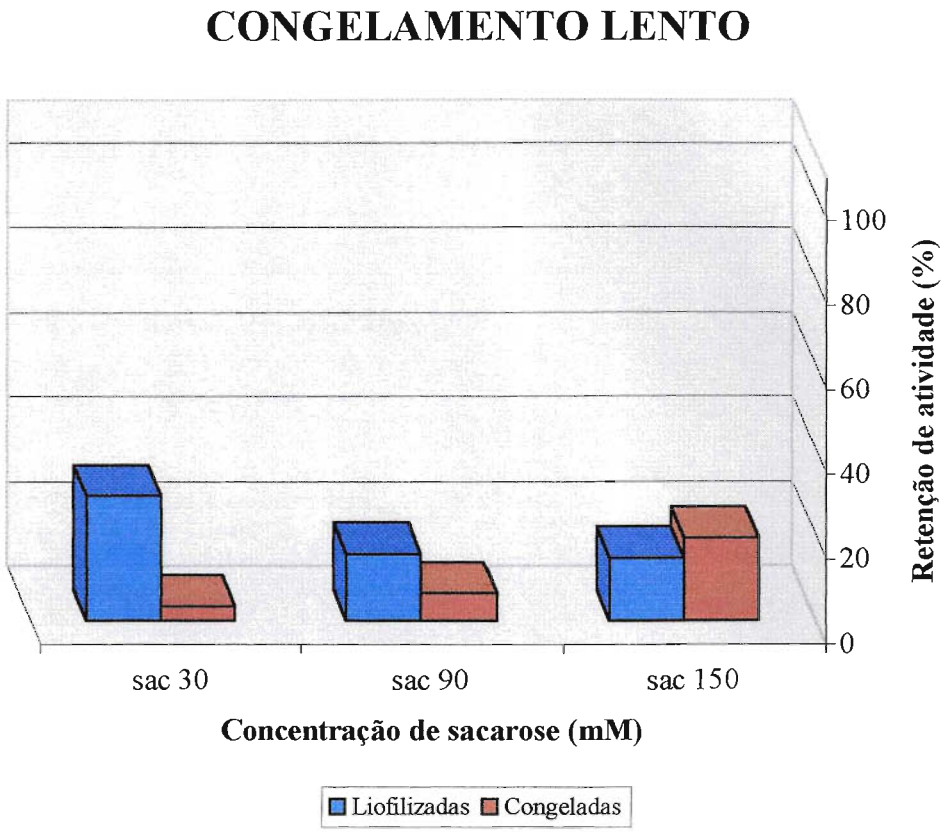

Figura 04. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* congeladas lentamente, em que foi utilizada sacarose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM. A figura mostra os valores de retenção tanto para as amostras liofilizadas (azul) quanto para as amostras congeladas (vermelho).

Nas Tabelas 04 e 05 os valores de retenção de atividade apresentados são referentes aos sistemas célula-maltose e enzima-maltose liofilizados e congelados nas três velocidades e nas tabelas 06 e 07 são para os sistemas célula-trealose e enzima-trealose nas mesmas condições.

Tabela 04. Retenção de atividade nos sistemas **célula-maltose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos às três velocidades de congelamento e **liofilizados.**

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	14,16	1,96	2,11
90	1,21	25,31	36,61
150	27,42	37,36	37,06

Tabela 05. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-maltose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos às três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	16,34	39,54	8,67
90	16,75	36,91	14,02
150	111,11	27,69	30,80

Tabela 06. Retenção de atividade nos sistemas **célula-trealose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	8,74	0,15	6,03
90	9,64	0,15	3,92
150	10,87	0,45	15,22

Tabela 07. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-trealose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados.**

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	2,84	3,61	0,00
90	89,93	14,51	62,31
150	79,74	27,06	21,47

Com o objetivo de se observar o comportamento dos sistemas após a liofilização quando se utiliza congelamento rápido, tanto para as amostras contendo células como para as amostras contendo enzima purificada, foi possível notar que houve uma manutenção da atividade catalítica após a liofilização, quando utilizou-se sacarose, maltose (Tabelas 04 e 05) e trealose (Tabelas 06 e 07), principalmente na concentração de 150mM (Figura 05).

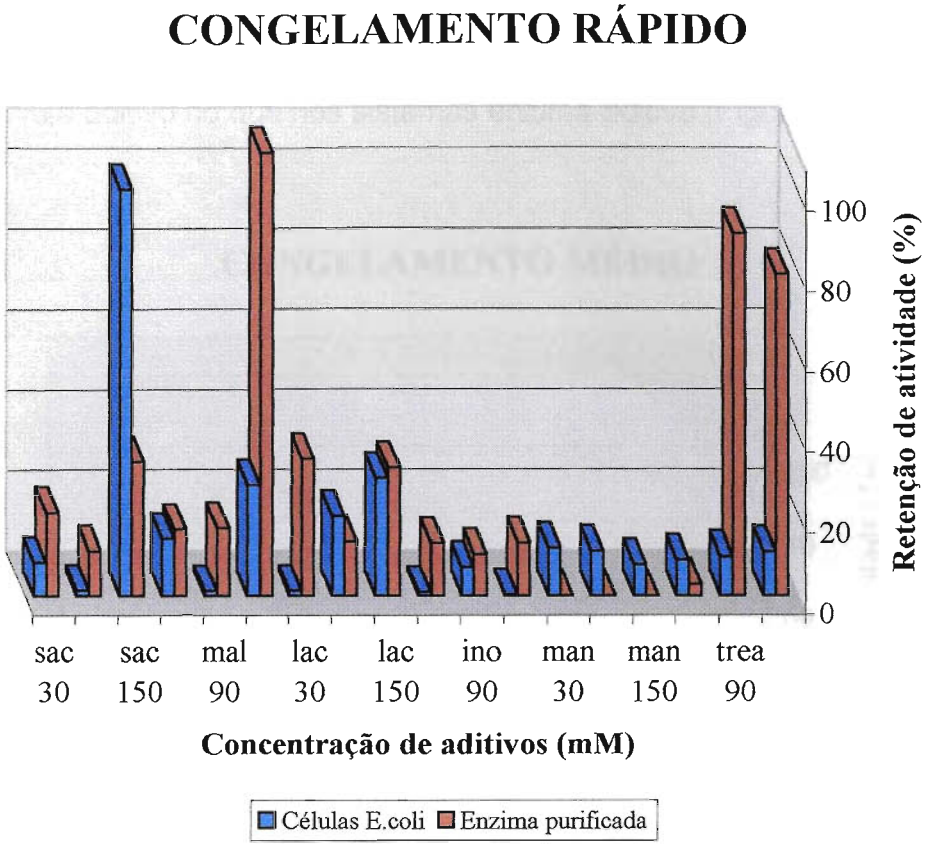

Figura 05. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* (azul) e para as amostras contendo a enzima purificada (vermelho) congeladas rapidamente em que foram utilizados os aditivos sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

A influência da velocidade de congelamento nas amostras liofilizadas foi mais significativa para as amostras contendo enzima do que àquelas contendo células (maltose, trealose e lactose), com exceção da amostra sacarose-célula já discutida anteriormente. Nas amostras contendo a enzima purificada que sofreram congelamento rápido seguido de liofilização observou-se maior retenção de atividade enzimática do que as amostras congeladas na velocidade intermediária. A atividade retida foi diretamente proporcional à concentração do aditivo.

Uma observação interessante foi que no congelamento médio, a velocidade de congelamento aparentemente influenciou a eficiência da liofilização, baseado na diminuição da retenção de atividade, principalmente nos casos em que se utilizou inositol, manitol e trealose, embora este efeito seja mais evidente nos sistemas célula-aditivo do que nos sistemas enzima-aditivo (Figura 06).

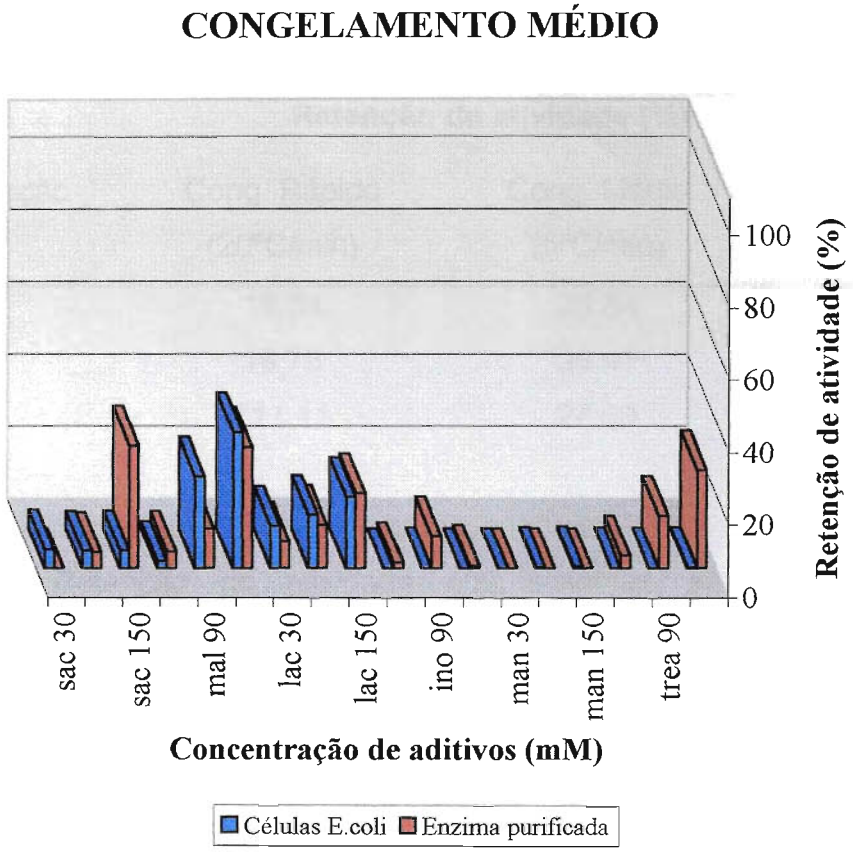

Figura 06. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli* (azul) e para as amostras contendo a enzima purificada (vermelho) congeladas em velocidade média com os aditivos sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

Nas Tabelas 08 e 09 é apresentado um quadro resumo dos resultados de retenção de atividade para os sistemas enzima-maltose e enzima-lactose submetidos às três velocidades de congelamento estudadas, por estes sistemas

apresentarem resultados significativos quanto à crioproteção. Este efeito estabilizante foi observado tanto para o congelamento quanto para a liofilização e pode estar relacionado com o fato de se tratar de dois dissacarídeos (CARPENTER e CROWE, 1989).

Tabela 08. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-maltose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	16,34	39,54	8,67
90	16,75	36,91	14,02
150	111,11	27,69	30,80

Tabela 09. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-lactose** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando foram submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	33,73	7,49	5,08
90	13,30	11,95	8,27
150	31,57	20,70	38,05

Levando-se em conta a concentração do aditivo foi possível observar para o sistema enzima-maltose que o nível de proteção depende da concentração do

aditivo empregado, sendo a condição mais eficiente de crioproteção da enzima quando se utiliza congelamento rápido e concentração de 150 mM de maltose (Figura 07).

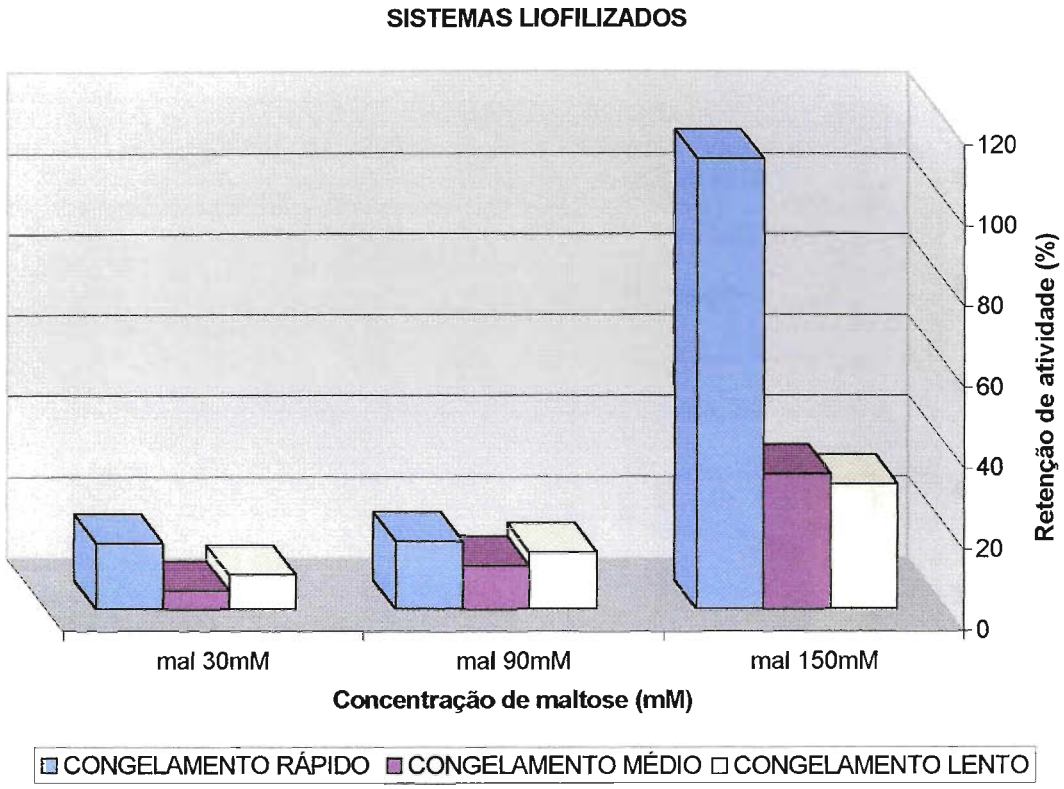

Figura 07. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo a enzima na forma purificada, em que foi utilizada maltose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo) e liofilizadas .

O mesmo comportamento das amostras contendo maltose foi observado para os sistemas contendo a enzima na forma purificada, que utilizaram lactose como aditivo (Figura 08). Estes resultados estão de acordo com o estudo realizado por Ward *et al.* (1999), que demonstrou com a medida da atividade residual desta mesma enzima que, quando são empregados dissacarídeos na liofilização, estes conferem níveis de estabilidade da L-asparaginase liofilizada similares aos obtidos

neste trabalho e que o nível de crioproteção será dependente da concentração dos dissacarídeos.

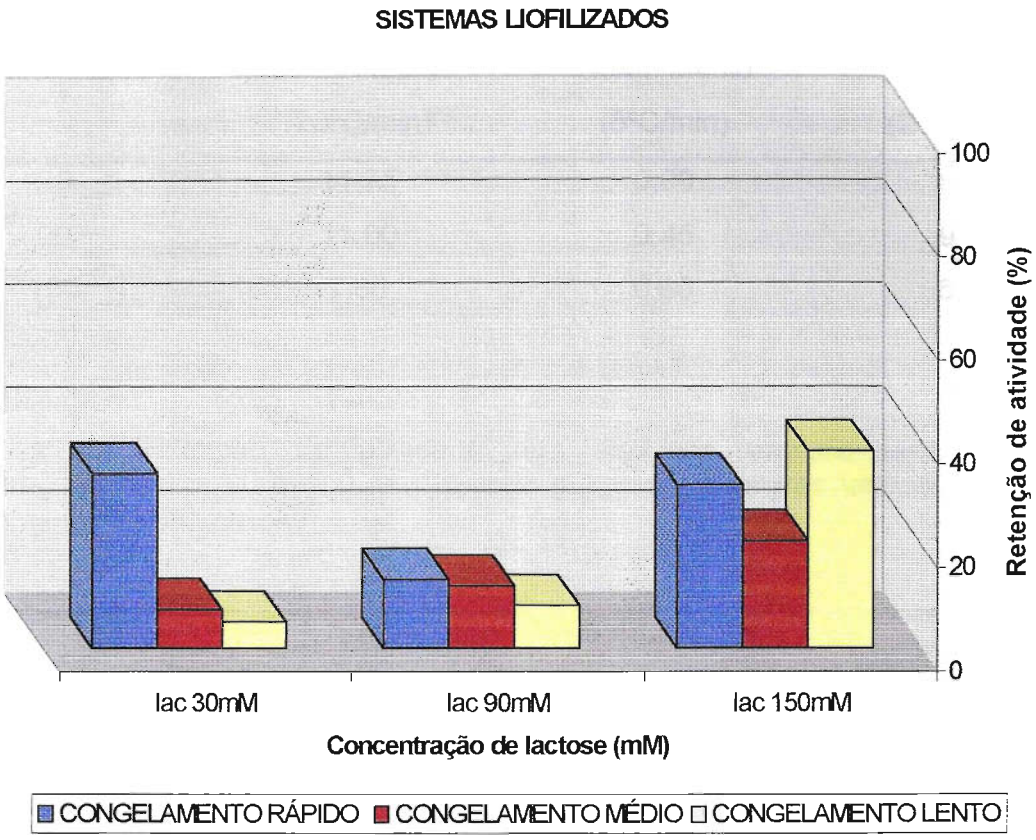

Figura 08. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo na enzima na forma purificada, em que foi utilizada lactose como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo) e liofilizadas.

Nas tabelas a seguir são apresentados os valores de retenção de atividade dos sistemas célula-manitol (Tabela 10) e enzima-manitol (Tabela 11), onde pode-se observar perda de atividade e ineficiência deste sistemas na crioproteção.

Tabela 10. Retenção de atividade nos sistemas **célula-manitol** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados.**

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	11,75	0,00	8,44
90	11,00	0,45	9,64
150	7,68	0,60	5,27

Tabela 11. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-manitol** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados.**

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	0,00	0,00	0,00
90	0,00	0,00	3,71
150	0,00	0,00	11,95

A perda de atividade foi observada quando se utilizaram os sistemas célula-manitol e enzima-manitol, porém nas amostras contendo células (Figura 09), pôde-se observar que a perda de atividade, nas velocidades de congelamento rápido e médio, foi maior para o sistema enzima-manitol (Figura 10). Para o manitol, o efeito positivo de crioproteção foi observado no congelamento lento tanto para o sistema célula-manitol como para o sistema enzima-manitol, sendo

mais eficiente para o último, este comportamento de crioproteção do manitol apenas no congelamento lento também foi observado por Helmann *et al.* (1983).

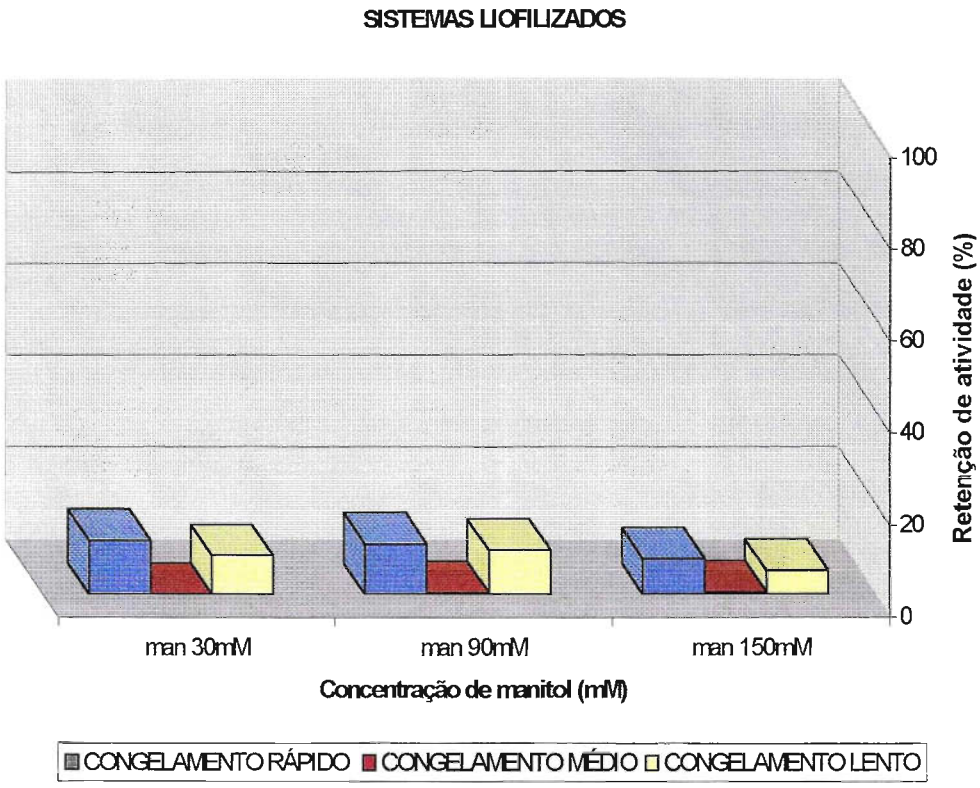

Figura 09. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli*, em que foi utilizado manitol como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), méida (vermelho) e lenta (amarelo), liofilizadas.

