

ESTUDO DO CONTROLE DE QUALIDADE DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
L-ASPARAGINASE POR *ZYMOMONAS MOBILIS*

Ana Karla de Souza Abud

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Aprovada por:

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

Prof. Príamo Albuquerque Melo Júnior, D.Sc.

Prof. Márcio Nele de Souza, D.Sc.

Prof^a. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, D.Sc.

Dr^a. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

NOVEMBRO DE 2005

ABUD, ANA KARLA DE SOUZA

Estudo do controle de Qualidade da Produção de L-Asparaginase por *ZYMOMONAS MOBILIS* [Rio de Janeiro] 2005

XVII, 220 p. 29,7 cm (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Química, 2005)

Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE

1. Qualidade de um Bioprocesso

I. COPPE/UFRJ II. Título (série)

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

ESTUDO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE POR *ZYMOMONAS MOBILIS*

Ana Karla de Souza Abud

Novembro/2005

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto.

Programa: Engenharia Química

Este trabalho analisa a reprodutibilidade da produção de L-asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis* em processos de fermentação em batelada. Para isto, é realizada uma análise crítica de todas as variáveis que podem exercer influência na variabilidade do bioprocessos, como os equipamentos e materiais utilizados, condições de operação e condição celular. Além disto, desenvolve-se também um modelo cinético para descrever o processo de produção de forma a otimizar a síntese de produção da enzima L-asparaginase. Os estudos de modelagem confirmaram a alta afinidade da bactéria pelo substrato L-asparagina, como indicado pela constante cinética de Michaelis-Menten. Mostra-se que a glicose e a peptona são as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a produção da enzima. Estudos de permeabilização e eletroforese são apresentados para confirmar a liberação da enzima do periplasma da célula. Os resultados experimentais observados mostram a não influência da agitação sobre a produção da enzima e corroboram a necessidade de um controle contínuo da qualidade de um bioprocessos.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

QUALITY CONTROL OF THE L-ASPARAGINASE PRODUCTION BY *ZYMONOMAS MOBILIS*

Ana Karla de Souza Abud

November/2005

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

This work analyzes the reproducibility of the L-asparaginase production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation processes. First, a critical analysis is performed for all process variables that can exert influence on the process variability, such as the equipment and materials, process operation conditions and cell conditions. Then experiments are performed and a kinetic model is developed to describe the process operation, in order to allow the optimization of the L-asparaginase production. Modeling studies show the high affinity of the bacteria for the L-asparagine substrate, as indicated by the Michaelis-Menten equilibrium constant. Besides, it is shown that glucose and peptone are the best carbon and nitrogen sources for enzyme production. Permeabilization and electrophoresis studies confirm that the L-asparaginase is present at the cell periplasm. Finally, experimental results indicate that the enzyme production is not influenced by the agitation levels and that the continuous quality control is of fundamental importance for guaranteeing the good performance of the bioprocess.

Viste como ergueram aquele edifício de grandeza imponente?

- Um tijolo, e outro. Milhares. Mas um a um.

- E sacos de cimento, um a um. E blocos de pedra, que pouco representam na mole do conjunto.

- E pedaços de ferro.

- E operários que trabalham, dia a dia, as mesmas horas. . .

Viste como levantaram aquele edifício de grandeza imponente?... À força de pequenas coisas!

(Josemaria Escrivá)

AGRADECIMENTOS

Gostaria inicialmente de agradecer a Deus, pela vida e pela coragem de superar as barreiras, possibilitando estar concluindo mais esta etapa em minha vida.

Agradeço a minha família, por todos os momentos vividos e palavras de encorajamento, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Agradeço, também, aos meus queridos irmãos de coração, Sílvia França e Antônio Martins que, longe ou perto, tanto me incentivaram com suas palavras amigas de força e de perseverança nos momentos difíceis.

Agradeço ao Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ, à CAPES e aos meus orientadores Tito Lívio e José Carlos Pinto, por acreditarem em meu trabalho, pela oportunidade, compreensão e auxílio prestados.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos e do LMSCP, tanto aos que já se foram quanto aos que ainda estão aqui, o meu sincero obrigado pelo convívio, ajuda e troca de idéias. Um sincero e especial obrigado às amigadas construídas: Alexandre, Sílvia e Fabrício, Marcelo Lenzi, Roberto Bentes e Helen, Rossano, Kátia, Lívia, Fabiane, Herval, Patrícia, Jackson, Amaro e Fabiano. A companhia de vocês, as palavras de apoio e a ajuda ao longo do trabalho estarão sempre em minha lembrança.

Ao NUCAT, ao PAM, ao LECC, ao Laboratório de Processos Enzimáticos e ao Laboratório de Poluição meu sincero obrigado por permitir usar os muitos equipamentos e materiais sempre que precisei.

Agradeço ao Irapuan pelas informações e troca de idéias sobre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a enzima asparaginase.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	07
2.1 O Câncer	07
2.2 A Enzima L-asparaginase	08
2.2.1 Histórico	08
2.2.2 Síntese	13
2.2.3 Atividade	14
2.2.4 Asparaginases Bacterianas	15
2.2.5 Asparaginases em Leveduras	20
2.2.6 Asparaginases em Células Vegetais	23
2.3 A Bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	25
2.4 Permeabilização de Células	33
2.5 Eletroforese de Proteínas	35
2.6 Controle de Qualidade no Laboratório de Biotecnologia	36
2.7 Ferramentas Estatísticas	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	56
3.1 Microrganismo e Composição do Meio	56
3.2 Cultivo	57
3.3 Metodologia Analítica	58
3.3.1 Concentração Celular	59
3.3.2 Concentração de Glicose	60
3.3.3 Concentração de L-asparagina e L-aspartato	61
3.3.4 Concentração de Etanol	62
3.3.5 Atividade de L-asparaginase	62
3.3.6 Concentração de Proteínas	63

3.3.7	Permeabilização de Células.....	64
3.3.7.1	Rompimento celular com lisozima.....	64
3.3.7.2	Permeabilização com CTAB e EDTA.....	65
3.3.7.3	Permeabilização com lisozima	65
3.3.7.4	Choque osmótico	65
3.3.8	Eletroforese de Proteínas	66
3.3.9	Determinação de μ e dos rendimentos Y_{xs} e Y_{ux}	67
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Manuseio da Bactéria	68
4.2	Influência do Tamanho do Inóculo.....	70
4.3	Padronização da Metodologia de Análise de Atividade.....	72
4.4	Determinação Simultânea de Asparagina e Aspartato	72
4.5	Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Asparaginase.....	79
4.6	Variação da Concentração da Fonte de Carbono	81
4.7	Influência da Glicose na Produção da Enzima	82
4.8	Avaliação da Reprodutibilidade dos Experimentos	84
4.9	Avaliação do Erro nos Instrumentos de Análise	95
4.9.1	Balança analítica.....	95
4.9.2	Medidor de pH.....	99
4.9.3	Medição de volume com pipeta volumétrica.....	100
4.9.4	Espectrofotômetro	104
4.9.5	Cromatógrafo gasoso.....	107
4.10	Avaliação da Repetitividade nas Metodologias Analíticas	109
4.11	Estudo sobre a Variabilidade nas Etapas do Processo Fermentativo	119
4.11.1	Análise do Preparo do Meio de Cultivo	120
4.11.2	Análise da Etapa de Inoculação.....	120
4.11.3	Análise da Medida de Atividade em Amostras	124
4.11.4	Análise da Influência da Massa de Células sobre a Medida de Atividade	132
4.11.5	Análise do efeito da Concentração de Asparagina sobre a Atividade da Amostra	136

4.12	Influência da Agitação no Comportamento Cinético de <i>Zymomonas mobilis</i>	138
4.13	Investigação das Melhores Fontes de Carbono e de Nitrogênio na Síntese da Enzima Asparaginase pela Bactéria <i>Z. mobilis</i>	140
4.14	Estratégia de Otimização da Síntese de Asparaginase pela Bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	147
4.15	Avaliação da Estabilidade de Asparaginase nas Células de <i>Zymomonas mobilis</i>	154
4.16	Avaliação da Influência do pH na Atividade de <i>Zymomonas mobilis</i>	158
4.17	Padronização das Etapas do Processo na Produção de Asparaginase por Células de <i>Zymomonas mobilis</i>	160
4.18	Modelagem do Comportamento Cinético de <i>Zymomonas mobilis</i>	168
4.19	Testes de Permeabilização para Extração da Asparaginase da Bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	174
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	185
6	PROTOCOLO DE QUALIDADE	188
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	208

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Preparações de asparaginases de uso terapêutico (Muller e Boos, 1999).	12
Tabela 2.2 – Propriedades químicas e farmacológicas das asparaginases terapêuticas (Kurtzberg, 2000; Muller e Boos, 1999).	12
Tabela 2.3 – Valores máximos do coeficiente de variação em função da concentração para garantir um processo analítico estável (Leite, 1996).	45
Tabela 2.4 – Benefícios que a normalização permite.	51
Tabela 3.1 – Composição do meio sintético de crescimento.	57
Tabela 4.1 – Comportamento das principais variáveis do processo de fermentação a 10 g/L de glicose frente a diferentes percentuais de inóculo.	71
Tabela 4.2 – Influência do tampão na atividade de asparaginase.	72
Tabela 4.3 – Sistema de equações da curva de calibração e incertezas para a determinação simultânea de asparagina e aspartato.	79
Tabela 4.4 - Principais variáveis do crescimento de <i>Z. mobilis</i> em meio mínimo utilizando diferentes fontes de nitrogênio em comparação com o cultivo da bactéria em meio rico.	80
Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos para o crescimento de <i>Z. mobilis</i> frente a diferentes concentrações de glicose na fermentação e inóculo com 10 g/L de glicose.	81
Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos para o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a diferentes concentrações de glicose com etapas de inóculo e fermentação com mesma quantidade de substrato.	82
Tabela 4.7 - Avaliação da incerteza associada à massa na balança analítica Explorer OHAUS de 3 casas decimais.	97

Tabela 4.8 - Avaliação da incerteza associada à massa na balança Mettler AE260 de 4 casas decimais.	98
Tabela 4.9 – Análise do teste F para a balança analítica.	99
Tabela 4.10 - Avaliação da incerteza associada ao pHmetro Mettler MP220.	99
Tabela 4.11 – Especificações técnicas das pipetas Eppendorf fornecidas pelo fabricante.	101
Tabela 4.12 – Avaliação da conformidade da pipeta automática de 2 – 20 μL .	101
Tabela 4.13 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 20 – 200 μL .	102
Tabela 4.14 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 100 – 1000 μL .	103
Tabela 4.15 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 500 – 5000 μL .	103
Tabela 4.16 – Análise do teste F para as pipetas automáticas.	104
Tabela 4.17 – Avaliação das medidas realizadas em espectrofotômetro Spectronic 20D ⁺ .	105
Tabela 4.18 – Avaliação da reprodutibilidade da curva de calibração de sulfato de amônia.	106
Tabela 4.19 - Avaliação da reprodutibilidade da curva de calibração de etanol no cromatógrafo CG.	108
Tabela 4.20 – Características da repetitividade das análises ao longo do cultivo.	110
Tabela 4.21 – Análise das variâncias após 1 mês em geladeira.	114
Tabela 4.22 – Análise das variâncias após 1 mês em congelador.	116

Tabela 4.23 – Concentrações médias das amostras ao longo do cultivo, no instante de coleta (0) e após 1 mês de armazenamento em geladeira (gel) e congelador (cong).	116
Tabela 4.24 – Variação da amplitude das amostras ao longo do cultivo, no instante de coleta (0) e após 1 mês de armazenamento em geladeira (gel) e congelador (cong).	116
Tabela 4.25 – Coeficiente de variação das amostras ao longo do cultivo, no instante de coleta (0) e após 1 mês de armazenamento em geladeira (gel) e congelador (cong).	117
Tabela 4.26 - Intervalo de medida para a amostra analisada no instante de coleta (μ_0) e após 1 mês de acondicionamento em geladeira (μ_{Gel}) e em congelador (μ_{Cong})	118
Tabela 4.27 – Influência do tempo e temperatura na atividade de asparaginase.	119
Tabela 4.28 – Histórico dos valores de absorbância em cada etapa de inóculo e da taxa específica de crescimento na fermentação.	122
Tabela 4.29 – Atividade e atividade específica da enzima asparaginase em diferentes condições de volume de meio centrifugado e tempo de reação a 37°C.	124
Tabela 4.30 – Determinações sucessivas de atividade e atividade específica em diferentes volumes de meio de cultivo para a reação por 30 min a 37°C.	127
Tabela 4.31 - Determinações da atividade e atividade específica em pequenos tempos de reação e diferentes volumes de meio de cultivo.	129
Tabela 4.32 - Determinações da atividade e atividade específica em relação a diferentes tempos de reação e volumes de meio de cultivo empregados.	131
Tabela 4.33 – Determinação da atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> em meio mínimo.	133

Tabela 4.34 – Determinação da atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> em meio rico.	134
Tabela 4.35 – Influência da concentração de asparagina na reação de determinação da atividade de asparaginase.	138
Tabela 4.36 – Atividade e atividade específica da asparaginase em cultivos de <i>Zymomonas</i> com e sem agitação.	139
Tabela 4.37 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação das diferentes fontes de carbono na produção de asparaginase por <i>Zymomonas mobilis</i> .	141
Tabela 4.38 - Atividade e atividade específica frente a diferentes fontes de carbono.	142
Tabela 4.39 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação das diferentes fontes de nitrogênio na produção de asparaginase por <i>Zymomonas mobilis</i> .	144
Tabela 4.40 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação da produção de asparaginase por <i>Zymomonas mobilis</i> , quando asparaginase é adicionada à peptona.	146
Tabela 4.41 – Influência da concentração de asparagina na reação de determinação da atividade de asparaginase.	146
Tabela 4.42 – Condições do plano fatorial a 2 níveis para avaliação das melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio.	147
Tabela 4.43 – Valores cinéticos do cultivo de <i>Z. mobilis</i> nas diferentes concentrações de glicose e de peptona estudadas.	147
Tabela 4.44 – Valores cinéticos do cultivo de <i>Z. mobilis</i> na otimização do planejamento.	152
Tabela 4.45 - Comparativo entre os valores máximos preditos pelo modelo e os valores experimentais da atividade e atividade específica em 9 horas de cultivo	152
Tabela 4.46 – Cinética fermentativa do cultivo de <i>Zymomonas</i> em peptona e glicose.	154

Tabela 4.47 – Atividade e atividade específica em função do tempo e temperatura de armazenamento	155
Tabela 4.48 – Atividade e atividade específica em função do tempo e temperatura de armazenamento.	159
Tabela 4.49 – Média da atividade e atividade específica na fase exponencial de cultivo.	161
Tabela 4.50 – Valores dos parâmetros do modelo cinético para o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> em meio sintético com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.	171
Tabela 4.51 - Parâmetros cinéticos ajustados para o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a diferentes concentrações de glicose e asparagina como fonte de nitrogênio.	172
Tabela 4.52 - Parâmetros cinéticos ajustados para o crescimento de <i>Zymomonas mobilis</i> frente a diferentes concentrações de glicose e peptona como fonte de nitrogênio.	173
Tabela 4.53 – Testes iniciais de permeabilização em amostras de <i>Z. mobilis</i> .	175
Tabela 4.54 - Testes permeabilização com CTAB, lisozima e choque osmótico em amostras de <i>Z. mobilis</i> .	175
Tabela 4.55 - Testes permeabilização com CTAB e lisozima em amostras de <i>Z. mobilis</i> .	176
Tabela 4.56 – Valores de proteína, atividade e atividade específica no sobrenadante permeabilizado.	180
Tabela 4.57 - Valores da concentração de proteína, atividade e atividade específica no sobrenadante em diferentes tempos de permeabilização com CTAB em tampão fosfato a pH 9,0.	181
Tabela 4.58 – Influência do tipo de tampão fosfato na permeabilização das células de <i>Z. mobilis</i> .	181

Tabela 4.59 – Influência de uma etapa inicial de contato das células com tampão fosfato de sódio na permeabilização com CTAB.	183
Tabela 6.1 – Interpretação em português para os “5S”	191

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 2.1 – Mecanismo de ação da L-asparaginase (Muller e Boos, 1998). 10
- Figura 2.2 – Estrutura do tetrâmero de L-asparagina (PDB IB codificação 3eca) desenhada com MOLSCRIPT. Os monômeros são codificados em cores. Os produtos da reação, os aspartatos, são ligados ao centro ativo da enzima pelos modelos em bolas (Stecher et al., 1999). 16
- Figura 2.3 – Modelo da estrutura terciária da asparaginase-glutaminase (EC 3.5.1.38) de *Acinetobacter glutaminasificans*, obtida a partir do Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P10172>). 19
- Figura 2.4 – Asparaginases bacterianas. Ramo laranja, asparaginase tipo I; ramo azul, asparaginase tipo II. Letra azul, seqüências altamente homólogas às asparaginases EC-2; letra marrom, seqüências altamente homólogas às asparaginases EC-1; letra verde, seqüências altamente homólogas às lisofosfolipases. Caixa amarela, subunidade de Glu-AdT amidotransferase; caixa verde, lisofosfolipases; caixa laranja, forma dimérica ativa de EC-1; caixa azul, asparaginase tetramérica bacteriana tipo II com atividade antitumoral. A terminação *gi* indica as únicas seqüências identificadas do NCBI (Borek e Jaskólski, 2001) 21
- Figura 2.5 – Asparaginases de células vegetais. Ramo violeta, aspartilglicosaminidases; ramo amarelo, asparaginases de células vegetais predominantemente arquegoniadas; ramo marrom, seqüências eucarióticas com homologia às asparaginases vegetais de características bioquímicas desconhecidas; ramo verde, asparaginases vegetais caracterizadas bioquimicamente (caixa verde) e seus homólogos em outros organismos. Caixa rosa, aspartilglicosaminidases bioquimicamente caracterizadas; caixa amarela, o produto do gene *ybiK* de *E. coli* com atividade asparaginásica (Borek e Jaskólski, 2001). 24
- Figura 2.6 – Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis* (Sprenger, 1996) 28