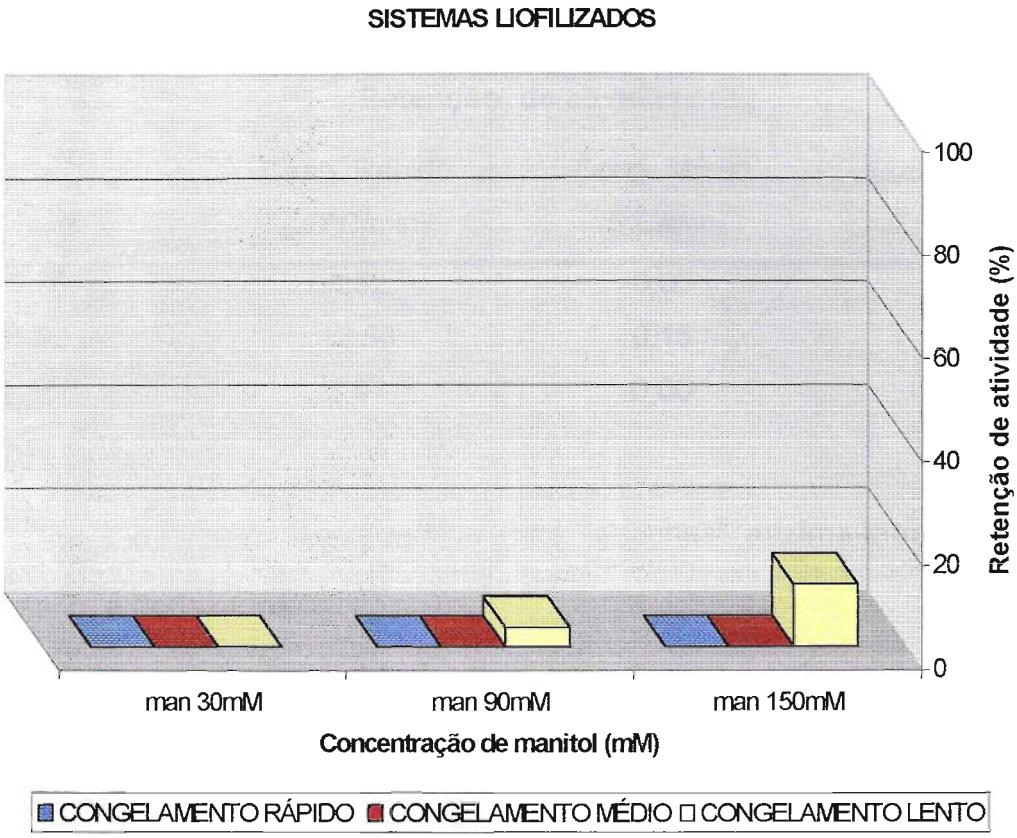

Figura 10. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo a enzima na forma purificada, em que foi utilizado manitol como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo), liofilizadas.

Nas tabelas a seguir são apresentados os valores de retenção de atividade dos sistemas célula-inositol (Tabela 12) e enzima-inositol (Tabela 13), onde também se pode observar perda de atividade e ineficiência destes sistemas na crioproteção, porém com níveis de retenção de atividade superior aos sistemas contendo manitol.

Tabela 12. Retenção de atividade nos sistemas **célula-inositol** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	4,52	0,00	8,44
90	12,56	0,15	9,64
150	3,01	0,00	5,27

Tabela 13. Retenção de atividade nos sistemas **enzima-inositol** nas concentrações de 30, 90 e 150 mM quando submetidos as três velocidades de congelamento e **liofilizados**.

	Retenção de atividade (%)		
Concentração (mM)	Cong. Rápido (20°C/min)	Cong. Médio (5°C/min)	Cong. Lento (2°C/min)
30	6,89	1,57	9,01
90	0,24	8,80	1,40
150	7,16	0,84	12,24

Apesar deste sistema ter apresentado baixa retenção de atividade, ainda assim este sistema pode ser considerado mais eficiente do que os sistemas contendo manitol, já que nos sistemas enzima-inositol foi possível observar uma pequena retenção, sobretudo no congelamento lento (Figura 11) e para os sistemas célula-inositol a única situação de perda total de atividade foi observada no congelamento médio (Figura 12).

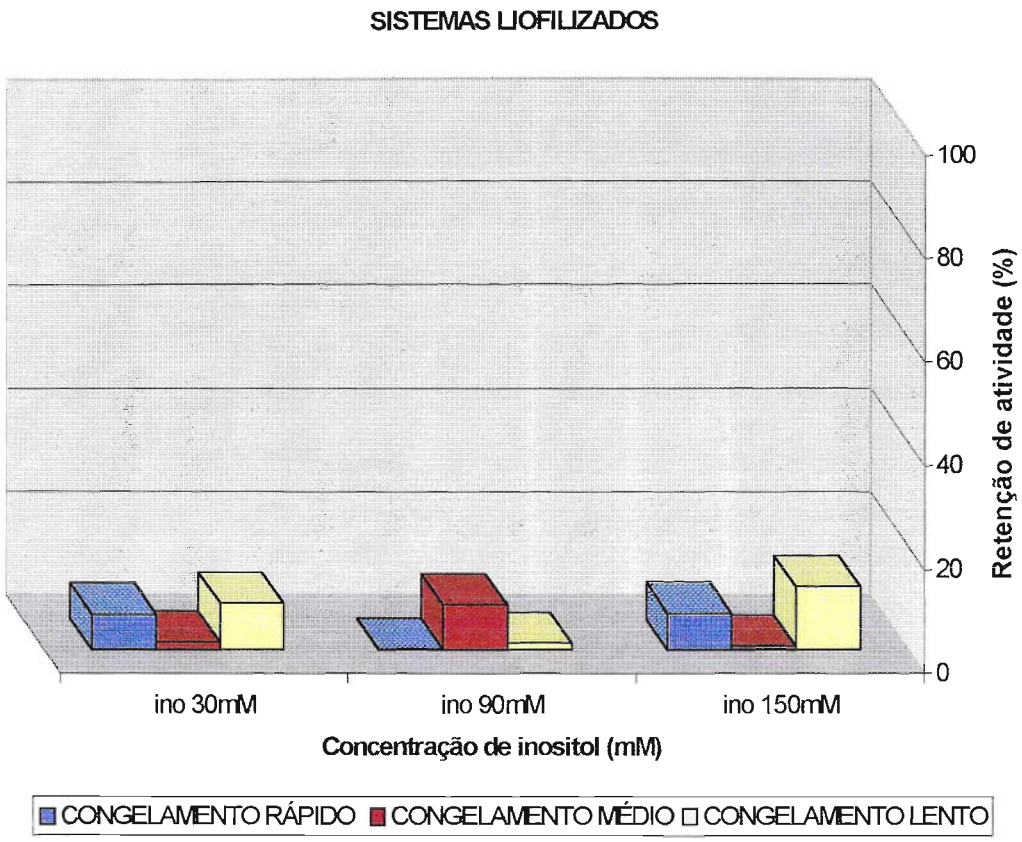

Figura 11. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo a enzima na forma purificada, em que foi utilizado inositol como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo), liofilizadas.

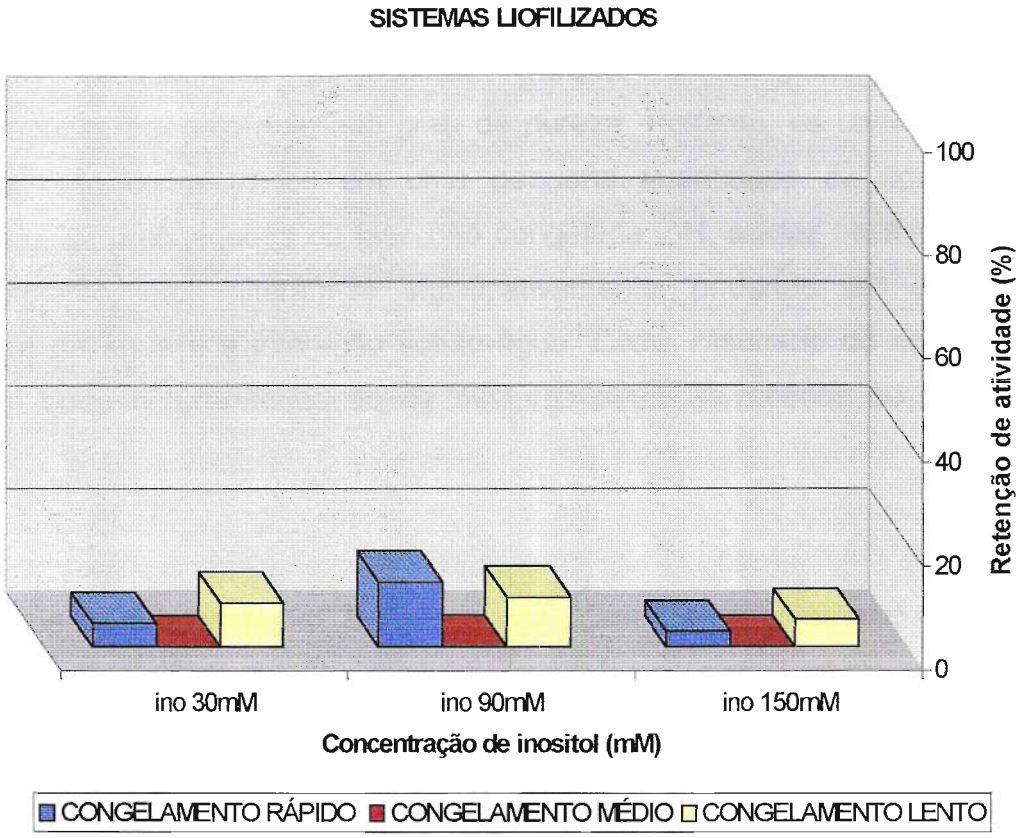

Figura 12. Retenção de atividade (%) para as amostras contendo células de *E.coli*, em que foi utilizado inositol como aditivo nas concentrações de 30, 90 e 150 mM, quando as amostras foram submetidas às velocidades de congelamento rápida (azul), média (vermelho) e lenta (amarelo), liofilizadas.

Em uma análise geral de todos os sistemas enzima-aditivo e célula-aditivo estudados neste trabalho, pode-se concluir que, para os níveis de congelamento e liofilização estudados, os aditivos mais eficientes na crioproteção foram a maltose e a sacarose, empregados na concentração de 150 mM.

5.2. Curvas de congelamento

Sendo o congelamento a fase mais importante, anterior à liofilização propriamente dita, muitos cuidados devem ser tomados durante esta etapa, pois um congelamento mal conduzido pode fazer com que o produto tenha suas principais propriedades danificadas. Durante o congelamento a água transformasse em gelo num alto grau de pureza. Portanto, os constituintes não-aquosos são concentrados em uma pequena quantidade de água e como resultado, as propriedades da fase não congelada (pH, acidez titulável, ponto de congelamento, etc), alteram-se significativamente, podendo ser alteradas: a estrutura da água e a interação soluto-água. Como resultado do congelamento também pode ocorrer formação de misturas eutéticas, sólidos ou precipitados amorfos.

As curvas de congelamento e resfriamento são freqüentemente chamadas de velocidade de congelamento. E como a velocidade de congelamento determina a dimensão do cristal de gelo, as curvas de congelamento auxiliam no conhecimento do ponto eutético, que é muito importante para se ter uma idéia da cristalização do produto estudado e com isso procurando evitar o colapso da estrutura (PITOMBO, 1989).

A seguir, são apresentadas as curvas do perfil de temperatura dos aditivos utilizados neste trabalho.

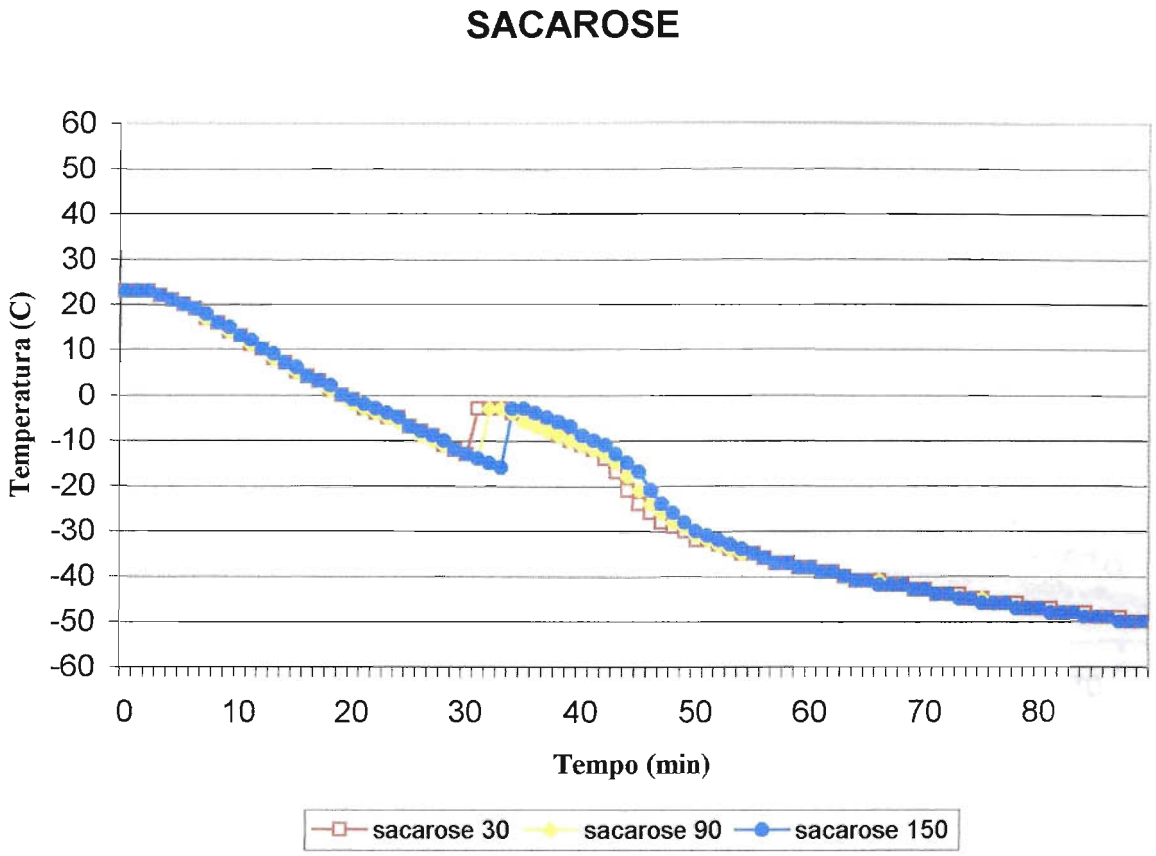

Figura 13. Curvas de resfriamento da sacarose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

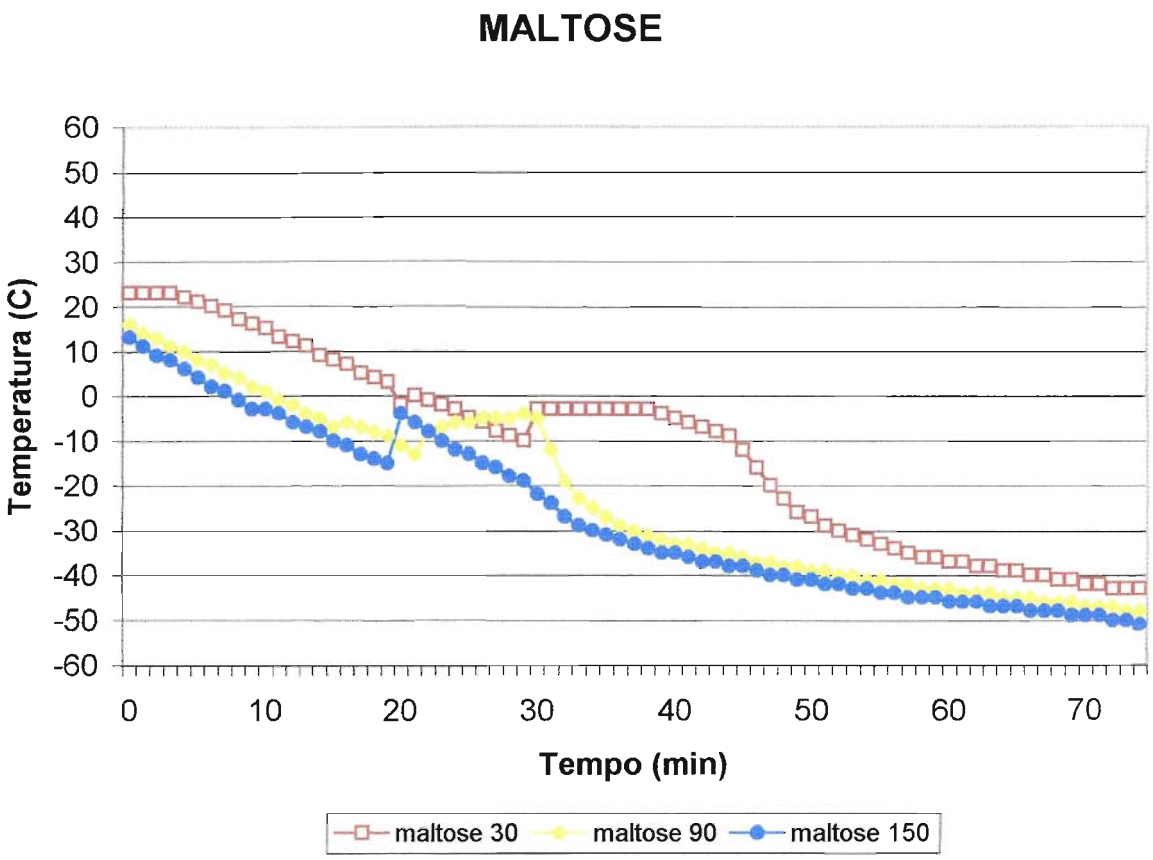

Figura 14. Curvas de resfriamento da maltose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

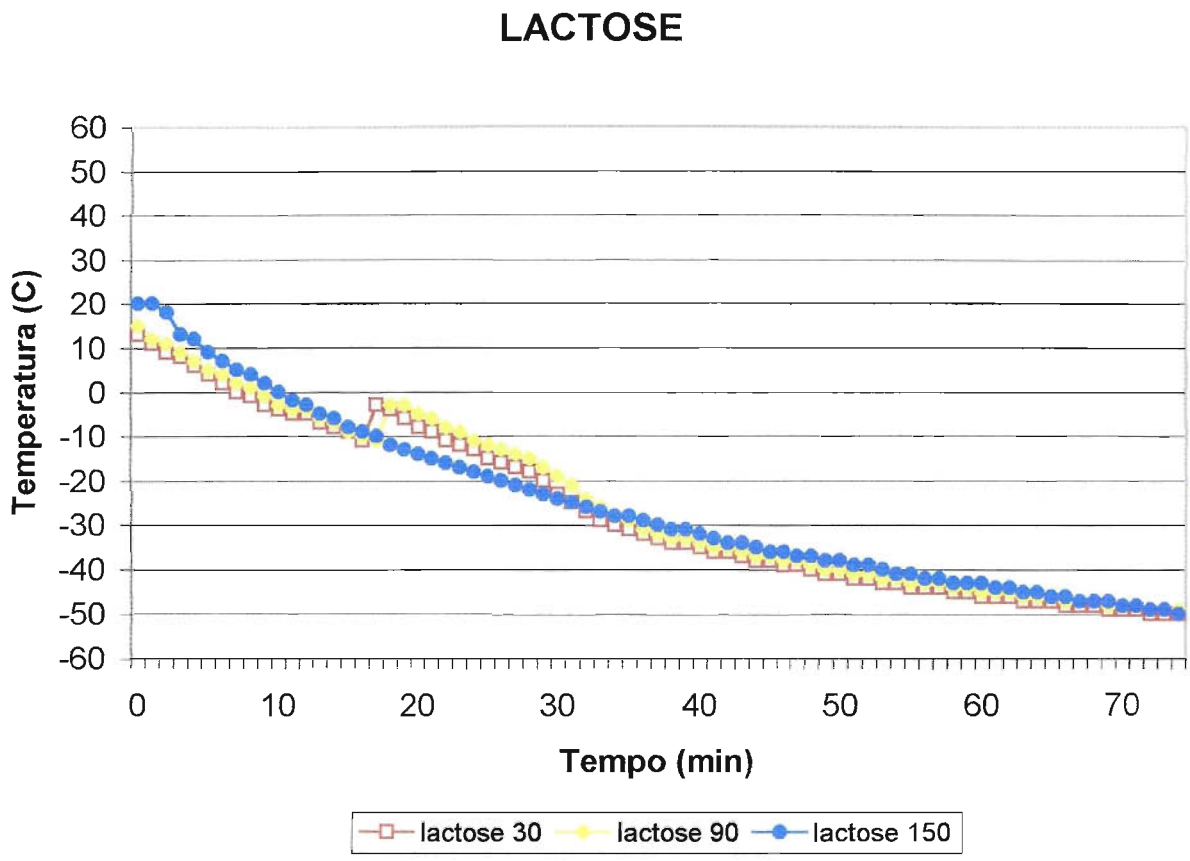

Figura 15. Curvas de resfriamento da lactose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