- Figura 2.7 – Apresentação esquemática do envelope celular da bactéria Gram-negativa. A – membrana externa; BP – ligação protéica; C – proteína embutida na membrana citoplasmática; LP – lipoproteína; LPS – lipopolissacarídeo; PP – porina; PPS – espaço periplásmico (Sikkema *et al.*, 1995). 33
- Figura 2.8 – Esquema do princípio eletroforético (Manual de Eletroforese de Proteínas da Amersham Biosciences). 36
- Figura 2.9 – Gráficos típicos de controle de qualidade microbiano. No topo (2.3 a), um processo dentro da faixa de controle. No meio (2.3 b), processo sem controle, freqüentemente excedendo os limites permitidos. Na base (2.3 c), um processo com uma análise fora do limite de controle e sem explicação aparente. LC significa o limite de controle para as medições ($\bar{x} \pm 2\sigma$) e \bar{x} a média das medidas. 39
- Figura 2.10 – Etapas básicas para o cálculo da medida da incerteza abordada pela ISO (Maroto *et al.*, 1999). 49
- Figura 3.1 – Esquema de preparo de inóculo e cultivo. 57
- Figura 3.2 – Meios rico e definido antes e após o crescimento celular. 58
- Figura 3.3 – Células de *Zymomonas mobilis* ao final de um cultivo em meio rico. 58
- Figura 3.4 – Esquema de coleta e tratamento analítico das amostras. 59
- Figura 3.5 – Curva de calibração da concentração de células para o cultivo de *Z. mobilis*. 60
- Figura 3.6 – Curva de calibração da concentração de etanol. 62
- Figura 3.7 – Curva de calibração de sulfato de amônio. 63
- Figura 3.8 – Curva de calibração de proteínas, com BSA, pelo método de Bradford. 64
- Figura 4.1 - Comportamento cinético de um cultivo de *Z. mobilis* com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (♦ células, ○ glicose, □ asparagina ■ aspartato, ▲ atividade, △ pH e ▲ etanol). 69

- Figura 4.2 – Comportamento do crescimento celular de *Zymomonas mobilis* em diferentes tamanhos de inoculo (○ 10% de inóculo, ▲ 5% de inóculo e □ 2% de inóculo). 71
- Figura 4.3 – Espectro de absorção UV-visível do aminoácido puro (asparagina (0,5 g/L) ou aspartato (0,5 g/L)) e da mistura dos mesmos (0,25 g/L asparagina + 0,25 g/L aspartato) ao se fazer uma varredura na faixa de 300 a 700 nm para os componentes . 74
- Figura 4.4 – Reação de ninhidrina com diferentes concentrações de asparagina e aspartato. 74
- Figura 4.5 – Ajuste da função linear da curva de calibração para cada comprimento de onda analisado. 76
- Figura 4.6 – Ilustração do desempenho analítico a partir da análise de varredura das amostras em espectrofotômetro UV1240. 78
- Figuras 4.7a e b – Perfis de concentração de células de *Zymomonas mobilis* e da atividade de asparaginase a partir de diferentes fontes de nitrogênio (Δ sulfato de amônio, ◆ asparagina e □ aspartato). 80
- Figuras 4.8a e b – Perfis de concentração de células de *Zymomonas mobilis* e da atividade de asparaginase a partir de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (◊ glicose e asparagina, △ glicose e aspartato, □ asparagina e aspartato). 83
- Figura 4.9 – Avaliação da reprodutibilidade de 3 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 1g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina. 86
- Figura 4.10 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina. 87
- Figura 4.11 – Avaliação da reprodutibilidade de 4 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 10 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina. 88
- Figura 4.12 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 30 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina. 89

Figura 4.13 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios, com condição de inóculo diferente, no cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 10 g/L de glicose + 0,5 g/L de sulfato de amônio.	90
Figura 4.14 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 1g/L de glicose + 0,5 g/L de aspartato.	91
Figura 4.15 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 0,5 g/L de asparagina + 0,5 g/L de aspartato.	92
Figura 4.16 – Diagrama de causa e efeito para o processo de preparo de meio de cultivo.	93
Figura 4.17 – Diagrama de causa e efeito para o processo de preparo de inóculo.	94
Figura 4.18 – Diagrama de causa e efeito para o procedimento analítico.	94
Figura 4.19 - Curvas de calibração de sulfato de amônia para avaliação de reprodutibilidade.	107
Figura 4.20 – Curvas de calibração para a determinação da concentração de etanol.	108
Figura 4.21 - Comportamento cinético de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina para análise de repetitividade (♦ células, □ asparagina, Δ atividade, ● glicose, ■ aspartato, ▲ pH e ○ etanol).	109
Figura 4.22 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.	111
Figura 4.23 – Avaliação da repetitividade analítica em 21 horas de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.	112
Figura 4.24 – Avaliação da repetitividade analítica em 30 horas de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.	113
Figura 4.25 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de <i>Z. mobilis</i> com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e após 1 mês em geladeira.	114

- Figura 4.26 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e após 1 mês em congelador. 115
- Figura 4.27 - Intervalo de medida para a amostra analisada no instante de coleta (μ_0) e após 1 mês de acondicionamento em geladeira (μ_{Gel}) e em congelador (μ_{Cong}). 118
- Figura 4.28 - Esquema de preparo de inóculo. 121
- Figura 4.29 – Acompanhamento do crescimento celular em cultivo de *Zymomonas mobilis*, com inoculação de 5% (v/v) em cada etapa e sem (a) e com (b) acompanhamento da taxa de crescimento (\diamond pré inóculo, \square inóculo e \blacktriangle fermentação). 123
- Figura 4.30 – Comportamento da atividade e atividade específica em diferentes condições de ensaio. 126
- Figura 4.31 – Comportamento da atividade e atividade específica em diferentes volumes de meio de cultivo para a reação por 30 min a 37°C. 128
- Figura 4.32 - Comportamento das atividades e atividade específicas frente a pequenos tempos de reação e diferentes volumes de amostra centrifugados (\diamond 5 min ou 5 mL, \blacksquare 10 min ou 10 mL, Δ 15 min ou 20 mL, \circ 40 mL e \bullet 60 mL). 130
- Figura 4.33 - Atividades e atividades específicas em função de pequenos tempos de reação e diferentes volumes de amostra centrifugados (\diamond 5 min ou 5 mL, \blacksquare 10 min ou 10 mL, Δ 20 min ou 40 mL e \bullet 60 mL) 132
- Figura 4.34 - Atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio mínimo (\blacksquare 5 horas, Δ 8 horas e \diamond 10 horas). 133
- Figura 4.35 - Atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio rico (\blacktriangle 6 horas, \square 9 horas, \bullet 12 horas e Δ 15 horas). 135
- Figura 4.36 – Amostras de atividade em diferentes tempos de cultivo, variando-se o volume de cultura centrifugada para a reação. 136

- Figura 4.37 – Amostras de atividade em diferentes volumes de cultura centrifugada para a reação em 9 e em 15 horas de cultivo. 136
- Figura 4.38 – Perfil de concentração de células em cultivos de *Zymomonas mobilis* (▲ cultivo sem agitação e □ cultivo com agitação a 200 rpm). 139
- Figura 4.39 – Perfil de concentração celular da bactéria *Zymomonas mobilis* frente a diferentes fontes de carbono e os erros gerados a partir da reprodutibilidade dos experimentos (◇ glicose, ▲ ácido glicônico, ■ frutose e ○ sacarose). 141
- Figura 4.40 – Perfil do crescimento celular da bactéria *Zymomonas mobilis* frente a diferentes fontes de nitrogênio e as réplicas das principais fontes abordadas (◇ peptona, ◆ glutamina, ◆ asparagina, □ aspartato, ○ sulfato de amônio, ■ prolina, △ uréia, △ peptona + extrato de levedura). 143
- Figura 4.41 – Comportamento da atividade e da atividade específica no instante onde a taxa específica de crescimento é máxima. 151
- Figura 4.42 – Comportamento da atividade e da atividade específica em 9 horas de cultivo. 151
- Figura 4.43 – Comportamento da atividade e da atividade específica em 9 horas de cultivo após a otimização do modelo. 153
- Figura 4.44 – Comportamento da atividade e atividade específica em função do tempo e da temperatura de armazenamento (□ 27°C, ■ 4°C e □ -4°C). 156
- Figura 4.45 - Comportamento cinético das principais variáveis nas duas formas de inoculação realizadas para a fermentação com 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona (▲ cultura líquida e □ cultura com células centrifugadas). 157
- Figura 4.46 – Perfil cinético da bactéria *Zymomonas mobilis* em diferentes pH's (◇ padrão, □ pH 6, ▲ pH 7, ○ pH 8 e ■ pH 9). 159