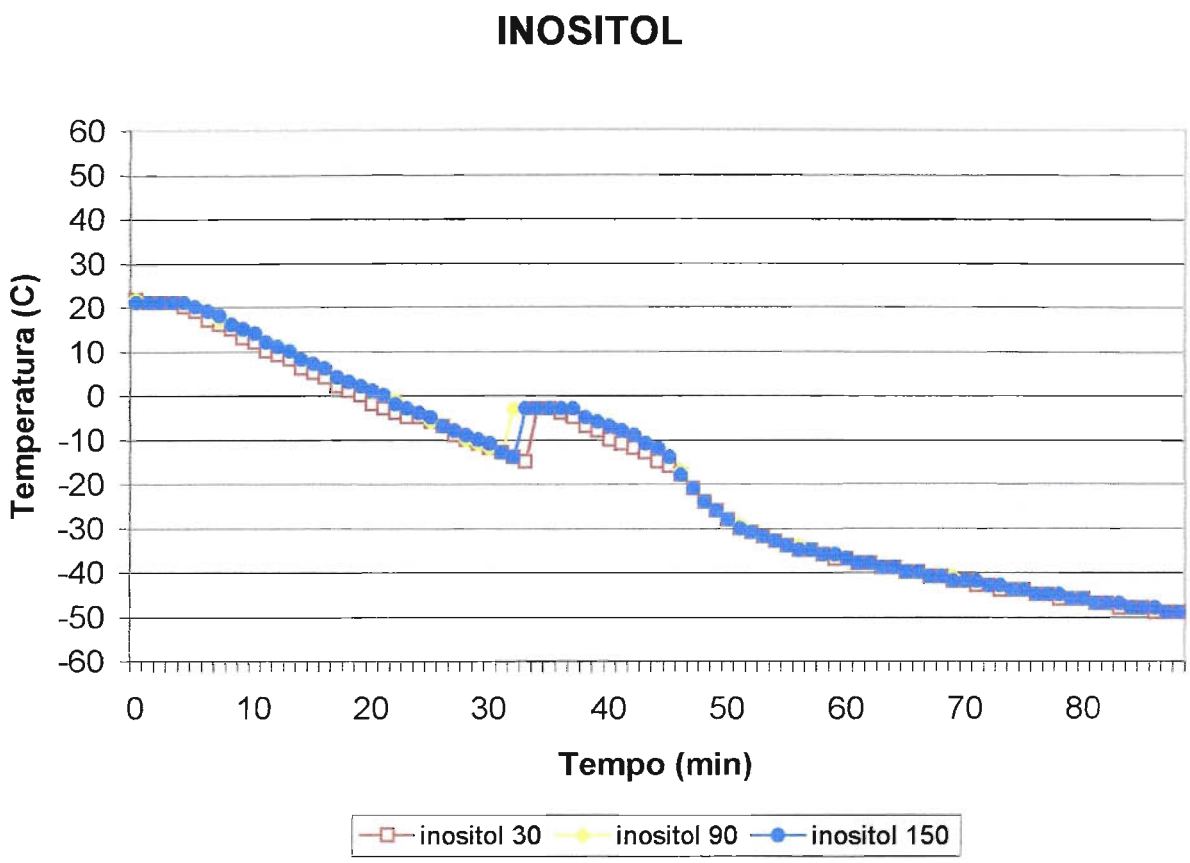

Figura 16 Curvas de resfriamento do inositol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

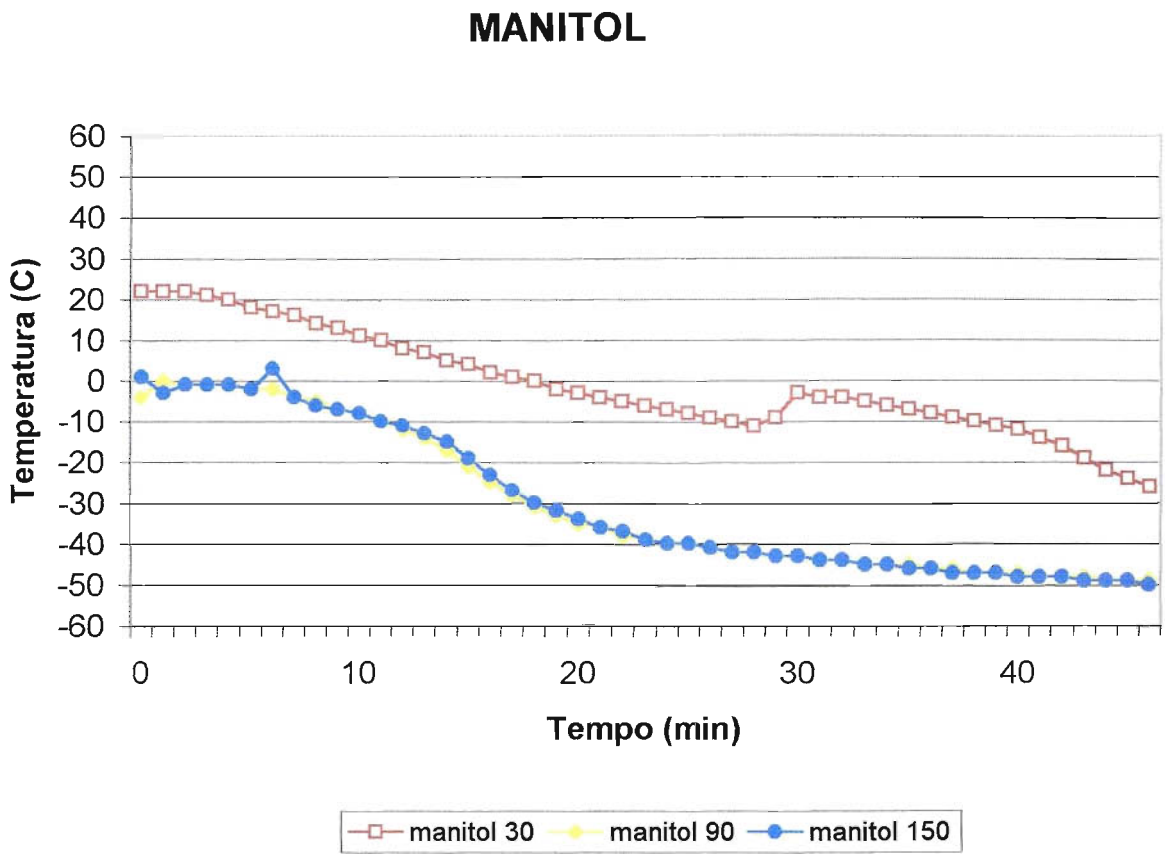

Figura 17. Curvas de resfriamento do manitol nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

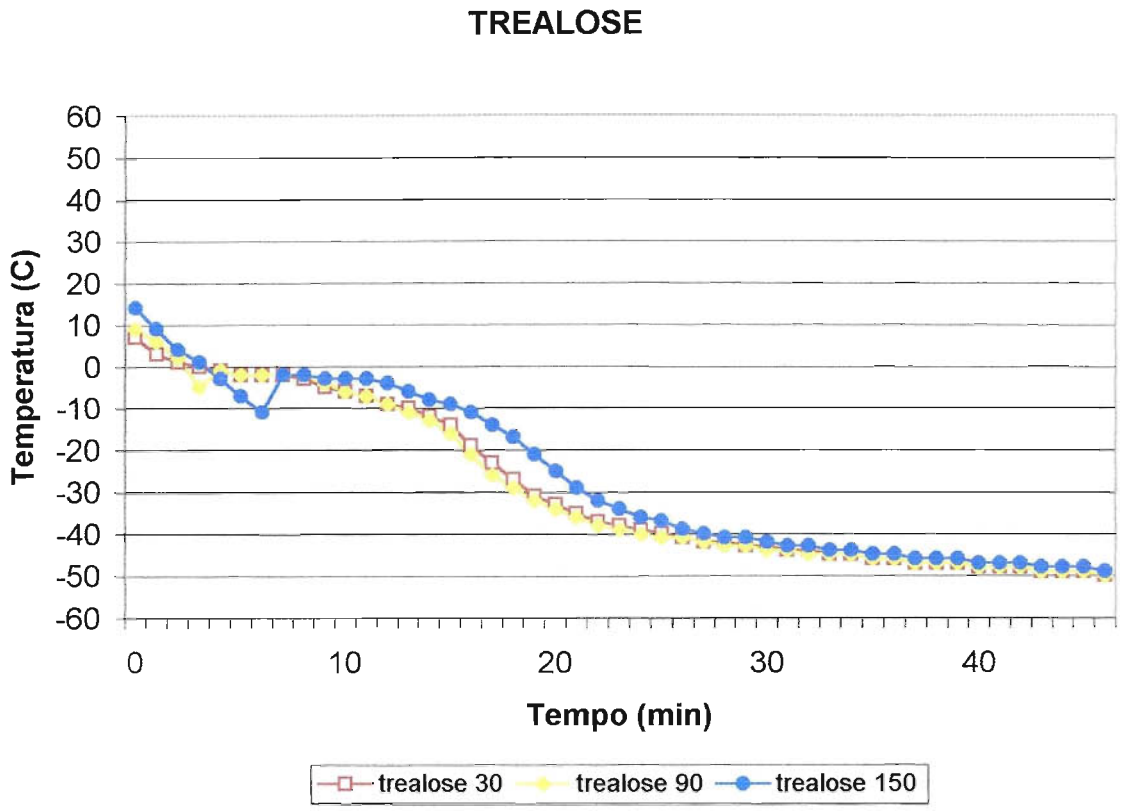

Figura 18. Curvas de resfriamento da trealose nas concentrações de 30, 90 e 150 mM.

De acordo com o manual do liofilizador utilizado para realização destas curvas de perfil de temperatura, o calor de fusão obtido na faixa de 0 a -2°C, pode ser indicativo do calor de fusão da água não ligada ao produto. Como a maioria das soluções não formam eutéticos bem definidos, os resultados podem ser mascarados pela água não ligada.

Uma forma de se confirmar estes resultados da curva de congelamento poderia ser através da realização de ensaios de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) através da medida do tempo de relaxação (T_2). Com o monitoramento da queda de temperatura em função do tempo em conjunto aos ensaios de RMN,

podem ser obtidos resultados extremamente confiáveis com relação ao estado de transição dos sistemas durante o congelamento. Foram realizadas algumas curvas do perfil de temperatura por RMN conforme item 5.3.

5.3. Análise por RMN

O princípio da ressonância que utiliza um campo magnético externo é comum a todas as técnicas espectroscópicas. O uso da RMN no estudo da mobilidade molecular fornece informações sobre a molécula, e também sobre a mobilidade de grupos individuais ou regiões dentro de tais estruturas. A seguir são apresentadas medidas do tempo de relaxação T_2 (spin-spin) na tentativa de se representar a mobilidade da água nos sistemas enzima-aditivo estudados após sua liofilização nas velocidades de congelamento propostas ao longo do trabalho (rápida, média e lenta). Através dos resultados procuramos mostrar as possíveis alterações estruturais ocorridas nos sistemas enzima-aditivo, procurando assim manter a atividade biológica da enzima.

Os estudos de relaxação visam examinar como o perfil da água pode ser manipulado em um dado sistema, e em qual fração ou frações as moléculas de água teriam influência dominante sobre uma dada propriedade, no caso deste trabalho, relacionado à atividade enzimática.

Os aditivos estudados (sacarose, maltose, lactose, inositol, manitol e trealose), apresentaram de um a três picos no espectro, considerando-se os sistemas com diferentes aditivos, concentrações e diferentes velocidades de congelamento. Em função desta mudança de aditivo, concentração e velocidade de congelamento, observaram-se mudanças no perfil de mobilidade das moléculas de água que interagem com a proteína.

Nos sistemas enzima-maltose (Figura 19) congelados na velocidade rápida, pode-se observar o maior valor de T_2 (81μs) quando a concentração de maltose foi maior (150mM), já nos sistemas menos concentrados (30 e 90mM), os valores de T_2 foram muito pequenos. E quando comparamos com a retenção de atividade, vimos que este sistema (150mM) apresentou a maior retenção (111,11%). Pode-

se dizer que esta semelhança está relacionada à uma forte interação da água da estrutura com a enzima, já que o sistema possui uma maior concentração, e com isso pode-se ainda supor que o aditivo utilizado conseguiu proteger a enzima durante o ensaio. No caso das velocidades média e lenta, o comportamento se manteve muito próximo. E uma observação interessante foi que as amostras de menor concentração apresentaram valores de T_2 muito próximos (2,43 e 2,04μs, respectivamente) e tiveram uma retenção de atividade baixa e também muito próximas, sendo 33,28% e 30,80% para as velocidades média e lenta respectivamente.

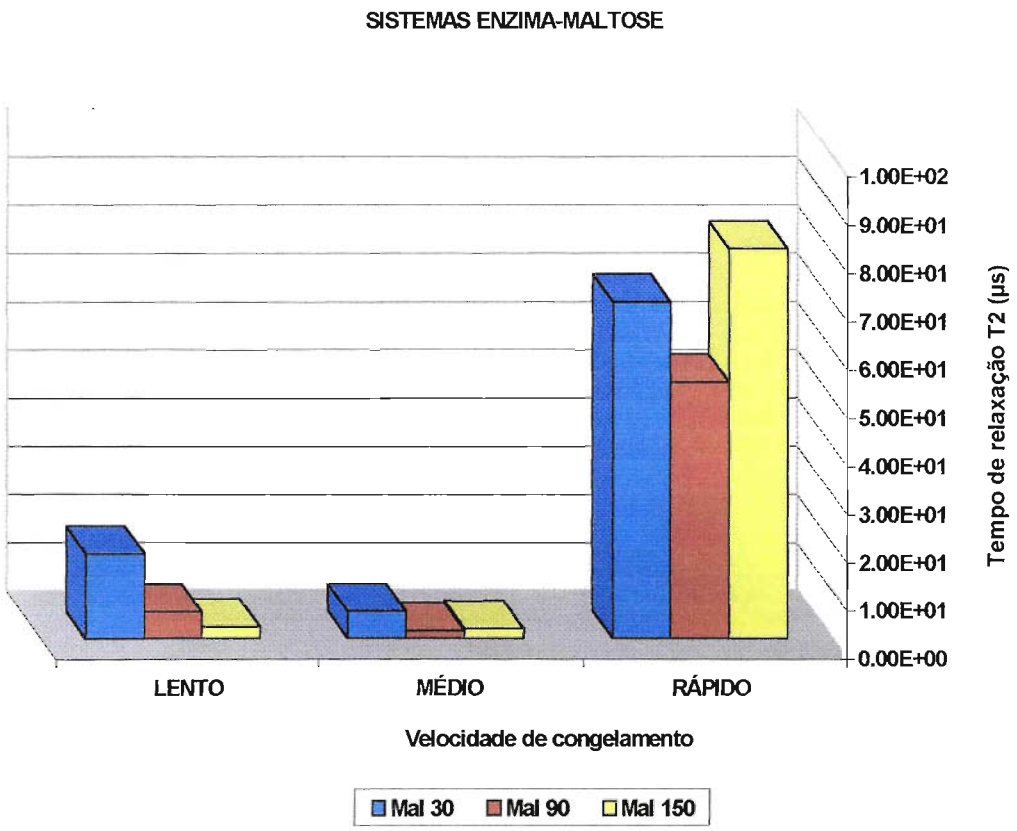

Figura 19. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-maltose* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30mM (azul) , 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

Para os sistemas enzima-lactose (Figura 20) quando levamos em conta a velocidade lenta de congelamento, observam-se os menores valores de T_2 para as três concentrações empregadas e no sistema onde a concentração de lactose é maior (150mM), foi obtido a maior retenção de atividade (38,05%) dos sistemas enzima-lactose. Tanto nos sistemas congelados rapidamente como nos congelados lentamente, observou-se um comportamento diferente em cada concentração. O maior valor de T_2 obtido (16,2μs), foi para o sistema congelado na velocidade média e na concentração de 150mM, e este sistema apresentou baixa retenção de atividade.

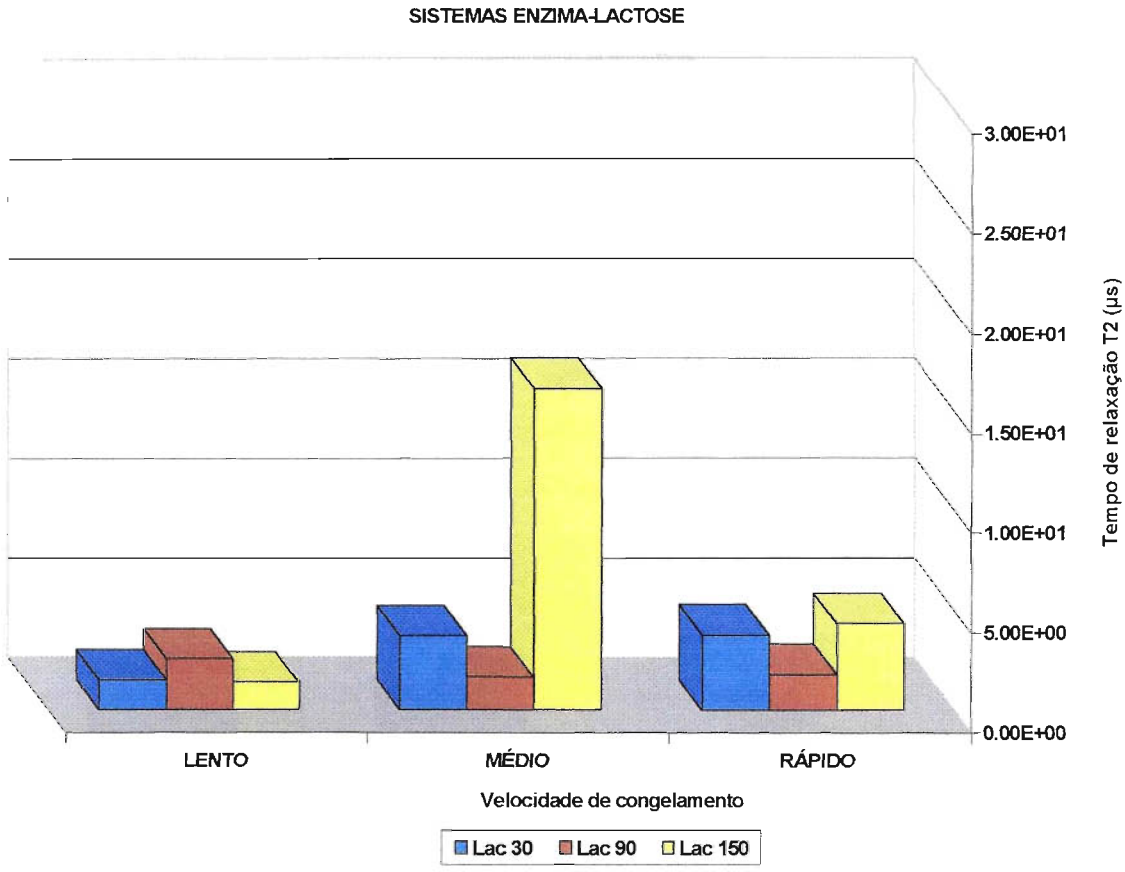

Figura 20. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-lactose* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de lactose 30mM (azul) , 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

Quando estudamos os sistemas enzima-inositol (Figura 21) observou-se que o tempo de relaxação T_2 aumentou de acordo com a concentração de inositol nos sistemas, independente da velocidade de congelamento empregada (por exemplo: 4,76; 6,52 e 12,4μs para a velocidade lenta). Levando-se em conta a concentração de inositol observamos que o T_2 diminuiu com o aumento da velocidade de congelamento, este comportamento é observado para as três concentrações. Uma observação interessante foi que, se levarmos em conta a velocidade de congelamento houve um aumento de T_2 com o aumento da concentração. Esta relação não foi observada para os valores de retenção de atividade já que os valores obtidos foram muito baixos e em alguns casos nulo.

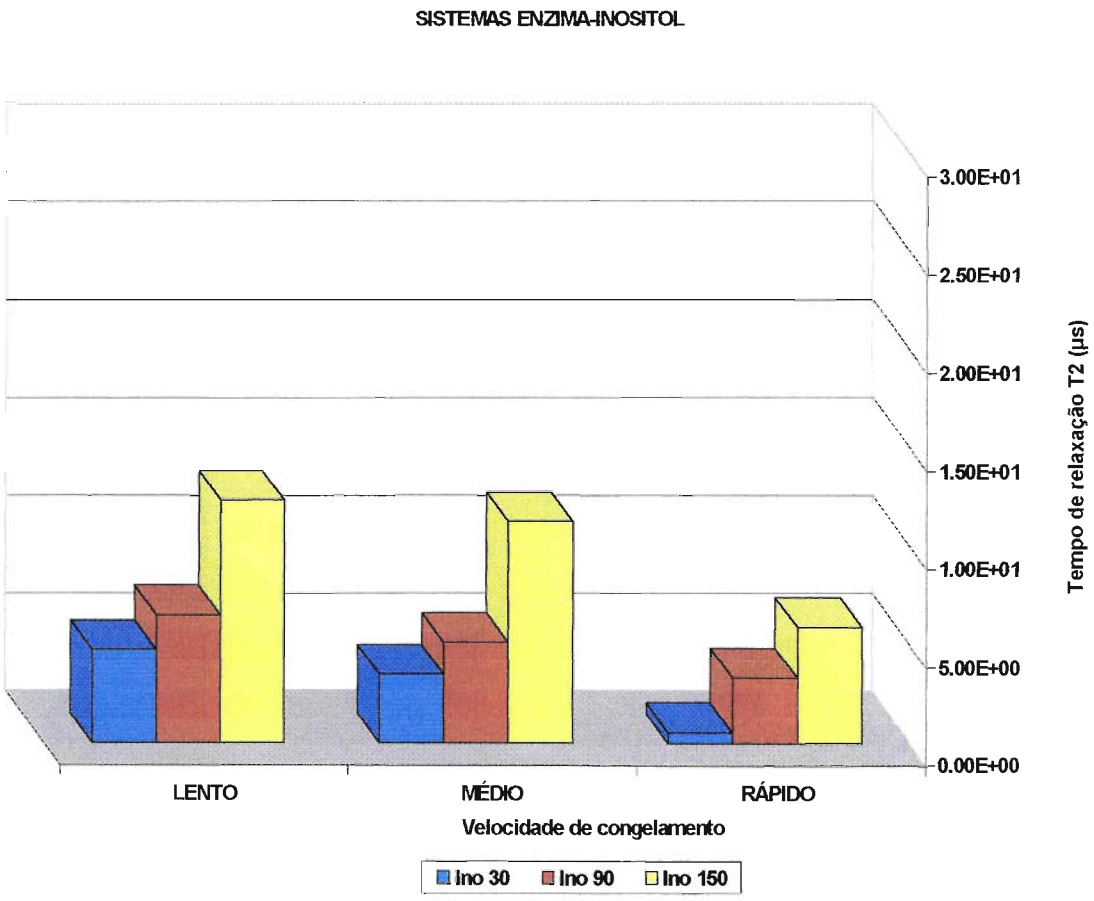

Figura 21. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-inositol* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de inositol 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

No caso dos sistemas enzima-manitol (Figura 22) quando estudamos a velocidade intermediária, observou-se dois picos bem definidos para as três concentrações proporcionais à concentração. Apesar destes picos mostrarem uma possível interação com a enzima, observamos valores de T_2 diferentes em cada velocidade de congelamento e em cada velocidade. Apesar destes valores representarem uma interação com a enzima, a retenção de atividade foi nula nestes sistemas. Este comportamento pode estar relacionado com uma interação mais forte à medida que a concentração aumenta.

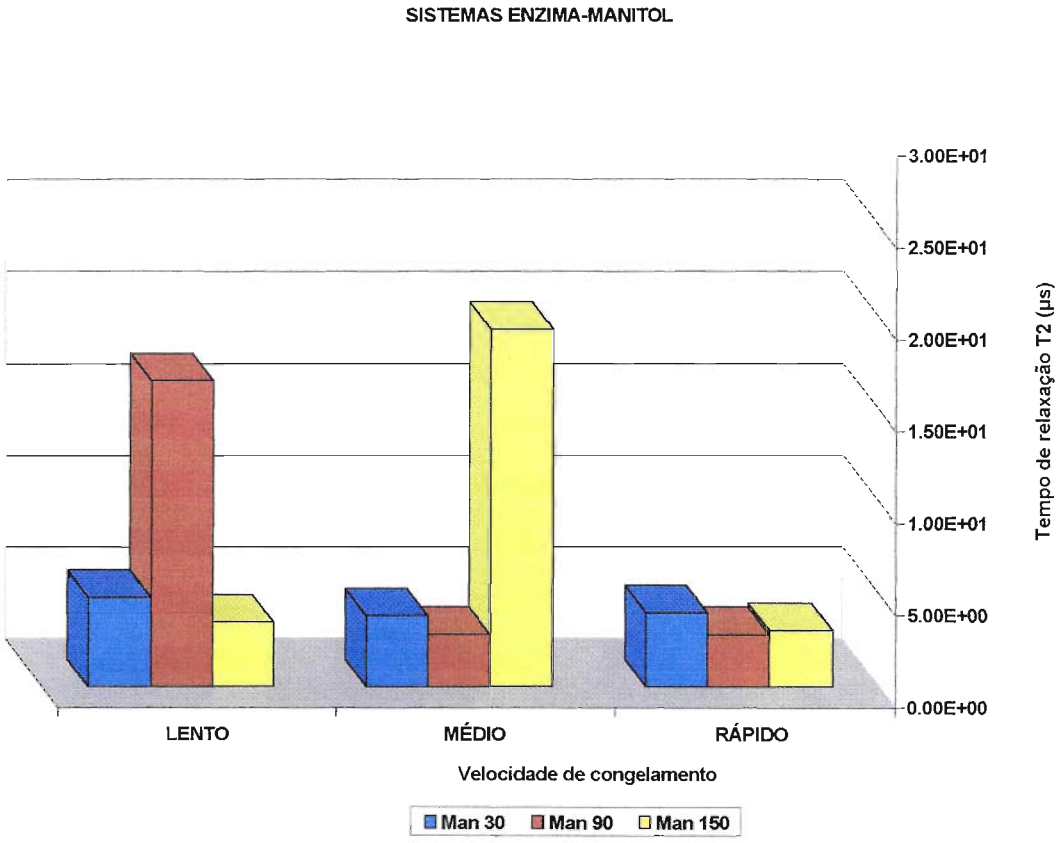

Figura 22. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-manitol* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de manitol 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

Quando estudamos os sistemas enzima-trealose (Figura 23), nos sistemas onde a concentração de aditivo foi de 150mM observou-se valores de T_2 muito próximos nas três velocidades de congelamento e nessas condições os sistemas apresentaram um aumento na retenção de atividade conforme a velocidade de congelamento se tornou mais rápida, os valores de retenção obtidos foram 21,47%, 27,06% e 79,74%, para velocidade lenta, média e rápida respectivamente. Uma observação interessante deve-se ao fato de que o sistema de maior retenção de atividade (89,93%) quando a concentração de trealose foi 90mM, apresentou o menor valor de T_2 (0,44μs). Este fato pode ter ocorrido devido a água esta fortemente ligada no sistema

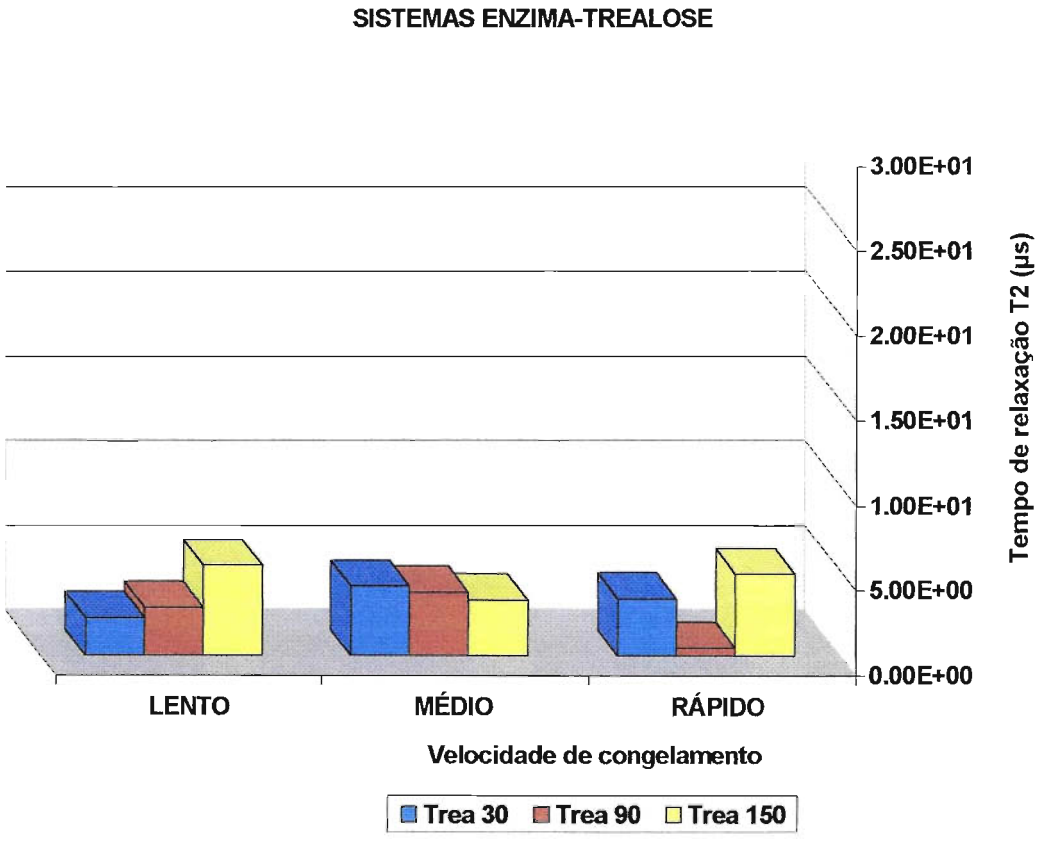

Figura 23. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-trealose* congelados nas três velocidades, sendo as concentrações de trealose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

Foi encontrado na literatura que o tempo de relaxação T_2 diminui com o aumento da concentração de sacarose em solução aquosa (RUAN et al, 1998), este comportamento não foi observado nos sistemas estudados, isto pode estar relacionado ao fato de trabalharmos com sistemas enzima-água-aditivo, havendo assim uma maior interação do que quando se utiliza somente água (Figura 24).

Foi possível observar no caso de maior concentração de sacarose (150mM) uma diminuição de T_2 com o aumento da velocidade de congelamento. É provável que este comportamento se deva a formação de cristais de gelo, que neste caso são pequenos e preservam detalhes estruturais da enzima.

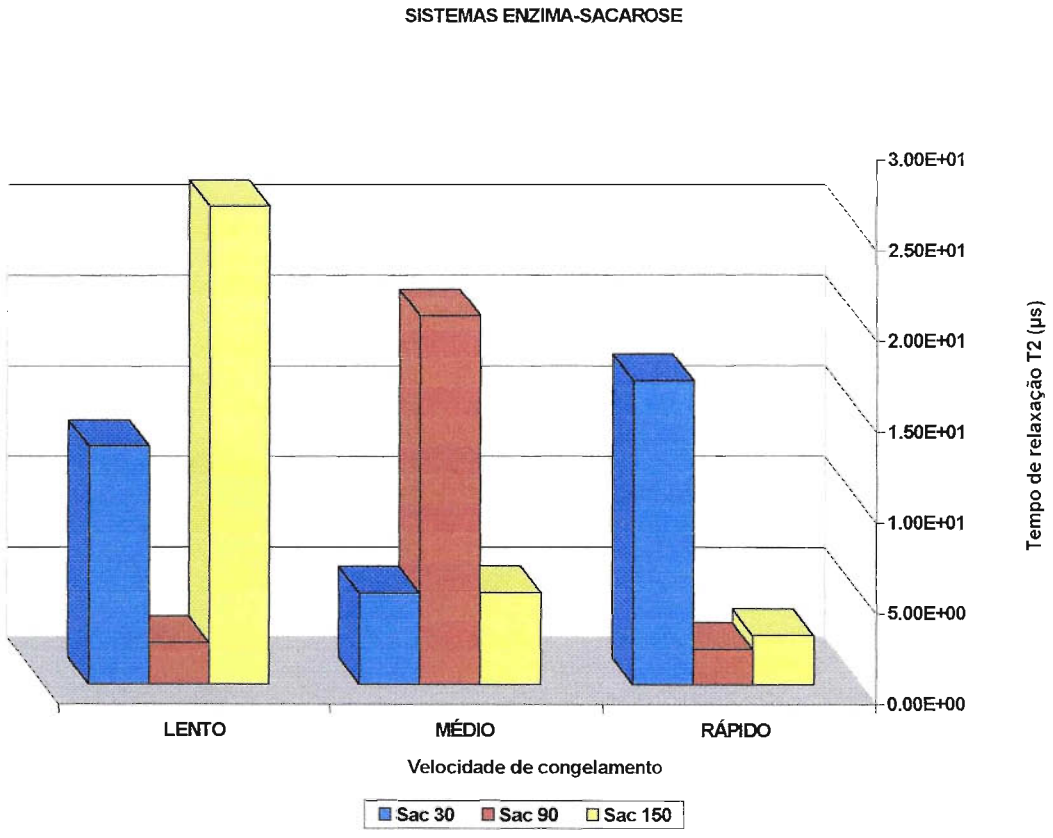

Figura 24. Tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-sacarose* congelados nas três velocidades, sendo as concentrações de sacarose 30mM (azul), 90mM (vermelho) e 150mM (amarelo).

Em alguns dos sistemas estudados foi possível obter-se resultados coerentes de T_2 relacionados à interação enzima-aditivo com a retenção de atividade e, em outros casos esta relação é inversa. Uma possível interpretação para estes resultados deve-se ao fato de que a interação enzima-aditivo pode alterar significativamente a conformação da enzima, apresentando então maiores valores de retenção. Já em outras situações esta alteração não é suficiente para aumentar a retenção de atividade.

São apresentados a seguir os gráficos de distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas enzima-aditivo estudados mostrando esta distribuição ao longo do perfil dos espectros de RMN.

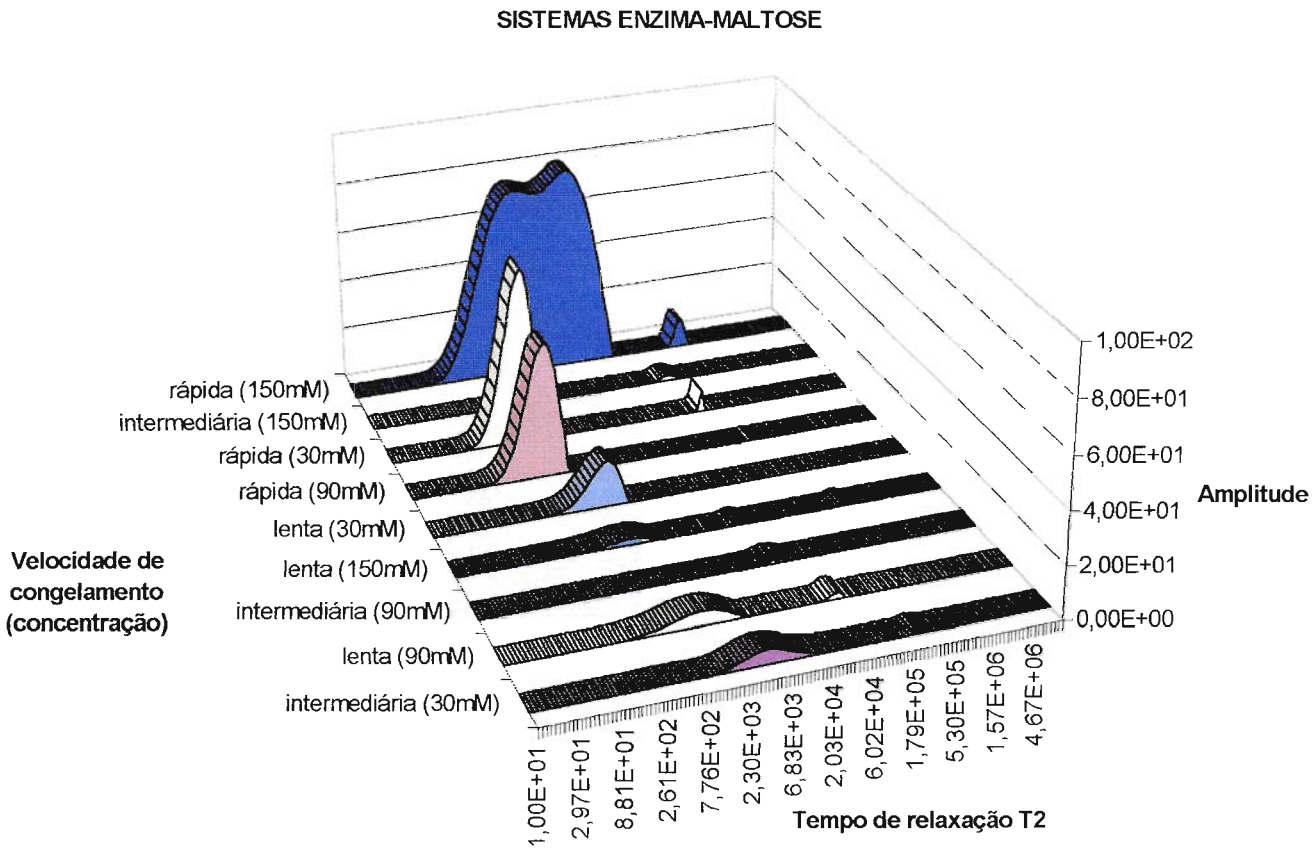

Figura 25. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-maltose* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de maltose 30, 90 e 150mM.

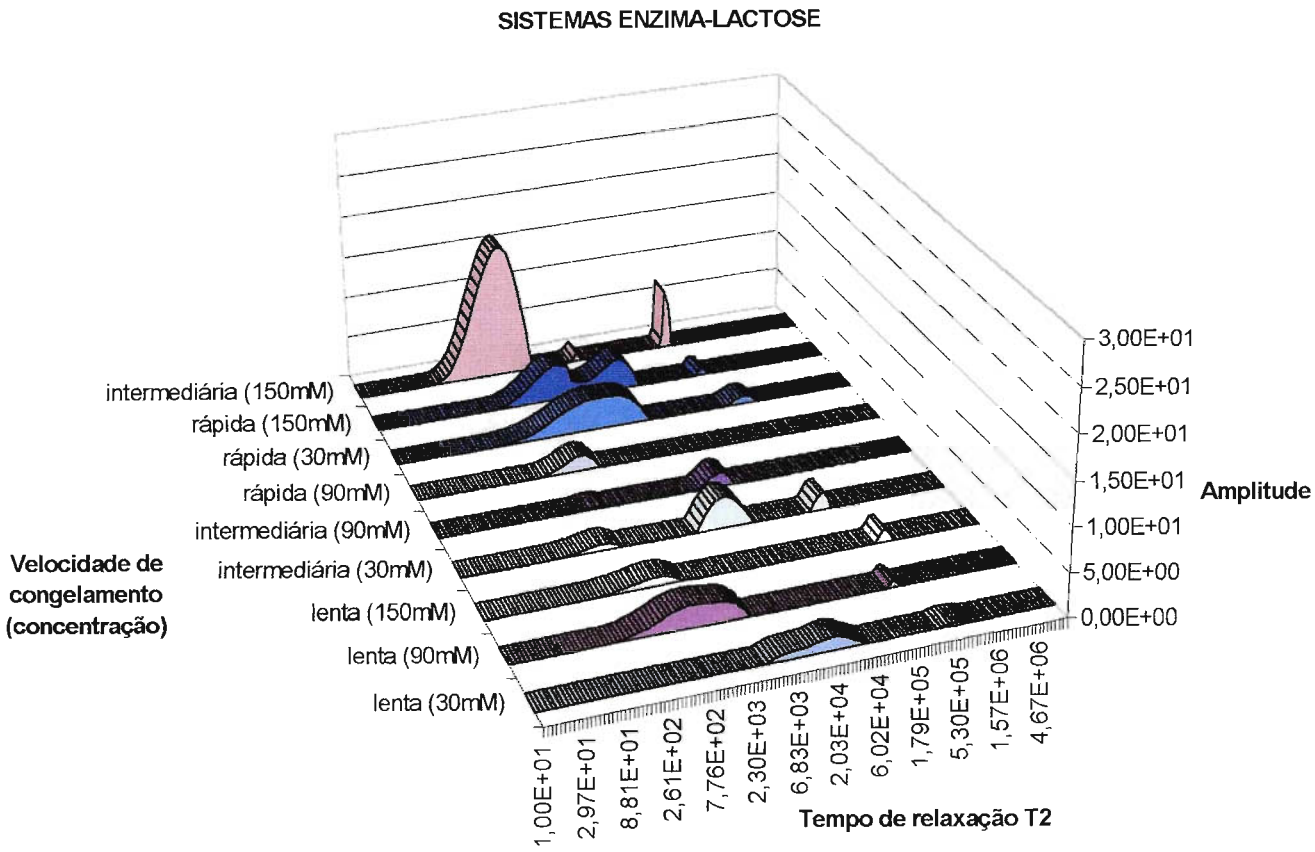

Figura 26. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-lactose* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de lactose 30, 90 e 150mM.