- Figura 4.47 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 1,0 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (♦ ensaio realizado em 14/05/03, ■ ensaio realizado em 21/05/03, ▲ ensaio realizado em 27/05/03, ○ ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05, △ ensaio realizado em 11/10/05 com nova cultura de *Z. mobilis* CP4) 162
- Figura 4.48 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 1,0 g/L de glicose e 0,5 g/L de aspartato (♦ ensaio realizado em 21/05/03, ■ ensaio realizado em 27/05/03, ○ ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05). 163
- Figura 4.49 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 0,50 g/L de aspartato e 0,5 g/L de asparagina (♦ ensaio realizado em 21/05/03, ■ ensaio realizado em 27/05/03, ○ ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05, ▲ ensaio realizado em 11/10/05). 164
- Figura 4.50 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 50 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (□ ensaio realizado em 14/05/03 e ● ensaio realizado em 16/06/05). 165
- Figura 4.51 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 73 g/L de aspartato e 10 g/L de peptona (□ ensaio realizado em 27/05/05, ▲ ensaio realizado em 11/10/05). 167
- Figura 4.52 – Avaliação do coeficiente de variação da reprodutibilidade de um processo fermentativo (■ conjunto de experimentos com controle das etapas e ○ conjunto de experimentos onde não era realizado o controle das etapas) 168
- Figura 4.53 – Resultados da simulação da cultura de *Z. mobilis* utilizando 5% de inóculo em 10g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina. Os pontos se referem aos dados experimentais e a linha refere-se à simulação feita a partir do modelo proposto. 173
- Figura 4.54 – Eletroforese de amostras de permeabilização com CTAB e lisozima. 177
- Figura 4.55 - Eletroforese de amostras de permeabilização com CTAB, choque osmótico e lisozima. 178

Figura 4.56 – Eletroforese da permeabilização com CTAB em diferentes faixas de pH da solução tampão.	180
Figura 4.57 - Eletroforese da permeabilização com CTAB e hexano em tampão fosfato de sódio e fosfato de potássio 0,05M e pH 8.	182
Figura 4.58 - Eletroforese da permeabilização com CTAB em tampão fosfato de sódio.	184
Figura 6.1 – Hierarquia de documentos do sistema da qualidade	190
Figura 6.2 – Fases do crescimento microbiano.	203
Figura 6.3 – Os planejamentos fatoriais com 2 e 3 variáveis.	206
Figura 6.4 – Fluxograma de desenvolvimento de um biprocessos com qualidade.	207

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A utilização das enzimas como agentes terapêuticos data de período anterior à Primeira Guerra Mundial. No entanto, é nas últimas décadas que seu uso tem despertado maior interesse, em função dos muitos avanços alcançados na área de processos biotecnológicos. Apesar da alta eficiência catalítica, do baixo custo, do baixo impacto ambiental e da capacidade de ser usada em condições moderadas de temperatura e pH, como medicamentos, a utilização de enzimas para fins terapêuticos também apresenta algumas desvantagens. As enzimas devem ser extensivamente purificadas para eliminar materiais tóxicos contaminantes (como as endotoxinas), são rapidamente degradadas no corpo, têm distribuição limitada no interior dos tecidos vivos por causa do tamanho da molécula e são sempre imunogênicas. Como caso específico, pode-se citar a enzima L-asparaginase, que tem se transformado, nos últimos 30 anos, em um importante agente terapêutico para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda (ALL - *acute lymphoblastic leukemia*), principalmente em crianças, além de também poder ser usada no tratamento de outras doenças leucêmicas, como a doença de Hodgkin, a leucemia mielomonocítica aguda, o linfossarcoma e o melanossarcoma (Soares *et al.*, 2002). Desde a década de 60 sabe-se que algumas células leucêmicas são deficientes em L-asparagina sintetase, não podendo produzir quantidades suficientes do aminoácido essencial, L-asparagina, para a manutenção da viabilidade celular (Graham, 2003).

A enzima L-asparaginase foi isolada e caracterizada a partir de vários microrganismos, incluindo muitas bactérias Gram-negativas, micobactérias (bactérias aeróbias Gram-positivas, sem motilidade, acidorresistentes, comumente delgadas e largamente distribuídas no solo e na água, incluindo formas causadoras da tuberculose e da lepra), leveduras e fungos, bem como a partir de plantas e do plasma de certos vertebrados. Considerável atenção tem sido dada a essa enzima desde que foi demonstrado por Broome (1961) e Mashburn & Wrinston (1964) que a L-asparaginase de *Escherichia coli* possuía atividade anti-tumoral. Desde então, um grande número de microrganismos tem sido alvo de estudos que visam a produção de L-asparaginase. Algumas das asparaginases microbianas possuem atividade antilinfoma em ratos (*Escherichia coli*, *Serratia*

marcescens e *Erwinia carotovora*) e outras não (*Bacillus coagulans*, *Fusarium tricinctum*) (Oliveira, 1998).

O microrganismo estudado no presente trabalho é a bactéria *Zymomonas mobilis*. A *Zymomonas mobilis* é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa, conhecida como eficiente produtora de etanol a partir de glicose via rota metabólica de Entner-Doudoroff, em conjunção com as enzimas piruvato decarboxilase e álcool desidrogenase (Sprenger, 1996). Foi originalmente descoberta em fermentações com seivas de plantas ricas em açúcar, como a seiva do agave no México, e em palmas de vinho da África tropical ou no melaço. O interesse em *Zymomonas mobilis* tem sido crescente nas últimas décadas devido ao seu potencial para a produção de etanol a partir da bactéria recombinante, fermentando glicose produzida por hidrólise de hemicelulose e celulose e gerando uma conversão em etanol em torno de 96% (Lawford e Rousseau, 2003). Outras características que chamam a atenção para este microrganismo são o baixo rendimento celular, a alta tolerância ao açúcar, a resistência a altas concentrações de etanol, a formação de poucos produtos secundários e capacidade de utilização do caldo fermentado para o tratamento de doenças. A bactéria tem sido amplamente estudada no Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE visando a produção de substâncias com alto valor agregado, como o ácido glicônico, sorbitol e GFOR (glicose-frutose oxidoredutase), concomitantemente à produção de etanol (Alves, 1993; Wilberg, 1996; Ferraz, 1999; Fonseca, 2003). Merece aqui destaque especial o trabalho de Pinheiro (2001), que iniciou estudos de fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* visando a produção da enzima L-asparaginase, utilizando meio sintético com L-asparagina como única fonte de nitrogênio.

Em uma indústria ou laboratório de biotecnologia, além dos estudos voltados para o desenvolvimento do processo de obtenção do produto de interesse, um dos principais objetivos é ter o processo operando de forma controlada e estável. Desta forma, torna-se possível produzir materiais e serviços de forma reprodutível, com especificações e medidas de desempenho bem definidas. Numa economia onde a competitividade é acirrada e onde as exigências são crescentes, reprodutibilidade e confiabilidade podem ser os fatores decisivos para o sucesso de um produto. Por isso, há uma busca incessante pela incorporação de novas tecnologias de produtos, processos e serviços. Para os laboratórios de análise e desenvolvimento de processos, em particular, a necessidade de um controle

eficaz é fator imprescindível para minimizar e/ou eliminar as causas que geram os erros nas análises efetuadas.

A estatística é uma ferramenta importante quando se busca uma melhoria de produtos e um melhor gerenciamento do negócio. A estatística se refere, especificamente, ao conjunto de metodologias usadas para o controle, apresentação e análise de dados. A menos que os dados sejam exatos, completos, efetivamente apresentados e corretamente analisados, a análise superficial dos mesmos pode ser perigosamente enganosa.