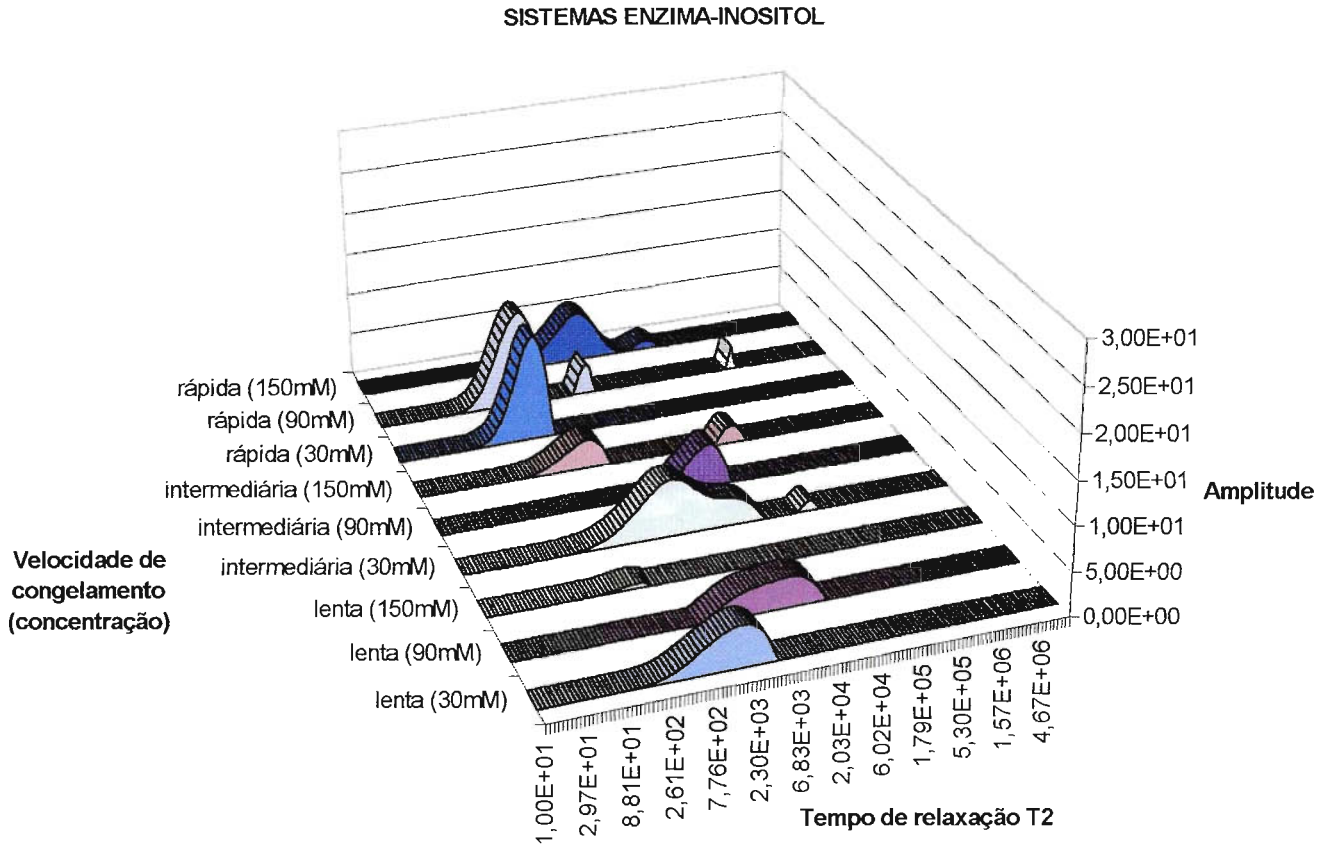

Figura 27. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-inositol* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de inositol 30, 90 e 150mM.

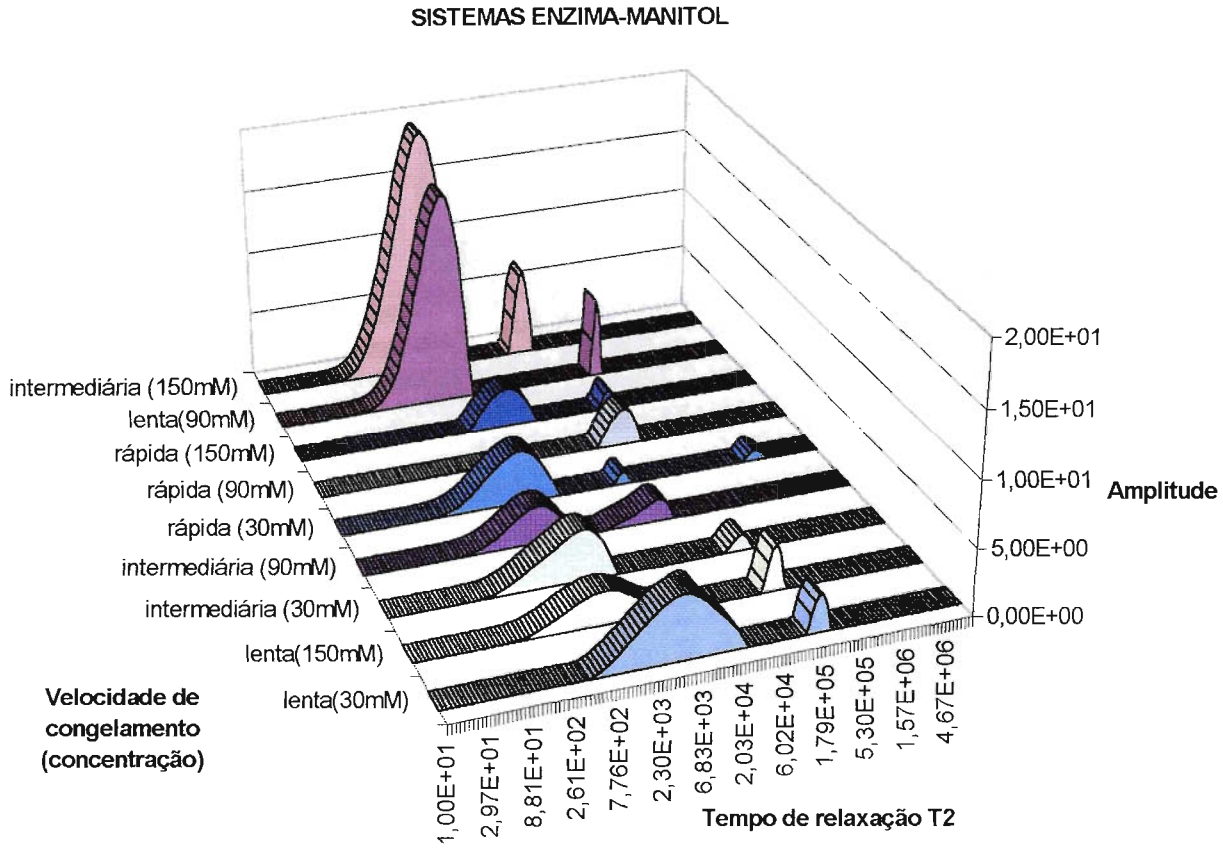

Figura 28. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-manitol* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de manitol 30, 90 e 150mM.

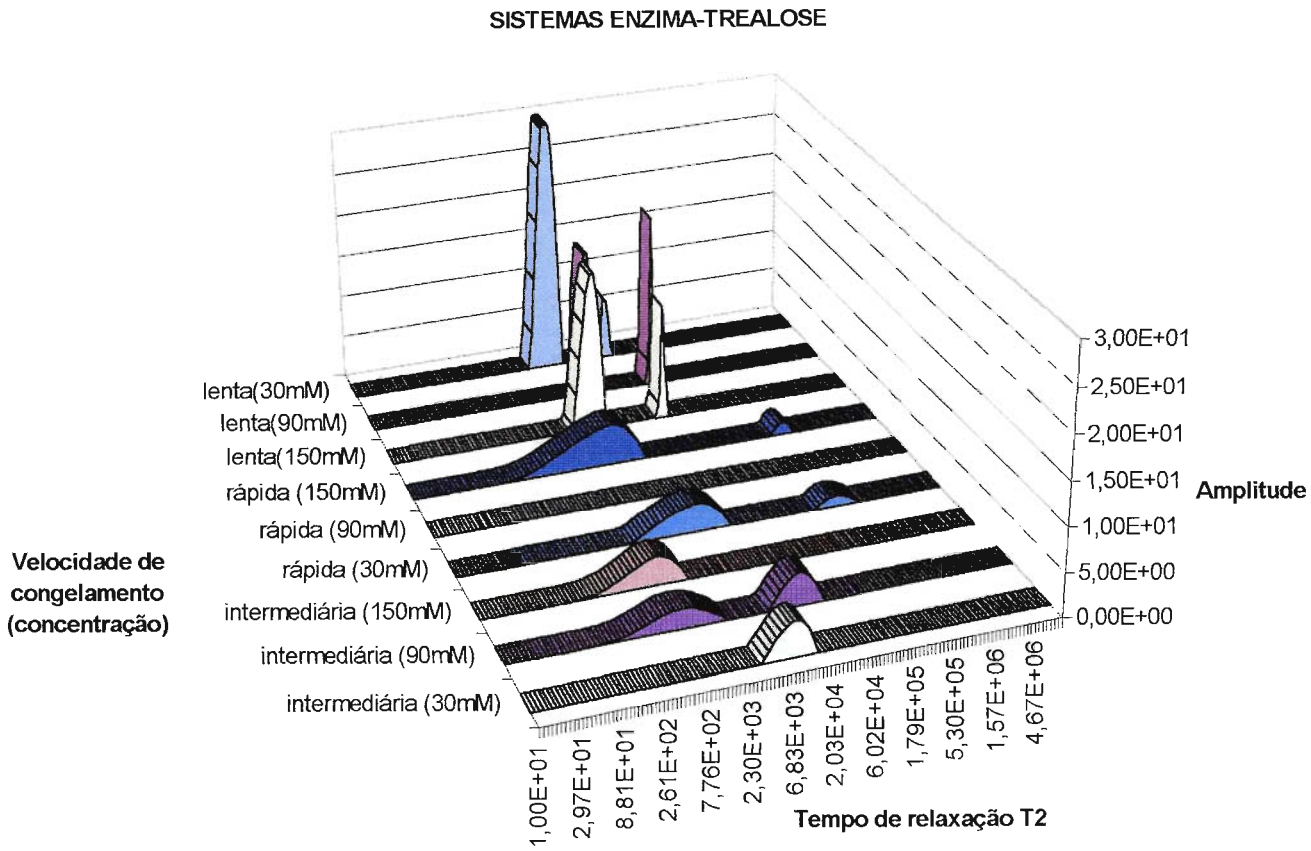

Figura 29. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-trealose* congelados nas três velocidades de congelamento, sendo as concentrações de trealose 30, 90 e 150mM.

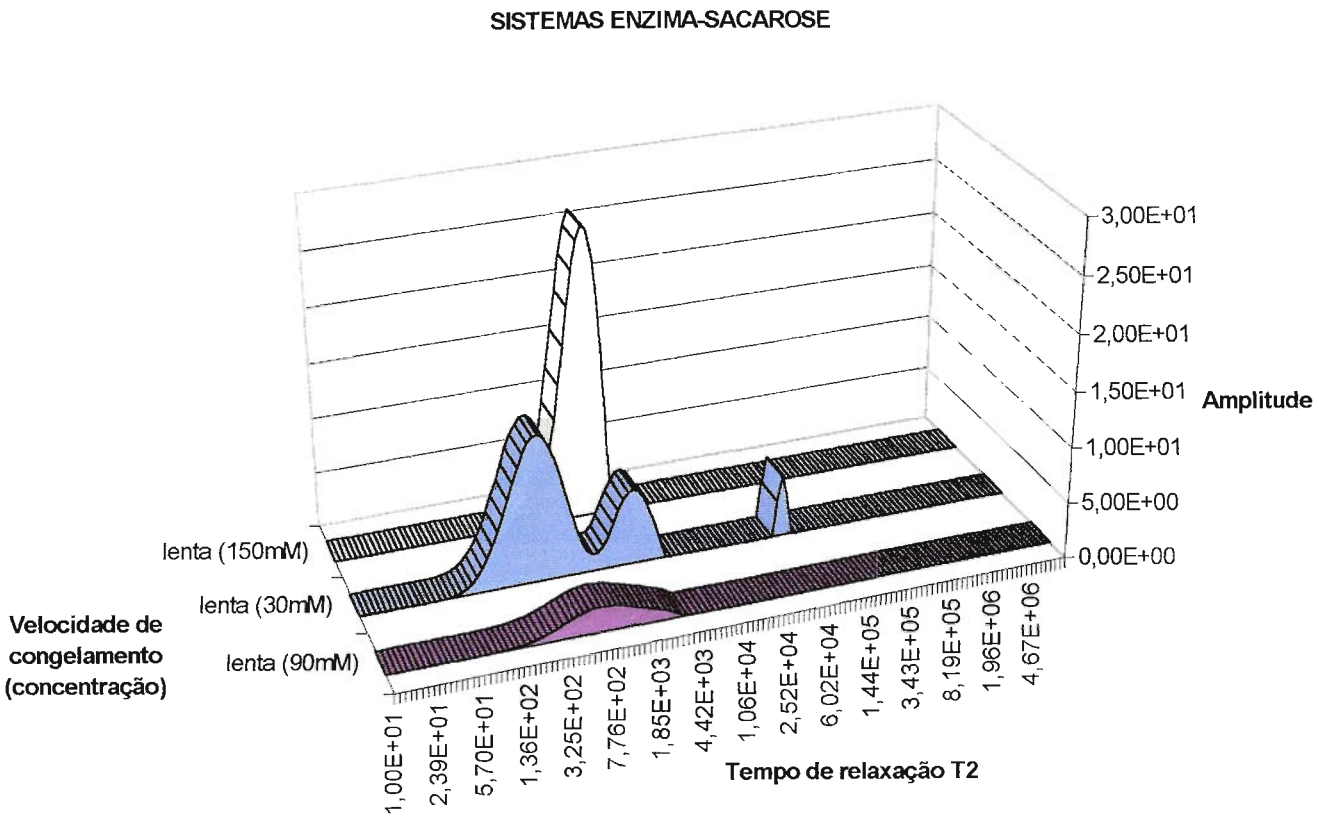

Figura 30. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-sacarose* congelados *lentamente*, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM.

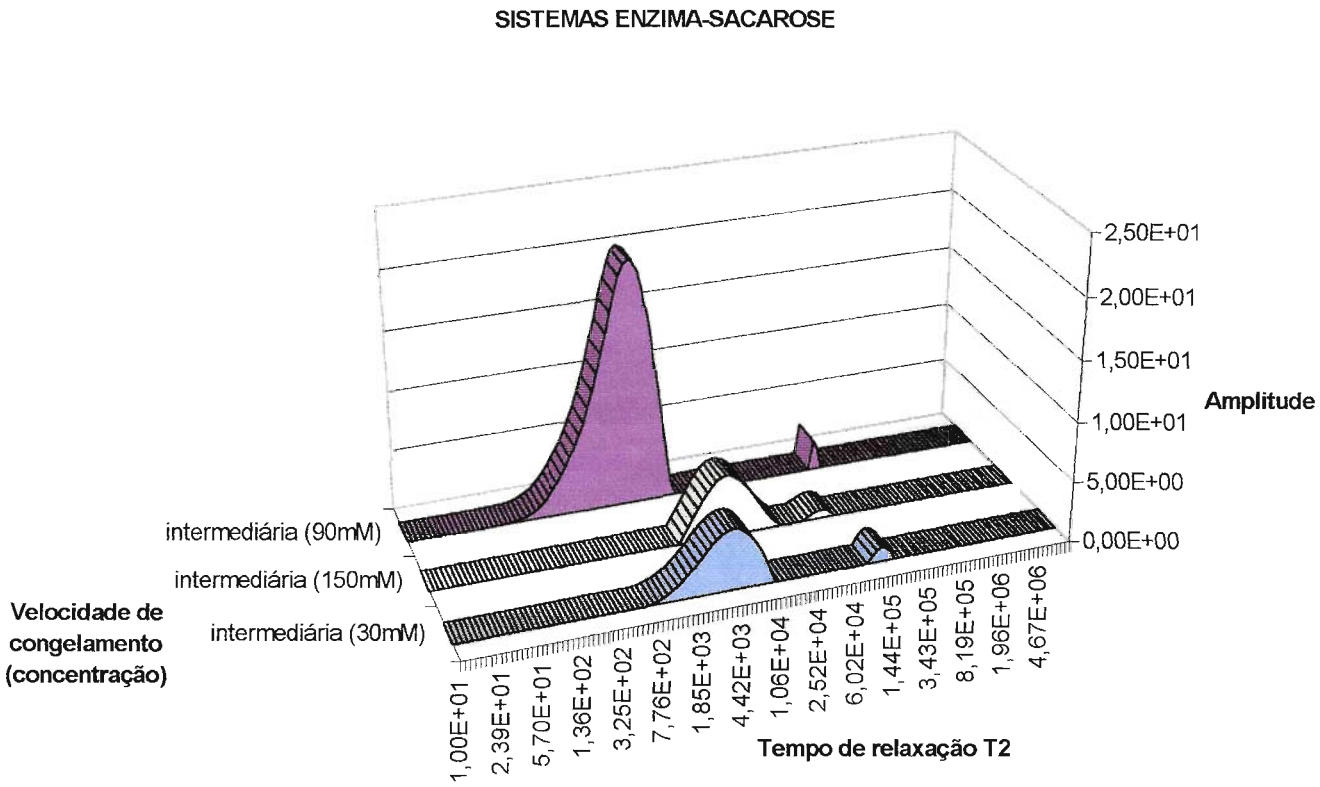

Figura 31. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-sacarose* congelados na velocidade *média*, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM.

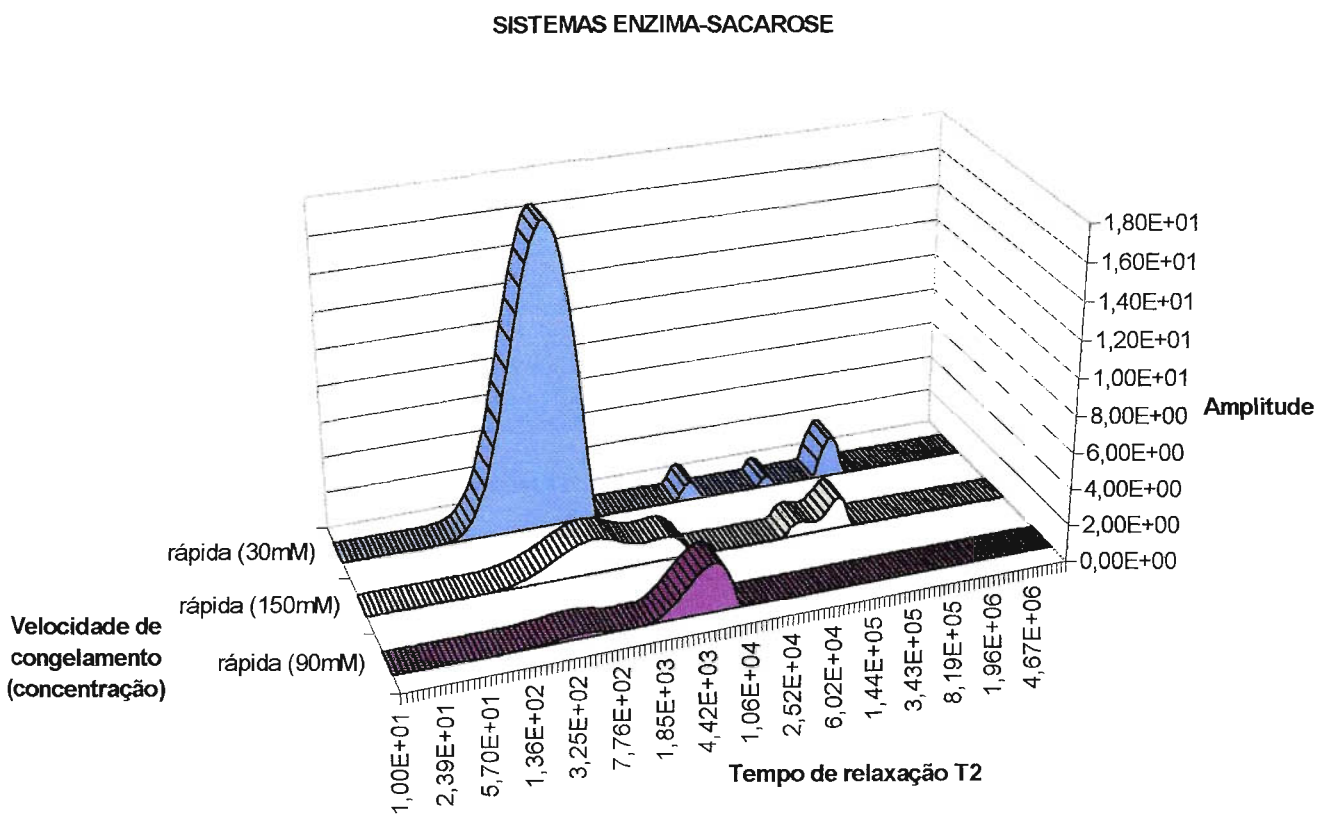

Figura 32. Distribuição do tempo de relaxação T_2 *(spin-spin)* para os sistemas *enzima-sacarose* congelados *rapidamente*, sendo as concentrações de sacarose 30, 90 e 150mM.