A realização de análises sem rigor analítico pode gerar resultados imprecisos e inexatos, o que, para uma indústria, pode levar a prejuízos sérios, como perda de confiança do consumidor, multas, retirada do produto do mercado e até a proibição da atividade de comércio. Como exemplos, citam-se algumas notícias publicadas pelo Jornal Folha de São Paulo, como o caso do anticoncepcional Microvlar, produzido pelo laboratório farmacêutico Schering, sem o princípio ativo (1998); falhas em lotes da vacina Vaqta contra hepatite A, fabricada pelo laboratório Merck Sharp & Dhome, devido a problemas no lacre das seringas (2002); evidências de crescimento microbiano em solução de cloreto de sódio produzidas pelo laboratório Tayuyna Ltda e utilizadas para nebulização, limpeza de lentes de contato e de ferimentos (2003); a interdição dos laboratórios Wasser Farma Ltda e Petrolabor Indústria Farmacêutica Ltda por não atender às Boas Práticas de Fabricação e Controle de Medicamentos (2003); a detecção de grandes quantidades de cloreto de bário (14% em 100 g, quando o limite máximo é 0,001%) no contraste para exames de raios-X Celobar, fabricado pelo laboratório Enika (2004), a existência de bactérias no colírio produzido pelo laboratório Lens Surgical, cegando pessoas (2004) e o anestésico à base de lidocaína, fabricado pela farmácia de manipulação Neoativa, com menor concentração do princípio ativo (7,26% do cloridrato de lidocaína ao invés de 10% em cada 100 mL de substância), levando à morte de pacientes (2005). Num laboratório, a falta de rigor analítico pode levar, além de interpretações erradas, à necessidade de numerosas repetições e avaliação desnecessária das causas de variabilidade dos resultados analíticos.

A qualidade dos resultados analíticos torna-se, assim, um fator essencial para satisfazer as necessidades do cliente, atrair sua confiança e agregar valor a produtos e processos, uma vez que o aumento da concorrência e as exigências de qualidade têm gerado

significativas transformações em vários setores da economia. Certificação da qualidade de produtos manufaturados, apoio à saúde e segurança e legislação ambiental são algumas das áreas onde os resultados das análises químicas podem ser extremamente importantes.

A maior dificuldade para a realização de uma boa medida analítica sempre surge nas chamadas operações preliminares, como a amostragem, a estocagem, as medidas básicas de massa e volume, a homogeneização, a dissolução, a troca de solvente, as reações químicas e o transporte de amostras até o instrumento de análise (Valcárcel e Cárdenas, 2002). Estas operações podem estar sujeitas a muitas perturbações e podem ser mecanicamente complexas, requerendo um grande cuidado.

Alguns requisitos usados para o gerenciamento do sistema de qualidade num laboratório analítico incluem o Manual da Qualidade e as Boas Práticas de Laboratório, adicionados de bons procedimentos, como manutenção, seleção, limpeza e organização. Estas práticas permitem a avaliação externa e conduzem, dentre outros elementos, na condução dos Procedimentos Operacionais Padrão (POP), que são descrições detalhadas de operações específicas realizadas no laboratório, incluindo desde a recepção das amostras ao arquivamento dos resultados de análise (Dobhoff-Dier e Bliem, 1999). A análise interlaboratorial é um outro método internacionalmente reconhecido como eficaz para a manutenção do controle de qualidade, sendo uma ferramenta bastante útil para a detecção de erros sistemáticos (Quevauviller *et al.*, 1999).

Garnick *et al.* (1988) citam que as características diretamente relacionadas aos controles de processos biotecnológicos precisam ser avaliadas em detalhe, para que se assegure a qualidade desses processos. Por exemplo, durante a produção de proteínas por bactérias é de fundamental importância assegurar a estabilidade genética, as condições de cultivo, a taxa de crescimento, a consistência no produto formado e a ausência de contaminação microbiana.

Lindholm *et al.* (2003) citam que não existem recomendações suficientemente detalhadas e abrangentes para os procedimentos analíticos usados em processos biotecnológicos. O que há são alguns trabalhos que lidam com questões específicas de quantificação associadas a processos particulares. A partir das normas de validação desenvolvidas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para os métodos analíticos e tendo como exemplo a síntese enzimática de 9 α -hidroxiprogesterona (9 α -OH-OS) em

Escherichia coli usando progesterona como substrato, os autores investigam a aplicabilidade dessas normas no campo biotecnológico a partir da avaliação da seletividade, linearidade de curvas de calibração, precisão, exatidão, sensibilidade, recuperação e estabilidade do produto após sua extração por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). Os autores sugerem que o coeficiente de variação (CV) obtido durante a quantificação de produtos farmacêuticos a partir de amostras biológicas seja inferior a 10%, valor este inferior ao recomendado pelo FDA para métodos analíticos, cujo valor é menor ou igual a 15%.

Vê-se, portanto, que há muito a fazer e discutir no campo de controle de qualidade de processos biotecnológicos, em particular no que diz respeito ao desenvolvimento de protocolos de avaliação de erros e variabilidade de produtos e processos.

Um dos objetivos do presente trabalho é a minimização e/ou eliminação das causas que geram os erros nas análises de um bioprocessamento, visando o desenvolvimento de um protocolo para o controle das fontes de erro. O ambiente onde este estudo é desenvolvido inicia-se a partir da descoberta que *Zymomonas mobilis* sintetiza asparaginase, determinando-se ao longo do trabalho as melhores condições de cultivo que levem a alta produção da enzima, com reprodutibilidade. As características inovadoras deste trabalho estão, então, associadas ao estudo simultâneo da bactéria como produtora da enzima L-asparaginase de alto valor terapêutico, à determinação das condições do processo que a levam a uma maior produção e à análise das causas da variabilidade analítica.

Em função da discussão apresentada durante o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, pretende-se alcançar os seguintes objetivos:

- Definir e padronizar metodologias analíticas para a quantificação de L-asparagina, aspartato, glicose e atividade de L-asparaginase;
- Avaliar as causas da eventual alta dispersão dos resultados analíticos realizados em condições semelhantes;
- Estudar a cinética de produção de L-asparaginase com diferentes concentrações de constituintes de meio de cultivo e fontes de carbono e de nitrogênio, visando a otimização de produção da enzima;
- Identificar e quantificar os erros associados às diversas fontes de variação, garantindo o controle e a qualidade da mensuração;

- Avaliar a repetitividade das medidas analíticas;
- Caracterizar a magnitude e importância relativa dos erros a partir dos dados obtidos nos experimentos e suas análises;
- Baseado nos resultados obtidos, propor um protocolo de controle de erros e variabilidade de processos biotecnológicos, visando o adequado controle de qualidade desses produtos e processos;
- Estudar estratégias de permeabilização da enzima L-asparaginase de *Zymomonas mobilis*, visando comprovar a presença da enzima de ação antilinfoma;
- Repetição dos experimentos para confirmar a eficiência da padronização das etapas e metodologias analíticas.

Este documento está organizado da maneira descrita a seguir. No Capítulo 2 é apresentada uma revisão sobre o câncer, a enzima L-asparaginase, a bactéria *Zymomonas mobilis*, a permeabilização celular e eletroforese de proteínas, e sobre o controle da qualidade analítica no laboratório de biotecnologia e o uso de ferramentas estatísticas. No Capítulo 3 apresenta-se uma descrição dos materiais e métodos de análise empregados no cultivo da bactéria. No Capítulo 4, os resultados experimentais das fermentações, as avaliações de reprodutibilidade dos ensaios, a avaliação das fontes de incerteza do processo, as estratégias usadas para a otimização da produção da enzima, a repetição dos experimentos para avaliar a eficácia da padronização e o emprego de técnicas de permeabilização e eletroforese de proteínas, são apresentados e discutidos. No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões da tese de doutorado e sugestões para trabalhos futuros. No Capítulo 6 apresenta-se um protocolo de qualidade com base no estudo realizado.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – O Câncer

Câncer ou neoplasia é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (www.inca.gov.br).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem, é chamado de sarcoma. Os linfomas originam-se de células conhecidas como linfócitos, encontradas em todo o organismo, particularmente nas glândulas linfáticas e sangue. São divididos em Hodgkin e não-Hodgkin, de acordo com o tipo de célula afetada. De modo geral, os linfomas não-Hodgkin são o linfossarcoma e o reticulossarcoma. A leucemia é o tipo de câncer originado a partir de células da medula óssea, que produzem as células sanguíneas brancas. Os mielomas são malignidades nas células plasmáticas da medula óssea que produzem os anticorpos. Os melanomas, por sua vez, originam-se das células da pele que produzem pigmentos, os melanócitos (Almeida *et al.*, 2005).