5.3.1 Curvas de congelamento por RMN

A seguir serão apresentados o perfil das curvas de congelamento para alguns sistemas água-aditivo na tentativa de se comparar com as curvas obtidas por monitoramento de temperatura.

Os sistemas estudados foram água-sacarose, água-manitol e água-trealose (Figura 25), todas na concentração de 30mM. As curvas foram obtidas através da determinação do tempo de relaxação T_2 com o decréscimo da temperatura.

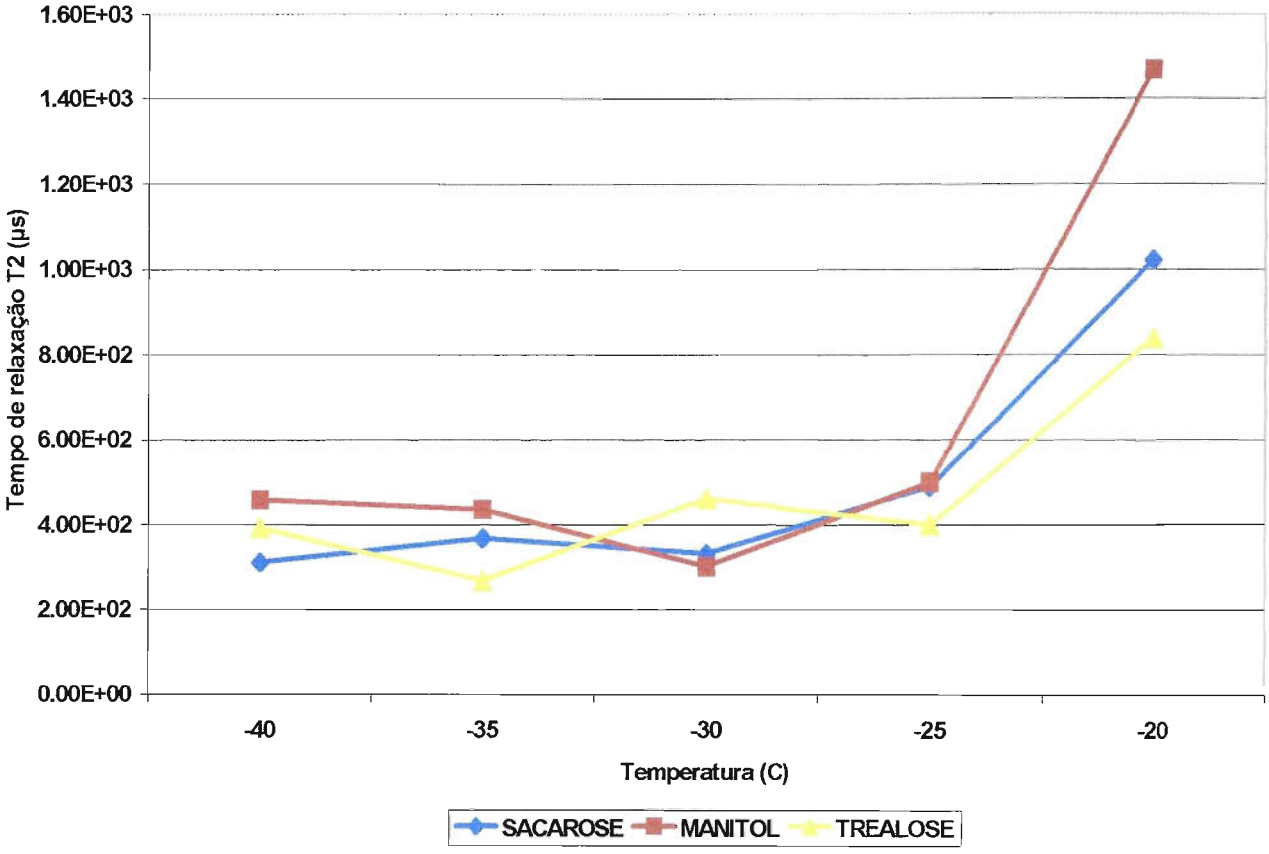

Figura 33. Curvas de congelamento dos sistemas água-sacarose (azul), água-manitol (vermelho) e água-trealose (amarelo) na concentração de 30mM, por RMN.

Observando a Figura 33, observa-se que o ponto de inflexão acontece a -25°C para trealose e -30°C para manitol e sacarose, assim podemos dizer que estas são as temperaturas de transição vítrea (T_g). Então conclui-se que a liofilização deve ser conduzida abaixo desta temperatura para que o produto não entre em colapso.

5.4. Análise por FT-IR

As análises de FT-IR foram realizadas pelo método KBr por se tratarem de amostras sólidas. E a grande vantagem de se utilizar este método, consiste no fato de que o KBr não tem uma faixa própria de IV e também os espectros obtidos são melhores do que os outros métodos, como por exemplo o de suspensão em óleo. Entretanto, o KBr é higroscópico, então traços de água raramente podem ser excluídos por completo durante o processo. Por essa razão, uma faixa de OH é geralmente observada a 3450 cm^{-1}.

Para sistemas liofilizados pode-se dizer que certos aditivos dão proteção a enzimas sensíveis porque estes funcionam como substituto da água na proteína seca, satisfazendo as necessidades das ligações do hidrogênio de grupos polares na superfície da proteína.

Os espectros de IV mostram a posição, aparecimento e intensidade relativa das faixas de absorção típicas que representam classes de compostos. A variedade desta região chamada *'fingerprint'* demonstra a utilidade desta região do espectro IV na identificação de compostos.

As proteínas podem repetir as unidades chegando a nove faixas características na absorção infravermelha. Há uma nomenclatura geralmente aceita de frequências aproximadas, que são denominadas bandas. Algumas destas bandas são mais utilizadas do que outras. A banda amido I é correspondente às ligações C=O 'stretching', e a banda amido II corresponde às ligações C-N 'stretching' e N-H 'blending'.

Em geral, um espectro pode ser analisado somente se todas as faixas de absorção estiverem dentro das consideradas desde que não hajam vibrações isoladas envolvendo grupos particulares de moléculas. Porém, para moléculas complexas geralmente é possível obterem-se conclusões das análises de algumas poucas faixas

relacionadas se, estas envolverem somente poucos átomos de uma estrutura mais complexa.

As bandas amido I e amido II se dividem em componentes dependendo da estrutura secundária da molécula estudada e têm sido frequentemente usadas para análise conformacional. Embora a fina estrutura destas bandas anlcancem várias conformações resultam, em princípio, em várias faixas para cada conformação (duas para a α-hélice e três para a estrutura β) (SUSI, 1993).

A seguir serão apresentados alguns espectros de IV em algumas condições previamente escolhidas devido ao grande número de amostras e variáveis em estudo O critério para a escolha de condições determinadas foi baseado nos resultados anteriores de atividade enzimática e RMN, procurando assim manter uma certa coerência com os resultados apresentados.

Nos espectros obtidos pode-se observar uma região característica entre 1800 e 1400 cm^{-1}. Como o estudo foi realizado com L-asparaginase pode-se concluir que os espectros obtidos identificam a região amídica (HESSE *et al.*, 1997).

Nos espectros mostrados a seguir foi possível observar as faixas de amido independente da velocidade de congelamento, concentração ou aditivo utilizado.

O primeiro espectro mostra a região '*fingerprint* ' para a enzima L-asparaginase sem aditivo (Figura 34).

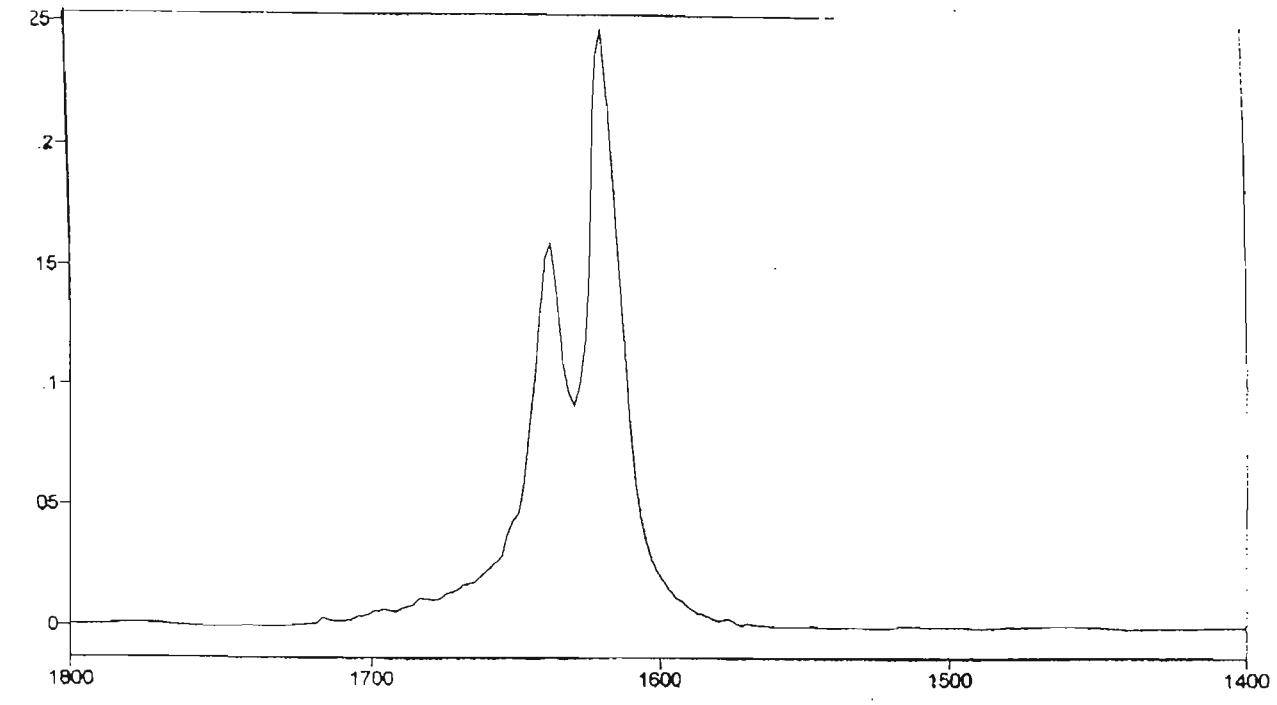

Figura 34. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* da enzima *L-asparaginase* liofilizada sem aditivo.

Nos sistemas trealose-enzima na concentração de 150mM, foi possível observar que a faixa amido I permaneceu praticamente inalterada quando o sistema foi congelado na velocidade lenta (1645 cm^{-1}) e na velocidade rápida (1648 cm^{-1}) representando as ligações C=O na região do espectro, o mesmo ocorreu com a segunda faixa do espectro na velocidade lenta (1418 cm^{-1}) e na velocidade rápida (1424 cm^{-1}), porém estes valores não apresentam ligações em regiões identificáveis do espectro. Mas é importante ressaltar que as ligações nesta região são mais fortes. A manutenção da retenção de atividade nestes sistemas pode estar relacionada com o fato destes sistemas apresentarem valores semelhantes ao da enzima pura, e assim representando uma interação mais forte (Figuras 35 e 36).

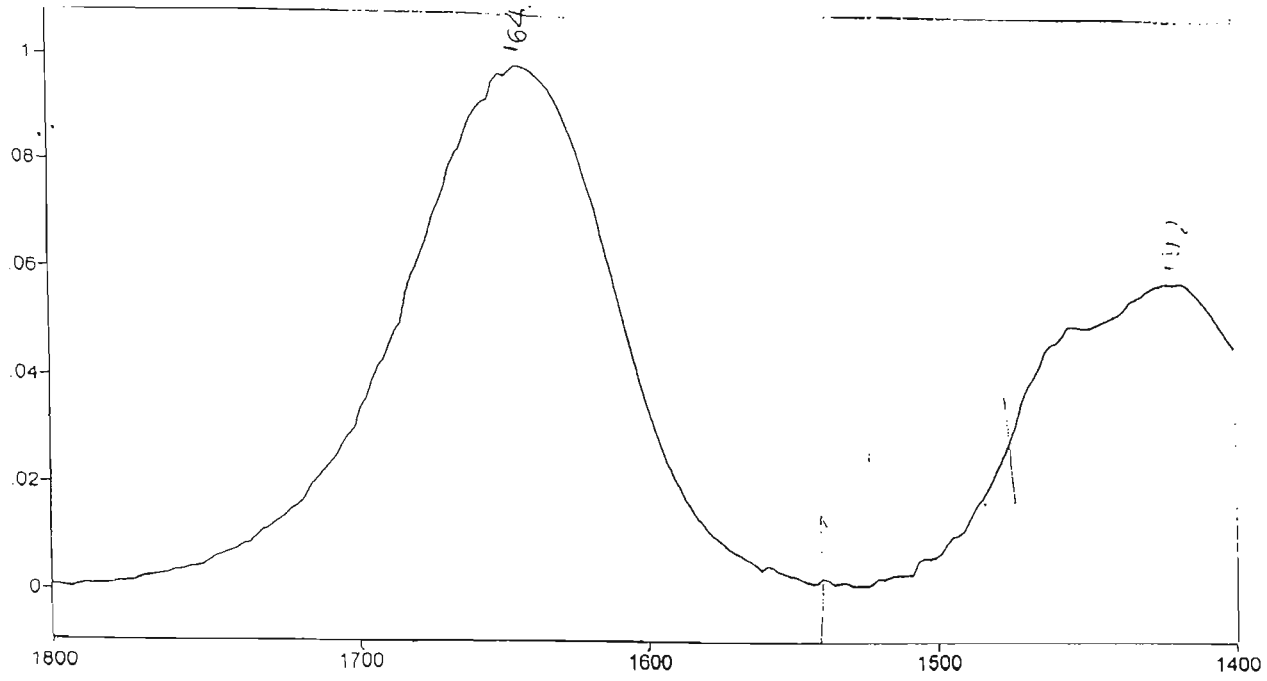

Figura 35. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *trealose-enzima* na concentração de 150mM congelados *lentamente*.

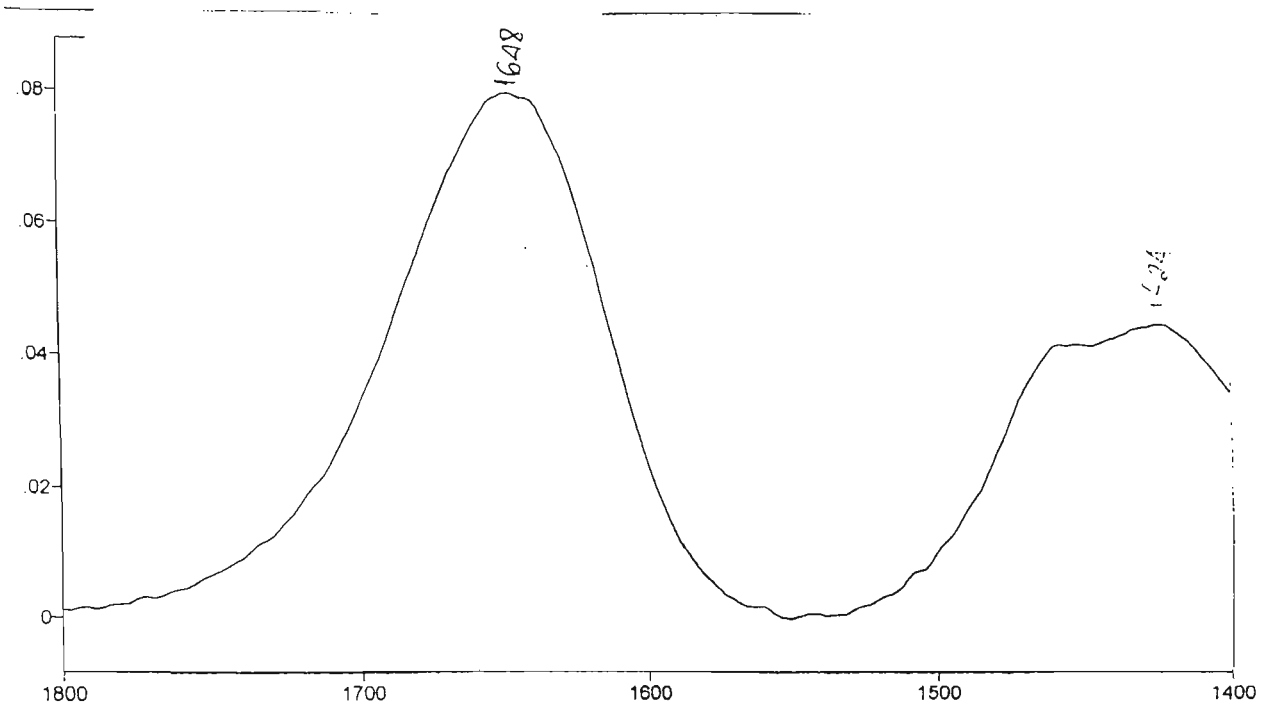

Figura 36. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *trealose-enzima* na concentração de 150mM congelados *rapidamente*.

Quando estudamos os sistemas inositol-enzima na concentração de 150mM, um comportamento muito semelhante ocorreu nas amostras, nas velocidades de congelamento lenta (Figura 37) e média (Figura 38) foram obtidos 1635 cm^{-1} na faixa amido I e 1637 cm^{-1} na velocidade rápida (Figura 39), mostrando que a velocidade de congelamento anterior à liofilização não altera a interação aditivo-enzima. A faixa de 1500 a 1400 cm^{-1} apresentou valores similares para os três

congelamentos, porém nesta faixa do espectro como a faixa de absorção está abaixo da faixa conhecida como amido II, não foi possível identicar as ligações presentes. Porém, nesta faixa o espectro é muito semelhante ao da enzima pura. Um comportamento semelhante ocorreu com os resultados do tempo de relaxação T_2 destes sistemas, nos quais a velocidade de congelamento não influenciou o perfil de mobilidade dos sistemas quando a concentração de inositol foi de 150mM.