A quimioterapia antineoplásica é uma das quatro armas terapêuticas usadas contra o câncer; as outras são a cirurgia, a radioterapia e a imunoterapia (Silva, 1980). Almeida *et al.* (2005) citam que, mais recentemente, tem-se usado a terapia de fotorradiação com derivados hematoporfíricos (HTP). O tratamento se baseia no emprego de substâncias capazes de privar o organismo de determinados elementos indispensáveis ao desenvolvimento normal do processo mitótico. Tais substâncias afetam todas as células corporais, causando, entretanto, maior dano às células malignas (Miller, 1982). Outra técnica quimioterápica no combate a tumores, aneurismas e malformações artério-venosas (MAVs) é a embolização vascular, que consiste na injeção de material finamente dividido na corrente sanguínea, via cateter, em torno da

região tumoral, de modo a obstruir mecanicamente os vasos sanguíneos que irrigam a área lesionada. Desta maneira, tem-se a interrupção do fornecimento de nutrientes à região tumoral, que tende a diminuir, permitindo a recuperação do tecido após um intervalo de tempo (Kerber *et al.*, 1978). Sobre esta técnica, cita-se o processo de síntese de poli (álcool vinílico) e/ou poli (acetato de vinila), com morfologia esférica e estrutura casca-núcleo, para utilização em embolização vascular, desenvolvido no Laboratório de Modelagem e Simulação e Controle de Processos do Programa de Engenharia Química da COPPE (Pinto *et al.*, 2004).

Os medicamentos antineoplásicos são agrupados em várias categorias: agentes alquilantes, antimetabólitos, alcalóides vegetais, antibióticos antitumorais, enzimas, hormônios e modificadores da resposta biológica. Frequentemente, dois ou mais medicamentos são usados em combinação, pois a base racional da quimioterapia combinada é utilizar medicamentos que atuam em diferentes partes dos processos metabólicos da célula, aumentando, dessa forma, a probabilidade de destruição de uma maior quantidade de células cancerosas (Berkow *et al.*, 2002).

O primeiro quimioterápico antineoplásico foi desenvolvido a partir do gás mostarda, usado na Segunda Guerra Mundial como arma química. Após a exposição de soldados a este agente, observou-se que eles desenvolveram hipoplasia (inibição do desenvolvimento do órgão) medular e linfóide, o que levou ao seu uso no tratamento dos linfomas malignos. É um exemplo de agente alquilante, interferindo na molécula de DNA, alterando sua estrutura ou função, de modo que ela não pode replicar, impedindo a multiplicação celular.

Nos casos mais favoráveis, com a quimioterapia atual, pode-se obter maior expectativa de vida, tendo-se em diversos casos até cerca de 66% de pacientes livres do câncer por mais de 10 anos (Almeida *et al.*, 2005). A doença de Hodgkin e muitos dos linfomas não-Hodgkin são curados em cerca de 80% de crianças e adultos (Berkow *et al.*, 2002). Müller e Boos (1998) citam que a L-asparaginase tem sido adotada como agente coadjuvante em muitos protocolos de quimioterapia para o tratamento de leucemia linfóide aguda e linfomas não-Hodgkin em particular. Na leucemia linfóide aguda, a introdução de asparaginase no protocolo de tratamentos pediátricos elevou a taxa de sobrevivência em cerca de 70%, até mesmo em pacientes do grupo de risco.

2.2 - A Enzima L-Asparaginase

2.2.1 – Histórico

A descoberta e desenvolvimento da enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase E.C. 3.5.1.1) como agente antineoplásico se iniciou em 1953, quando Kidd observou a inibição do crescimento de tumores induzidos em ratos e camundongos depois do tratamento com soro de porquinhos da Índia (GPS - guinea pig serum), o que não ocorria com o soro de coelhos, de cavalo nem com soro humano (Graham, 2003; Soares *et al.*, 2002, Müller e Boos, 1998). Entre 1958 e 1962, Broome, comparando as observações de Kidd com as observações feitas por Clementi em 1922 de que o soro de porquinhos da Índia, e não o de outros mamíferos, é uma fonte rica em L-asparaginase, acabou por confirmar que a L-asparaginase era a fonte responsável pela regressão do tumor (Graham, 2003). Mashburn e Wriston (1964) mostraram depois que a L-asparaginase de *E. coli* altamente purificada possui boa atividade antitumoral, ao contrário de um preparado de L-asparaginase de *Bacillus coagulans*, que não inibe o crescimento do tumor.

L-asparaginase hidrolisa o aminoácido L-asparagina para ácido L-aspártico e amônia, exaurindo rapidamente a mistura de extratos celulares de asparagina no corpo. As células tumorais que respondem ao tratamento são provavelmente incapazes de assegurar seu próprio fornecimento de asparagina, já que a atividade de asparagina sintetase (AS) é inferior à das células normais, dependendo, assim, de uma disponibilidade extracelular do aminoácido. Esta deficiência de asparagina interfere rapidamente na síntese de proteínas, levando a uma inibição na síntese de DNA e RNA, com conseqüente deterioração da função celular e morte da célula (Graham, 2003; Bushman *et al.*, 2000, Müller e Boos, 1998).

O mecanismo de ação da enzima da fase G1 do ciclo celular é ilustrado na Figura 2.1. Nesta fase há a preparação da célula para a multiplicação, com a produção de constituintes celulares que serão essenciais para a nova célula que será gerada, além da preparação para a síntese de DNA, que ocorrerá na fase S. Muitos fármacos eficazes contra o câncer exercem sua ação sobre as células que se encontram no ciclo celular, e são denominados fármacos ciclo-celular específicos (CCS). Um destes é a enzima L-asparaginase, que atua pela diminuição catabólica de asparagina sérica, assim como dos níveis sanguíneos de glutamina. Nas células neoplásicas, isto provoca a inibição da síntese de proteínas, resultando no bloqueio da proliferação celular.

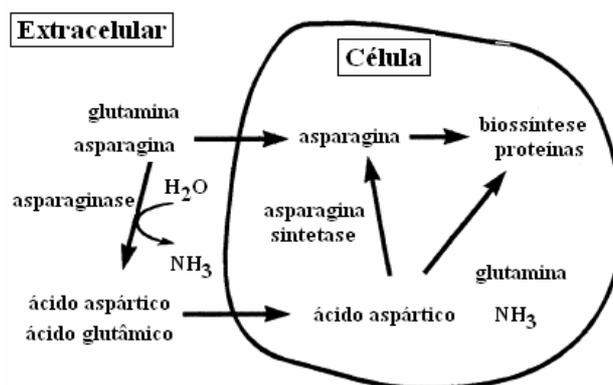


Figura 2.1 – Mecanismo de ação da L-asparaginase (Müller e Boos, 1998).

O fato de a asparaginase mostrar uma relativa especificidade pelo seu substrato natural e também metabolizar glutamina tem sido associado a efeitos colaterais desfavoráveis da terapia, como hepatotoxicidade, hiperglicemia e hemorragia ou trombose.

No tratamento das doenças malignas, a asparaginase é administrada via intramuscular ou intravenosa. As principais indicações terapêuticas da L-asparaginase são o tratamento da doença de Hodgkin, tratamento de leucemia linfocítica aguda, principalmente em crianças, leucemia mielomonocítica aguda e tratamento de linfossarcoma e melanossarcoma (Soares *et al.*, 2002). A maior limitação do uso de L-asparaginase é a hipersensibilidade clínica à dosagem limite, desenvolvida em 3 a 78% dos pacientes tratados com formas nativas da enzima. Administrações repetitivas de L-asparaginase podem causar sérios efeitos colaterais, como choque anafilático, urticária e edema, bem como alergias brandas, náuseas, anorexia, anemia, entre outros. Tal fato se deve à necessidade de se administrar altas doses da enzima (3000 a 9000 IU/kg/dia) (Capizzi, 1993), uma vez que tanto a enzima bruta quanto a purificada possuem baixa atividade catalítica. Algumas dessas complicações, entretanto, podem ser superadas com a substituição de L-asparaginase de microrganismos de diferentes fontes bacterianas (Müller e Boos, 1998). Ainda assim, de acordo com o método terapêutico, têm sido aplicadas algumas terapias combinadas à L-asparaginase com agentes quimioterápicos como prednisona, vincristina, metotrexato, 6-mercaptopurina, citarabina e ciclofosfamida, além da radioterapia.

Atualmente, a L-asparaginase de uso clínico utilizada é disponível em três preparações: duas formas nativas, purificadas a partir de fontes bacterianas, e uma

forma modificada a partir de uma das preparações nativas. A L-asparaginase de *E. coli* usada atualmente no Brasil é comercializada sob a denominação Elspar[®], fabricada nos Estados Unidos pela Merck Sharp & Dohme (MSD) e distribuída pela Prodome. Uma asparaginase sorologicamente distinta e de efeito terapêutico similar é a Erwinase[®], produzida pela bactéria *Erwinia caratovora*, mais tarde denominada *Erwinia chrysanthemi*. Uma terceira preparação, PEG-L-asparaginase (pegasparaginase), é a forma quimicamente modificada da enzima *E. coli* com polietilenoglicol (PEG). Um medicamento denominado Oncaspar[®] foi proposto pela Enzon Pharmaceuticals e aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1994, sendo disponível comercialmente pela Rhone-Poulenc Rorer. Tal medicamento resultou em uma enzima menos imunogênica na indução de anticorpos anti-asparaginase, com tempo de meia-vida prolongado (5,7 dias ao invés de 1,2 dias observado para a enzima nativa) e retenção da atividade enzimática, com conseqüente atividade antitumoral preservada. A Tabela 2.1 apresenta as preparações de asparaginase de uso clínico aprovadas e disponíveis comercialmente nos Estados Unidos (Lee *et al.*, 1989; Kurtzberg, 2000; Müller e Boos, 1998).

A L-asparaginase foi isolada e caracterizada a partir de vários microrganismos, incluindo muitas bactérias Gram-negativas, micobactérias, leveduras e fungos, bem como a partir de plantas e do plasma de certos vertebrados. Contudo, nem todas as enzimas têm apresentado atividade antitumoral. A bactéria *E. coli* produz duas L-asparaginases distintas, EC-1 e EC-2, onde apenas a enzima EC-2 possui atividade antilinfoma. Apesar da asparaginase produzida pelos microrganismos *Serratia marcescens* e *Vibrio succinogenes*, classificados mais tarde como espécies *Wolinella*, possuírem atividade contra linfomas, recursos nunca foram dirigidos para sua produção em larga escala como agente terapêutico, apesar desses microrganismos apresentarem risco biológico 1, ou seja, não causarem dano à saúde do homem (Kurtzberg, 2000; Müller e Boos, 1998). A maioria das L-asparaginases, excetuando-se as do GPS, podem hidrolizar tanto L-glutamina quanto L-asparagina, com atividade de glutaminase em torno de 3 a 9% da atividade de asparaginase. A toxicidade e os diferentes espectros de atividade observados com enzimas de diferentes fontes pode ser devido, em parte, a diferenças na atividade de glutaminase, uma vez que a exaustão da L-glutamina pode aumentar potencialmente a atividade antitumoral da enzima, considerando-se que a hidrólise de L-glutamina, que produz o ácido glutâmico, pode contribuir com a toxicidade clínica, em especial a neurotoxicidade (Kurtzberg, 2000).

Tabela 2.1 – Preparações de asparaginases de uso terapêutico (Müller e Boos, 1998).

Produto comercial	Empresa Farmacêutica	Fonte Biológica
Asparaginase Medac [©]	Medac, Kyowa Hakko	<i>E. coli</i>
Crasnitin [©]	Bayer AG	<i>E. coli</i>
Ciderolase [©]	Rhône-Poulenc Rorer	<i>E. coli</i>
Elspar [©]	MSD, Rhône-Poulenc Rorer	<i>E. coli</i>
Erwinase [©]	Speywood	<i>Erwinia chrysantemi</i>
Oncaspar [©]	Enzon, Rhône-Poulenc Rorer, Medac	<i>E. coli</i>

A eficiência da ação antileucêmica das L-asparaginases depende de várias propriedades enzimáticas, tais como as constantes cinéticas, como a constante de Michaelis (K_M), o pH de máxima atividade e a estabilidade, entre outras. A Tabela 2.2 apresenta as propriedades terapêuticas das L-asparaginases comerciais existentes. Ambas as enzimas possuem atividade e estabilidade elevadas e são livres de endotoxinas. Possuem também baixo K_M para L-asparaginase e não são inibidas por altas concentrações de ácido aspártico e amônia.

Além das técnicas de modificação da enzima, Garin *et al.* (1994) citam a possibilidade de encapsulá-la em eritrócitos humanos, nos quais os poros são alargados transitoriamente através de um ambiente hipotônico. Neste caso, a enzima passa a apresentar uma longevidade semelhante à do eritrócito no ser humano, que é de 120 dias. As incorporações em lipossomas e em nanosferas feitas a partir de poli (D,L-lactídio-co-glicolídio) (PLGA) são outras técnicas utilizadas para prolongar a estabilidade e o tempo de meia-vida da enzima (Wolf *et al.*, 2003).

Tabela 2.2 – Propriedades químicas e farmacológicas das asparaginases terapêuticas (Kurtzberg, 2000; Müller e Boos, 1998).

	<i>E. chrysantemi</i>	<i>E. coli</i>	PEG - <i>E. coli</i>
Atividade (IU/ mg proteína)	650-700	280-400	280-400
Peso molecular (kDa)	138	141	145
K_M (μM) Asparagina	12	10	10
K_M (mM) Glutamina	1,1	6,25	3,0
Ponto isoelétrico (pI)	8,7	5,0	5,0
Tempo de meia-vida no sangue (dias)	0,65 \pm 0,13	1,24 \pm 0,17	5,73 \pm 3,24

2.2.2 - Síntese

Apesar da extensa literatura sobre a estrutura molecular, catálise, aspectos clínicos e características genéticas envolvidas na regulação de L-asparaginase, Geckil e Gencer (2004) relatam poucos trabalhos referentes aos fatores químicos e fisiológicos necessários para a melhoria de sua produção. A produção de L-asparaginase tem sido estudada em *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, com várias fontes de carbono e de nitrogênio, sob condições tanto aeróbias quanto anaeróbias. Os resultados são algumas vezes contraditórios em termos do efeito da fonte de carbono (principalmente a glicose) e do oxigênio na produção desta enzima. A quantidade de enzima produzida por *E. coli* é visivelmente aumentada ao se substituir o crescimento em aerobiose pelo crescimento em anaerobiose, enquanto que para a *E. aerogenes* a presença do oxigênio dissolvido tem um efeito significativo no aumento da síntese de asparaginase. A glicose, geralmente a fonte de carbono preferencial para a produção da enzima, exerce uma repressão catabólica na expressão da enzima em *E. aerogenes*, ao passo que em uma bactéria com características muito semelhantes, *Klebsiella aerogenes*, a glicose não inibe a produção da enzima. Assim, os autores sugerem que vários mecanismos de repressão catabólica e de efeito do oxigênio podem existir, podendo-se usar mecanismos moleculares completamente diferentes para alcançar o controle do carbono catabólico.

Segundo Drainas *et al.* (1977) os efeitos do meio de cultura, pH e taxa de transferência de oxigênio na síntese de L-asparaginase variam de um microrganismo para outro, revelando um conjunto de parâmetros de cultura complexo e variável que afeta a produção de asparaginase de diferentes formas. Barnes *et al.* (1977), por exemplo, citam que, mesmo considerando que a L-asparagina é o substrato natural para a síntese de L-asparaginase, além do controle do pH e da taxa de transferência de oxigênio em *E. coli*, a adição de glutamina ou glutamato ao meio de cultivo causa um aumento significativo na atividade da enzima. Minin e Alegre (1992) estudaram a produção de L-asparaginase por *Erwinia aroideae* em fermentações em batelada e mostraram que a concentração ótima de lactose é igual a 10 g/L, sendo que quantidades maiores podem levar à inibição da síntese enzimática. Adicionando L-asparagina ao meio de crescimento, observaram também uma melhora na produção de L-asparaginase, sendo que nenhuma inibição do crescimento foi observada para concentrações de L-asparagina até 16 g/L. Os autores também observaram um aumento do pH durante a fermentação como resultado da ação da L-asparaginase sobre a L-asparagina, além de

observarem que o início da produção de L-asparaginase se inicia antes do começo da fase de crescimento.

O mecanismo regulatório, conhecido como repressão catabólica do carbono (CCR), é amplamente distribuído entre os sistemas microbianos e funciona, principalmente, para assegurar uma utilização organizada e seqüencial das fontes de carbono, quando mais de uma dessas fontes está presente no meio (Sanchez e Demain, 2002). Nesta condição, a célula cataboliza a melhor fonte de carbono presente no meio, ou seja, aquela que fornece carbono e energia mais rapidamente para o crescimento. Simultaneamente, a síntese de enzimas que utilizam outros substratos é reprimida até o substrato primário ser exaurido. Há muitos exemplos de enzimas e metabólitos secundários regulados por CCR em bactérias e fungos, como a produção de α -amilase pelo fungo filamentoso *Aspergillus oryzae*, que é reprimida por acetato e glicose, e a já mencionada síntese de L-asparaginase por *Enterobacter aerogenes*, em que a glicose é a fonte repressora da síntese, como mostra Mukherjee *et al.* (2000). Isto também foi observado por Cedar e Schwartz (1968), uma vez que grandes quantidades da enzima foram produzidas pela bactéria *Escherichia coli* na ausência de açúcares e na presença de grandes quantidades de aminoácidos.