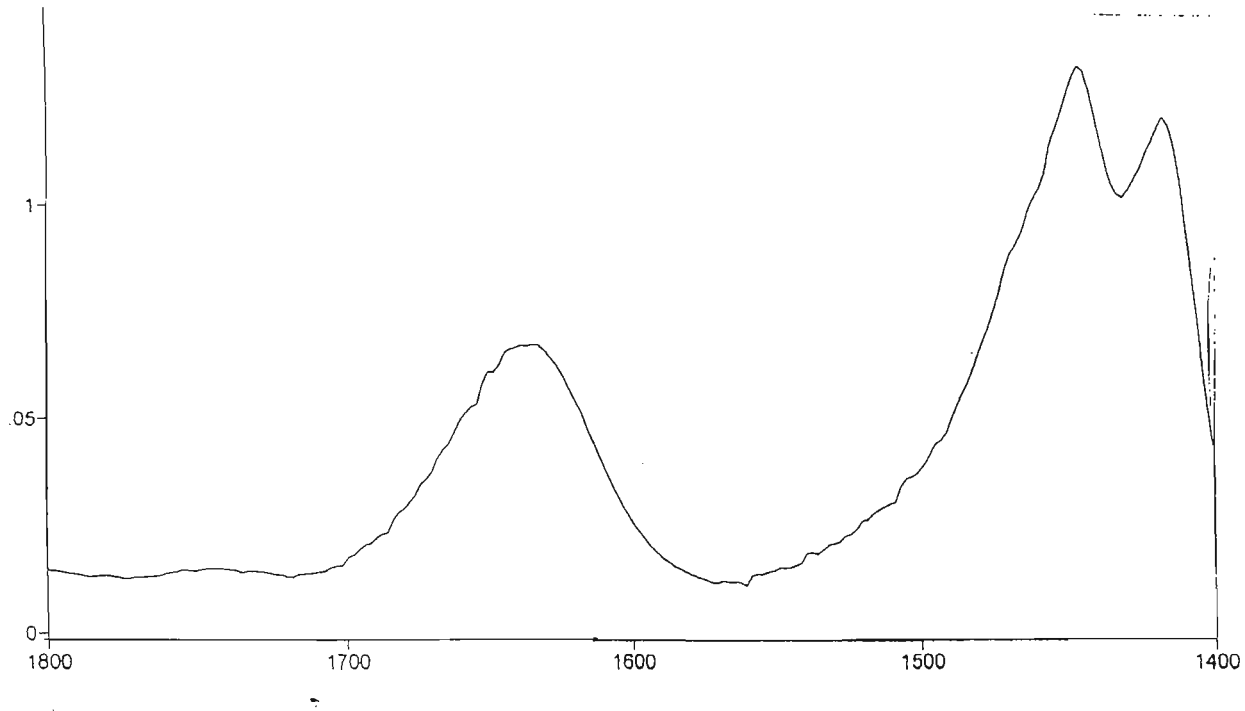

Figura 37. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *inositol-enzima* na concentração de 150mM congelados *lentamente.*

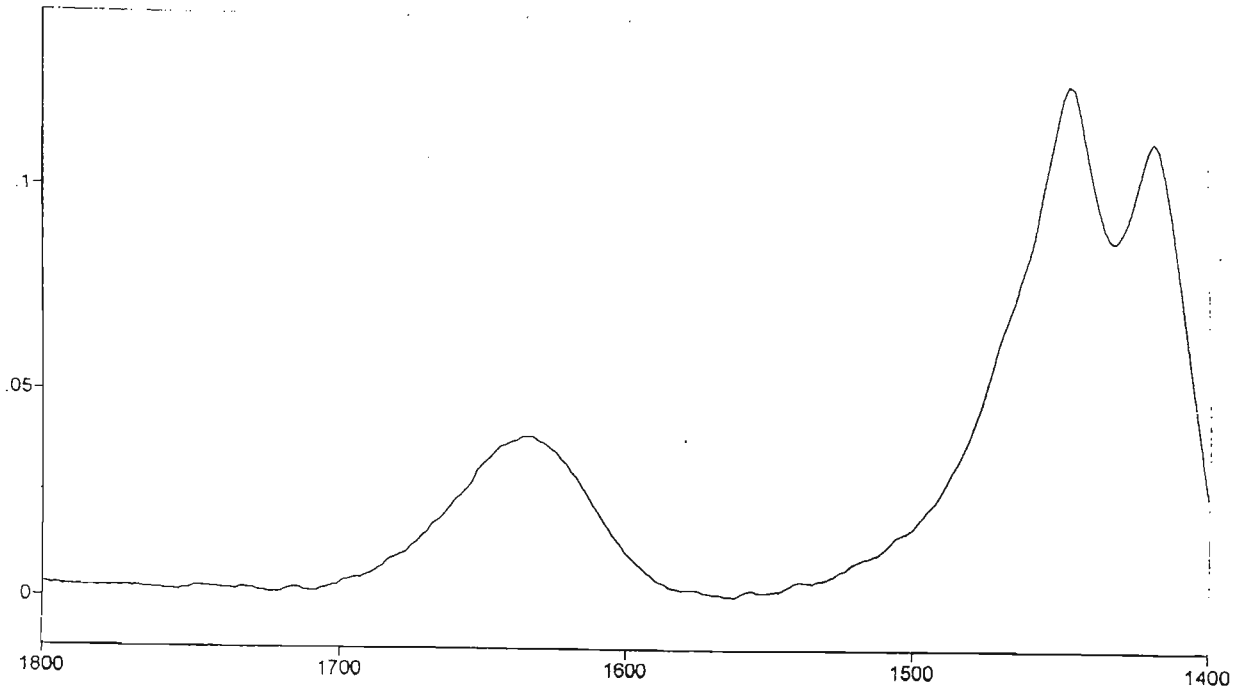

Figura 38. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *inositol-enzima* na concentração de 150mM congelados na velocidade *média*.

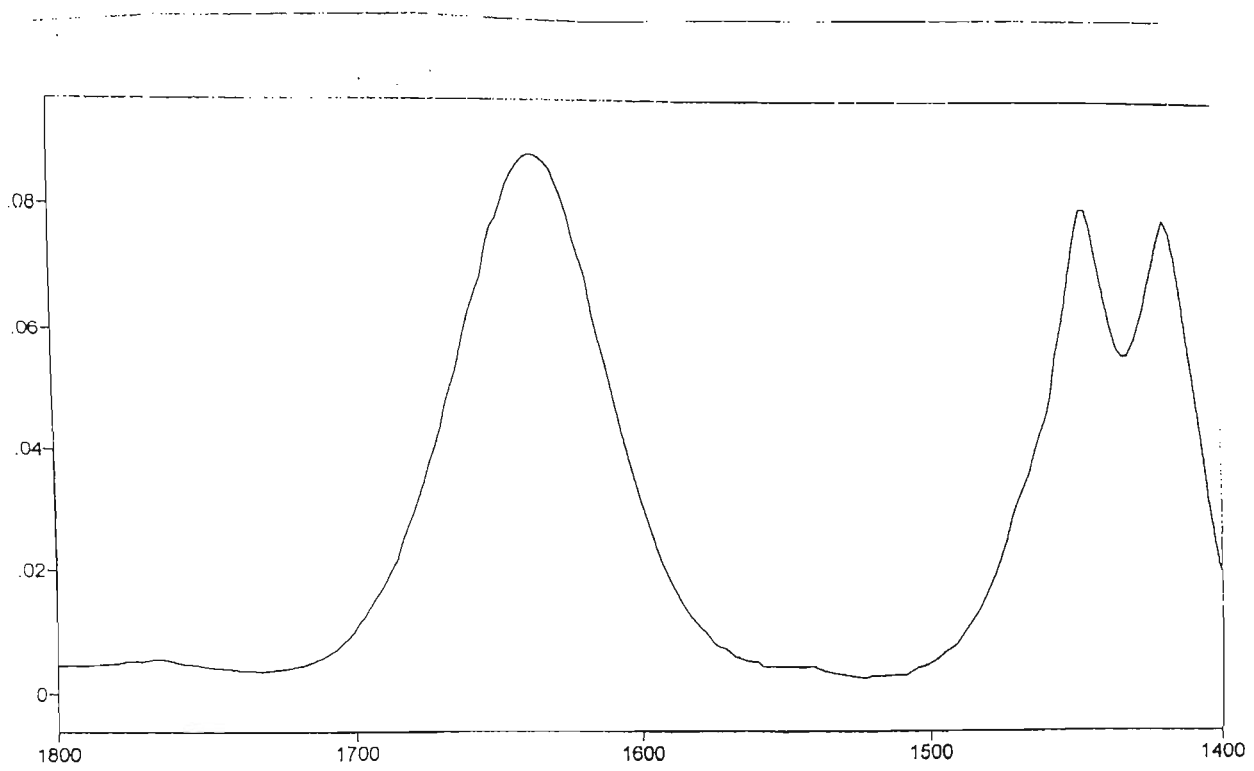

Figura 39. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *inositol-enzima* na concentração de 150mM congelados *rapidamente*.

Para os sistemas manitol-enzima na concentração 150mM, a faixa amido I apresentou o mesmo pico 1637 cm^{-1} tanto na velocidade média (Figura 40) como na velocidade rápida (Figura 41). Uma observação interessante nestes sistemas é que foram os únicos a apresentarem três picos na região 1500 e 1400 cm^{-1}, valores estes idênticos nos dois espectros: 1487 cm^{-1}, 1460 cm^{-1} e 1420 cm^{-1}. Como nesta região as ligações são mais fortes podemos supor que houve uma maior interação enzima-aditivo na presença de manitol. É importante ressaltar que estes sistemas apresentaram valores nulos de retenção de atividade

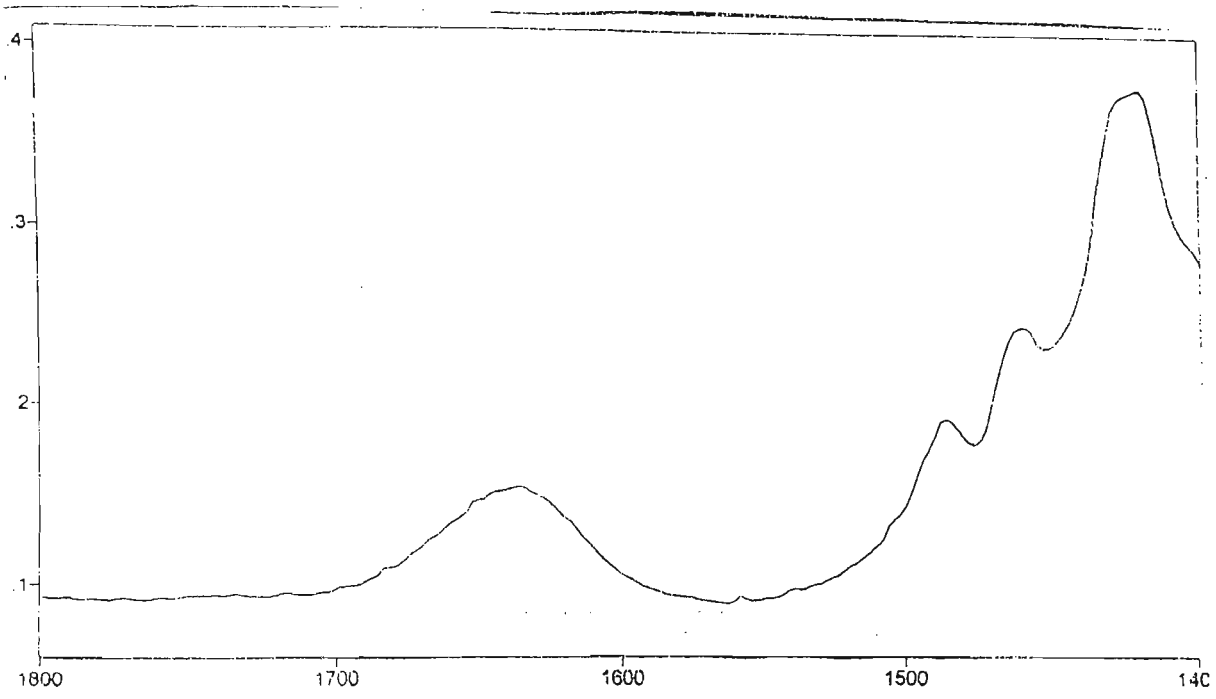

Figura 40. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *manitol-enzima* na concentração de 150mM congelados na velocidade ***média***.

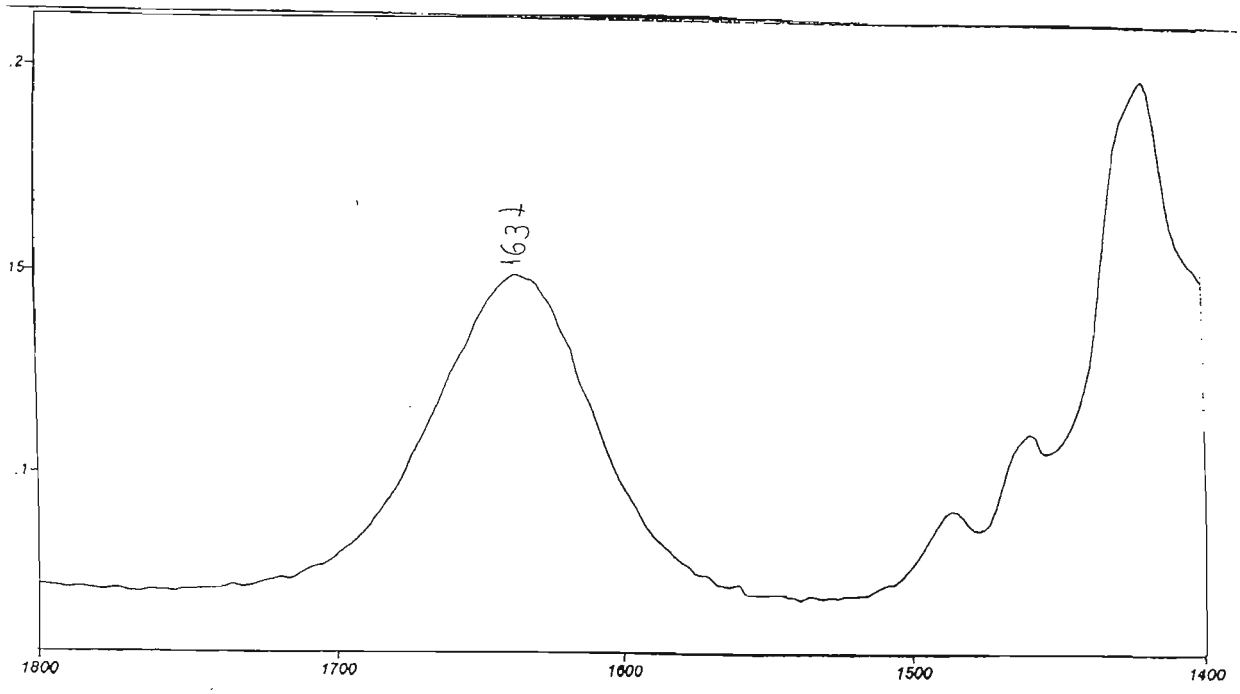

Figura 41. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *manitol-enzima* na concentração de 150mM congelados *rapidamente.*

Nos sistemas maltose-enzima foi possível observar espectros similares indepente da concentração utilizada, já que utilizamos uma amostra na concentração de 90mM (Figura 42) na tentativa de investigar qual seria a influência da concentração no espectro obtido. Porém o espectro para este sistema não apresentou picos bem definidos, o que ocorreu nos sistemas onde a concentração de maltose foi 150mM. Para este sistema foi obtida uma faixa amido I de 1638 cm^{-1} congelado lentamente (Figura 43), o mesmo acontecendo com a velocidade média (Figura 44).

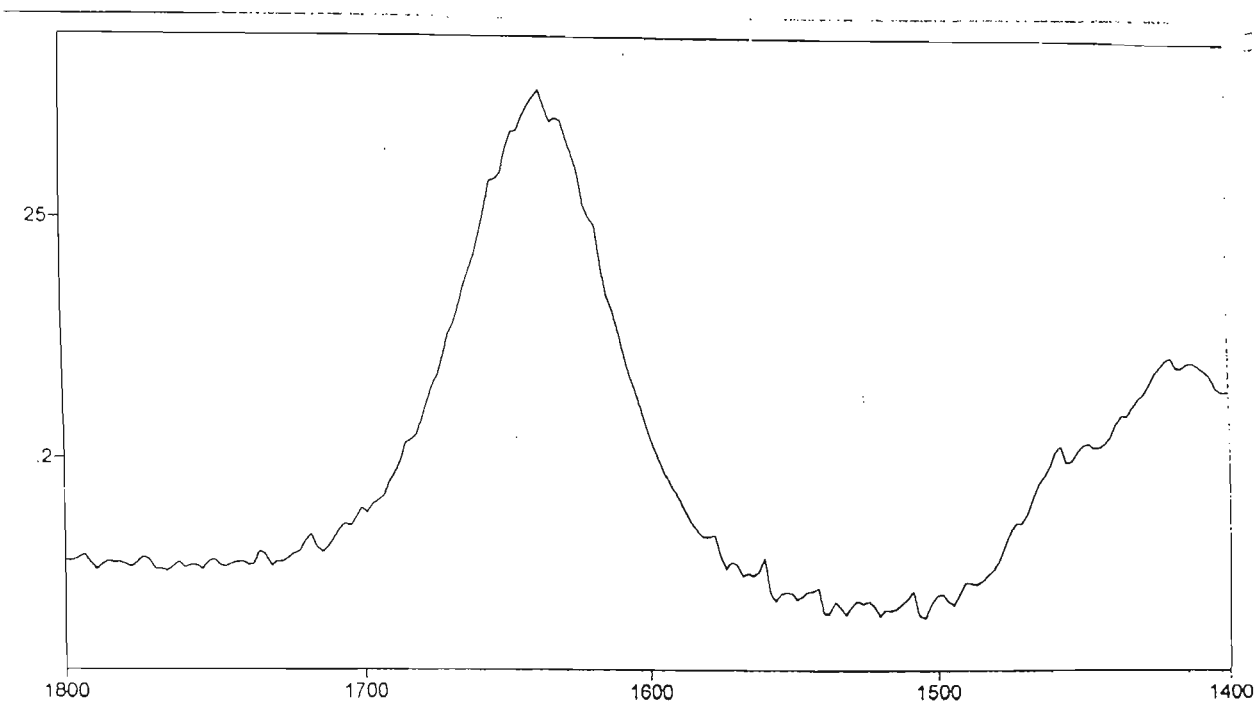

Figura 42. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *maltose-enzima* na concentração de 90 mM congelados *rapidamente*

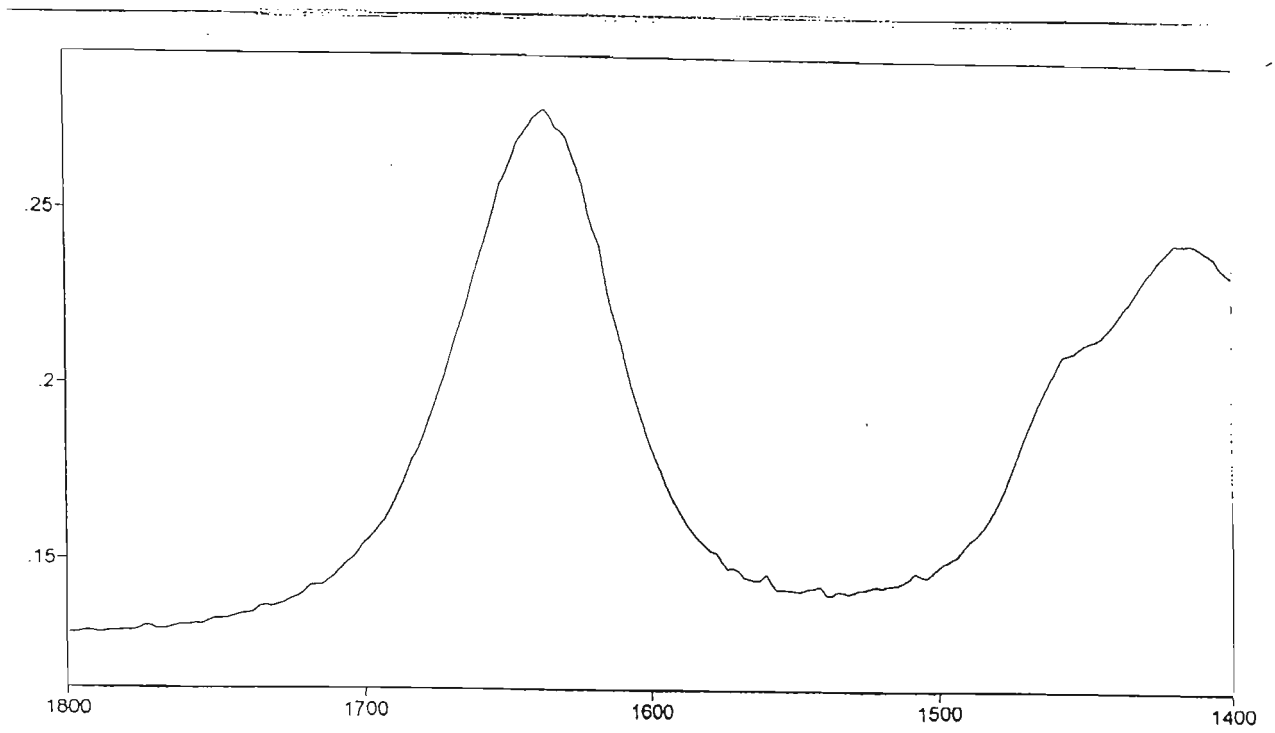

Figura 43. Espectro de infravermelho na região '*fingerprint*' dos sistemas *maltose-enzima* na concentração de 150mM congelados ***lentamente***.

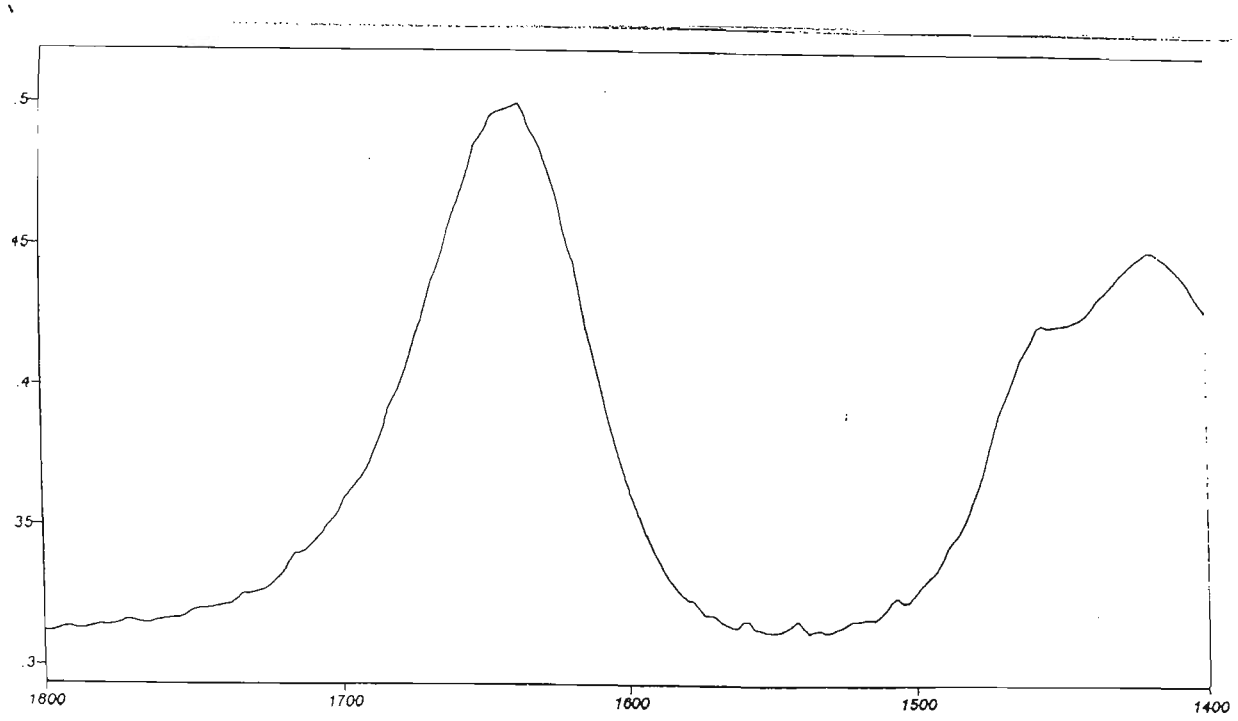

Figura 44. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *maltose-enzima* na concentração de 150mM congelados na velocidade ***média***.

Os únicos sistemas que apresentaram resultados distantes entre si foram lactose-enzima, quando congelados lentamente apresentaram uma faixa amido I (1643 cm^{-1}) (Figura 45) maior do que quando congelados na velocidade média (1639 cm^{-1}) (Figura 46). Além de apresentar diferenças na quantidade de picos registrados na faixa 1500 a 1400 cm^{-1}. Podemos dizer que neste caso, a velocidade de congelamento tem uma influência significativa sobre as ligações que podem aparecer no espectro. Os picos registrados na faixa 1500 a 1400 cm^{-1} não estão bem definidos, o que pode significar que estas ligações sejam mais frágeis do que nos outros sistemas estudados.

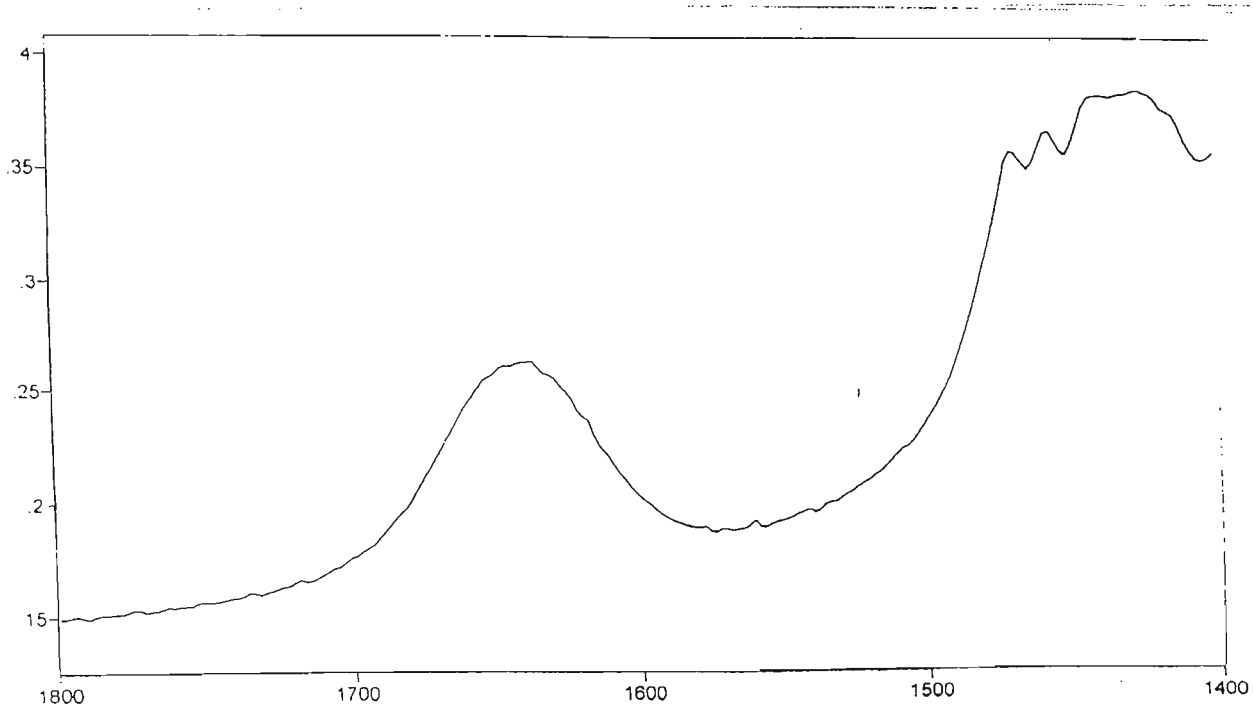

Figura 45. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *lactose-enzima* na concentração de 150mM congelados *lentamente*.

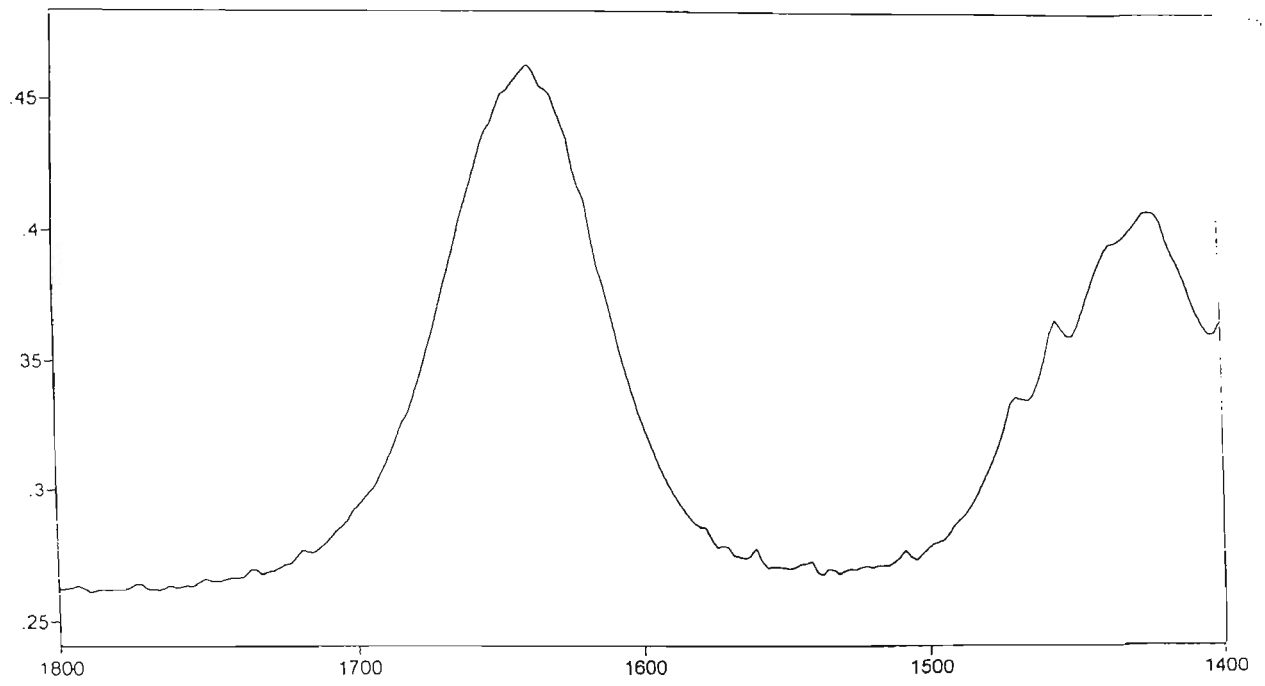

Figura 46. Espectro de infravermelho na região *'fingerprint'* dos sistemas *lactose-enzima* na concentração de 150mM congelados na velocidade ***média***.

Os picos obtidos nos espectros IV sugerem um possível hidrogênio ligado a L-asparaginase caracterizando a interação entre a enzima e o aditivo. Apesar destes resultados ainda não é possível afirmar, com os espectros, se os efeitos protetores são somente devido à presença de água residual no produto seco ou devido a uma interação direta entre proteína e aditivo.

Uma observação interessante deve-se ao fato da semelhança dos espectros quando utilizou-se dissacarídeos e monossacarídeos como aditivos. No caso dos sistemas enzima-inositol e enzima-manitol, os espectros obtidos são muito semelhantes, onde aparece com maior definição a região entre 1500 a 1400 cm^{-1} , já

somente devido à presença de água residual no produto seco ou devido a uma interação direta entre proteína e aditivo.

Uma observação interessante deve-se ao fato da semelhança dos espectros quando utilizou-se dissacarídeos e monossacarídeos como aditivos. No caso dos sistemas enzima-inositol e enzima-manitol, os espectros obtidos são muito semelhantes, onde aparece com maior definição a região entre 1500 a 1400 cm^{-1} , já no caso dos sistemas com dissacarídeos esta região do espectro não fica tão definida quanto à faixa relacionada às ligações C=O, que apresenta maior definição nos sistemas que utilizamos a enzima ligada a estes dissacarídeos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para o sistema enzima-maltose 150 mM congelado rapidamente e liofilizado foram os mais satisfatórios em relação à retenção de atividade (111,11%). Este sistema também foi o que apresentou a maior valor de T_2 (81μs) nos resultados de RMN. Os sistemas enzima-trealose 90 e 150 mM congelados rapidamente e liofilizados também apresentaram retenção da atividade enzimática elevada, 89,93% e 79,74%, respectivamente.

No sistema enzima-trealose na concentração de 90mM, observou-se o menor valor de T_2 encontrado (0,44μs) nos espectros de RMN, o que pode significar que esta condição foi a que apresentou interação água-enzima-aditivo mais fortemente ligada e com isso apresentando baixa mobilidade.

Observou-se no caso dos sistemas enzima-manitol que os espectros de RMN apresentaram valores de T_2 bem diversificados dependendo da concentração e da velocidade de congelamento empregadas. Porém, um fato interessante foi que tanto nos sistemas congelados na velocidade rápida quanto na velocidade média, a retenção da atividade foi nula. Somente nos sistemas congelados lentamente observou-se uma pequena retenção de atividade ligada diretamente à concentração, isto é, quanto maior a concentração maior a retenção de atividade.

No caso dos sistemas enzima-inositol houve um aumento do valor de T_2 proporcional tanto ao aumento da velocidade de congelamento quanto ao aumento da concentração. E apesar de apresentarem baixas retenção de atividade, nenhum destes sistemas apresentou retenção nula.

Quando estudaram-se os sistemas célula-sacarose foi observado nos sistemas congelados rapidamente e liofilizados, onde a concentração de sacarose foi de 150-mM, que houve um aumento da retenção de atividade (100%), com relação à amostra

congelada rapidamente e que não foi liofilizado (3,16%). Para estes sistemas os resultados de RMN foram diferentes para cada condição, sendo o maior valor de T_2 obtido nos sistemas congelados lentamente e na concentração de 150mM (26,4μs).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, J.M., KAREL, M. – Conservation of Biological materials under, Critical review in food Science and Nutrition, 37(3), 287-309, 1997.

AKAHANE, T.; TSUCHIYA, T. & MATSUMOTO, J. J. - Freeze denaturation of carp myosin and its prevention by sodium glutamate. Cryobiology, 18: 426-435, 1981.

American Public Health Association. - Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. American Public Health Assoc., Washington, DC, 1978.

ARAKAWA, T., KITA, Y., CARPENTER, J.F. - Protein solvent interactions in pharmaceutical formulations. Pharm. Res., 8:285-291, 1991.

ARAKAWA, T., PRESTRELSKI, S.J., KENNEY, W.C., CARPENTER, J.F. - Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. Adv. Drug. Del. Rev., 10, 1-28, 1993.

BELTON, P.S. – NMR in heterogeneous sistems, In Magnetic Resonance in Food Science, Delgadillo, I., Gil, A, M., Webb, G.A. (eds), The Royal Society of Chemistry, London, 18-32, 1995.

BLOCH, R., HANSEN, W.W., PACKARD, M. – Nuclear Induction, Phys. Ver., 69, 127, 1946.

BOOS, W., EHMANN, V., FORK, H., KLEIN, W., RIMMELE, M., POSTMA, P. - Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 172(6), 3450-3461, 1990.

BREDA, M., VITOLO, M., DURANTI, M.A., PITOMBO, R.M.N. - Effect of freezing-thawing on the invertase activity. Cryobiology., New York, v. 29, p. 281-290, 1992.

BREDA, M., VITOLO, M., PITOMBO, R.N.M., DURANTI, M.A. - Effect of freezing-drying on invertase activity. Lebsm. - Wiss. V - Technol, Zurich, v. 24, p. 571-572, 1991.

BROOME, J.D. – L-asparaginase: discovery and developmente as a tumor-inhibitory agent, Cancer Treat. Rep., 72, 248-254, 1981.

CARPENTER, J.F., CROWE, J.H. - The mecanism of protection of proteins by solutes. Cryobiology, 25, 244-255, 1988.

CARPENTER, J.F., CROWE, J.H. - An infrared spectroscopic study of interactions of carbohydrates with dried protein. Biochemistry, 28, 3916-3922, 1989.

CARPENTER, J.F., CROWE, J.H., ARAKAWA, T. – Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states, J. Dairy Science, 73, 3627-3636, 1990.

CARPENTER, J.F., PRESTRELSKI, S.J., ARAKAWA, T. - Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilisation, I: enzyme activity and calorimetric studies. Arch. Biochem. Biophys., 303, 456-464, 1993.

COOKE, R., KUNTZ, I.D. - Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 3, 95, 1974.

CROWE, J.H., CARPENTER, J.F., CROWE, L.M., ANCHORDOGUY, T.J. - Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilising solutes with biomolecules. Cryobiology, 27, 219-231, 1990.

CROWE, J.H., CROWE, L.M., CARPENTER, J.F., AURELL-WISTROM, C. - Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. Biochem. J., 242, 1-10, 1987.

CROWE, J.H., CROWE, L.M., CHAPMAN, D. - Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. Science, 223, 701-703, 1984.

DROST-HANSEN - W. structure of water near solid interfaces. Ind. Eng. Chem., 61(11):10, 1969.

FENNEMA, O. - Water and protein hydration. In: Whitaker, J.R., and Tannebaum, S.R., ed. Food Proteins. Avi Publishing Co., Westport, CT, 1976.

FORD, A.W., DAWSON, P.J. - The effect of carbohydrate additives in the freeze-drying of alkaline phosphatase. J. Pharm. Pharmacol., 45:86-93, 1993.

FRANKS, F. – Hidration Phenomena: Na update and implication for the food process industry, In Water relationships in foods. Plenum Press, New York, 1-19, 1991.

FULLERTON, G. D., ORD, V. A., CAMERON, I. L. – An evaluation of the hydration of lysozyme by an NMR titration. Biochem. Biophys. Acta, 869, 230-246, 1986.

GATLIN, L., DELUKA, P.P. - A study of phase transitions in frozen antibiotic solutions by differential scanning calorimetry. J. Parenter. Drug Assoc., 34: 398-408, 1980.

HANSON, M.A., ROUAN, S.K.E. - Introduction to formulation of protein pharmaceuticals. In T.J. Ahern and M.C. Manning (eds.). Stability of Protein Pharmaceutics, Part B, Plenum Press, New York, pp. 209-233, 1992.

HELLMAN, K., MILLER, D.S., CAMMACK, K.A. - Effect of freeze-drying on the quaternary structure of L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. Biochim. Biophys. Acta, 749, 133-142, 1983.

HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B. – Spectroscopy Methods in Organic Chemistry, Stuttgart: New York: Thieme, 29-70, 1997.

IZUTSU, K., YOSHIOKA, S., TERAO, T. - Decreased protein-stabilising effects of cryoprotectants due to crystallisation. Pharm. Res., 10, 1232-1237, 1993a.

IZUTSU, K., YOSHIOKA, S., TERAO, T. - Stabilization of β-galactosidase by amphiphilic additives during freeze-drying. Int. J. Pharm., 90, 187-194, 1993b.

KUNTZ, I.D., BRASSFIELD, T.S., LAW, G.D., PURCELL, G.V. - Science, 163, 1329, 1969.

KUNTZ, I.D., KAUZMAN, W. - Adv. Protein Chem., 28, 239, 1974.

LESLIE, S.B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J.H., CROWE, L.M. – Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3592-3597, 1995.

LEUNG, H.K., STEINBERG, M.P. - Water binding of food constituents as determined NMR, freezing, sorption, and dehydration. J.Food Sci., 44:1212, 1979.

LABUZA, T.P. - The properties of water in relationship to water binding in foods: a review. J. Food Proc. Pres., 1:167, 1977.

MANNING, M.C., PATEL, K., BORCHARDT, R.T. - Stability of protein pharmaceutics. Pharm. Res., 6:903-918, 1989.

MARLBOROUGH, D.I., MILLER, D.S. & CAMMACK, K.A. - Comparative study on conformational stability and subunit interactions of two bacterial asparaginases. *Biochim Biophys Acta.* 386, 576-589, 1975.

PIKAL, M.J. - Freeze-drying of proteins, part I: process design. BioPharm, 3, 18-27, 1990a.

PIKAL, M.J. - Freeze-drying of proteins, part II: formulation selection. BioPharm, 3, 26-30, 1990b.

PIKAL, M.J., DELLERMAN, K.M., ROY, M.L., RIGGIN, R.M. - The effects of formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone. Pharm. Res., 8, 427-436, 1991.

PRESTRELSKI, S.J., ARAKAWA, T., CARPENTER, J.F. - Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilisation II: structural studies using infrared spectroscopy. Arch. Biochem. Byophys. 303, 465-473, 1993a.

PRESTRELSKI, S.J., TEDESCHI, N., ARAKAWA, T., CARPENTER, J.F. - Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilisers. Biophys. J., 65, 661-671, 1993b.

PITOMBO, R.N.M., SPRING, C., PASSOS, R.F., TONATO, M. & VITOLO, M. - Effect of moisture content on the invertase activity of freeze-dried S. cerevisae, Cryobiology, v. 31, p. 383-392, New York, 1994.

PITOMBO, R.N.M. – A liofilização como técnica de conservação de material de pesquisa, Ciência e cultura, 41(5), 427-431, 1989.

RAVINDRANATH, Y., ABELLA, E., KRISCHER, J.P., WILEY, J., INOUE, S., HARRIS, M., CHAUVENET, H., ALVARADO, C.S., DUBOWY, R., RITCHEY, A,K., LAND, V., STUEBER, C.P., WEINSTEIN, H. – Acute myeloid leukemia (AML) in Down's syndrome is highly responsive to chemotherapy: experience on Pediatric Oncology Group AML Study 8498, Blood 80, 2210-2214, 1992.

RUAN, R. R., CHEN, P. L. – Nuclear magnetic resonance techniques. In: eds, A nuclear magnetic resonance approach, Lancaster: Technomic Publishing Co. Inc., 1-25, 1998.

STECHER, A., MORGANTETTI DE DEUS, P., POLIKARPOV, I. & ABRAHÃO- NETO, J. - Stability of L-asparaginase: an enzyme used in Leukemia treatment. Pharmaceutica Acta Helvetiae, Zurich, 1999.

SUSI, H. – Infrared Spectroscopy – Conformatiom, Methods in Enzymology, 26:455-473, 1993.

TORREY, H.C., POUND, R.V. – Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solid, Phys. Rev., 69, 37, 1946.

WADE, H.E., PHILLIPS, B.P. – Automated determination of bacterial asparaginase and glutaminase, Anal. Biochem., 44, 189-199, 1971.

WARD, K. R., ADAMS, G. D. J., ALPAR, IRWIN, W. J. – Protection of the enzyme L-asparaginase during lyophilisation – a molecular modeling approach to predict required level of lyoptotectant. International J. of Pharmaceutics, 187, 153-162, 1999.

WRISTON, J.C. – Asparaginase- methods in enzymology, vol 113, 608-611, 1985.