Sanchez e Demain (2002) citam que uma das formas de aumentar a produção de metabólitos sujeitos a CCR é limitar a concentração da fonte repressora de carbono na fermentação. Tal abordagem induz a utilização de estratégias de cultivo em batelada alimentada, muito mais dependente da cinética de crescimento e das taxas de alimentação de nutrientes. O uso industrial do cultivo em batelada alimentada tem a vantagem de permitir que a concentração do substrato limitante seja mantida em níveis muito baixos, evitando os efeitos repressivos da alta concentração de substrato.

2.2.3 - Atividade

Uma unidade internacional de asparaginase (IU) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de amônia por minuto a 37°C e pH 8,6 (Mashburn e Wriston, 1963).

A metodologia mais utilizada para determinação da atividade de L-asparaginase é baseada na determinação da amônia liberada pela L-asparagina, como resultado da ação da enzima, utilizando-se o reagente de Nessler (Mashburn e Wriston, 1963; Liu e Zajic, 1973; Paul e Cooksey, 1981; Soares *et al.*, 2002). É um método com boa

reprodutibilidade, mas que requer cuidados meticulosos, além de sofrer interferência de muitas substâncias.

A atividade de L-asparaginase também pode ser medida pelo método condutimétrico, baseado no aumento da condutividade que ocorre devido à produção de amônia e/ou aspartato (Drainas e Drainas, 1985; Stecher *et al.*, 1999). A condutividade é linear em relação ao tempo e à concentração enzimática, seguindo a cinética de Michaelis-Menten. Os autores citam que nos ensaios realizados com Elspar, a adição de L-asparaginase comercial à mistura de reação que contém o substrato L-asparagina causa um rápido aumento na condutividade. Este aumento é linear em relação à concentração enzimática e o método pode detectar níveis de atividade tão baixos quanto 0,001 U de L-asparaginase comercial. Dentre as vantagens deste método estão a rapidez, a sensibilidade, a reprodutibilidade e a facilidade de medição em linha para monitoração da cinética enzimática.

Uma forma de identificação da enzima L-asparaginase foi proposta por Padjak e Padjak (1974 e 1972), num método baseado na formação de um complexo branco insolúvel devido à reação do tetrafenilborato de sódio com o íon amônio $[\text{NaB}(\text{C}_6\text{H}_5)_4 - \text{NH}_4^+]$. A amostra contendo a enzima e outras proteínas é submetida à eletroforese não desnaturante onde, após a separação das proteínas, o gel é colocado em contato com tetrafenilborato, formando um halo branco em torno da banda correspondente à asparaginase.

Wriston e Yellin (1973) afirmam que o principal pré-requisito para a atividade anti-tumoral é a atividade no pH fisiológico, uma vez que a concentração de L-asparagina não se torna limitante da velocidade até que ela seja reduzida a valores da ordem de 10^{-5}M (10^{-3} g/L) para asparaginase periplasmática de *E. coli* (EC-2).

2.2.4 – Asparaginases Bacterianas

Escherichia coli produz duas L-asparaginases distintas, que se diferenciam em função de um amplo número de propriedades, dentre as quais a mais significativa é a diferença de afinidade pelo seu substrato, L-asparagina (Oliveira, 1998). A enzima com maior afinidade pela L-asparagina, a L-asparaginase II ou EC-2, de forma tetramérica e localizada no espaço periplasmático, situado entre a membrana plasmática bacteriana e o envelope celular, possui um peso molecular de 141000 Da e um ponto isoelétrico teórico de 5,66. O sítio ativo é composto pelos resíduos treonina (Thr34, Thr111), aspartato (Asp112) e lisina (Lys184). O valor de K_M para esta enzima é de $1,15 \times 10^{-5}$

M, evidenciando uma grande afinidade pelo substrato. A enzima L-asparaginase I ou EC-1, localizada no citoplasma da célula, tem baixa afinidade por L-asparagina, apresentando um valor de K_M de $3,5 \times 10^{-3}$ M (banco de dados “SWISS-PROT”, P18840). Sendo assim, essa enzima é pouco efetiva contra o crescimento do tumor e não interfere com a síntese de proteínas em extratos microbianos.

A forma nativa da enzima de *E. coli* tem estrutura molecular que consiste de 10% de alfa-hélice, 45% de estrutura beta e 45% da estrutura na forma desordenada. Soluções de asparaginase têm a quantidade de estrutura beta elevada para 55%, reduzindo-se o conteúdo de alfa-hélice. A enzima é estável entre pH 5,5 e 10,8, mas é completamente desordenada a pH 11,2 (Wriston e Yellin, 1973).

Estudos cristalográficos na última década geraram raios-X das estruturas nativas e mutantes da L-asparaginase de *E. coli*. O modelo da estrutura da enzima é apresentado na Figura 2.2. Stecher *et al.* (1999) citam que a proteína é um tetrâmero de quatro subunidades idênticas, com peso molecular de 35000 Da/subunidade e ligadas, principalmente, por forças não-covalentes.



Figura 2.2 – Estrutura do tetrâmero de L-asparagina (PDB IB codificação 3eca) desenhada com MOLSCRIPT. Os monômeros são codificados em cores. Os produtos da reação, os aspartatos, são ligados ao centro ativo da enzima pelos modelos em bolas (Stecher et al., 1999).

Tais subunidades idênticas do tetrâmero podem ser consideradas como um dímero de dímeros pareados, onde cada um dos dímeros possui dois centros ativos, cada qual formado por cadeias laterais de aminoácidos das subunidades intimamente relacionadas. Apesar dos dímeros conterem todos os elementos estruturais e grupos funcionais para criar um ambiente sítio-ativo completo, a enzima ativa é sempre um tetrâmero.

Além disso, apesar do dímero ser estruturalmente auto-suficiente, a formação do tetrâmero leva a uma redução significativa da energia livre da enzima. Com isso, enquanto as força iônicas e pontes de hidrogênio são os principais fatores responsáveis pelas estruturas secundária e terciária, as forças entre as subunidades no tetrâmero são predominantemente hidrofóbicas, indicando que os sítios envolvidos no arranjo do tetrâmero são mais suscetíveis ao tratamento térmico na enzima modificada do que na sua forma livre (Soares *et al.*, 2002).

Marlborough *et al.* (1975) citam que a L-asparaginase pode ser renaturada estruturalmente em pH alcalino, sem haver recuperação da atividade. Em controvérsia, Soares *et al.* (2002) relatam que, estudando três diferentes valores de pH (pH 5, pH 8,6 e pH 11,5), houve uma mudança irreversível na estrutura dos valores de pH 5 e 11,5, enquanto que em pH 8,6 há uma renaturação de cerca de 50 a 70% de atividade da enzima em sua forma nativa e de 32% em sua forma modificada com PEG, como consequência da dissociação da enzima em subunidades. As subunidades podem ser re-associadas e a atividade enzimática restaurada, dependendo das condições experimentais (tempo, pH, temperatura). Na forma modificada, a recuperação da atividade é mais lenta do que na enzima nativa, em função da sua menor mobilidade (rigidez estrutural).

Em *Enterobacter aerogenes*, Geckil e Gencer (2004) relataram que a atividade de asparaginase é função da idade da célula, sendo que o máximo de atividade é obtido na fase estacionária de crescimento (após 24 horas de incubação). Agitação e aeração também são fatores limitantes para a produção da enzima, obtendo-se maiores atividades em baixa aeração e baixa agitação. Altas concentrações de glicose (1%) inibem quase que totalmente a síntese de asparaginase, enquanto baixas concentrações (0,1%) estimulam a produção da enzima, comparado ao processo sem adição de glicose.

Os microrganismos que fermentam produtos do metabolismo da L-asparagina ou compostos relacionados, como é o caso das bactérias, geralmente mostram um modelo comum de regulação de L-asparaginase. Nestes organismos, a taxa de transferência de

oxigênio para o meio, o pH e a concentração de ácidos orgânicos (como fumarato, lactato, piruvato, succinato, malato e oxaloacetato) podem ter uma importante função na regulação de L-asparaginase. A amônia pode estimular a produção da enzima (Paul e Cooksey, 1981). Contudo, para as leveduras, a produção de uma L-asparaginase extracelular é estimulada pela carência de nitrogênio na fase estacionária (Dunlop e Roon, 1975).

Muitas das asparaginases conhecidas, com exceção daquela proveniente do GPS, mostram uma atividade limitada sobre a glutamina. Um número de glutaminases com pouca ou nenhuma atividade por asparaginase também é conhecido. Há ainda um terceiro grupo de enzimas que catalisa a hidrólise de asparagina e de glutamina, possuindo atividades equivalentes de asparaginase e glutaminase, enzimas denominadas glutaminase-asparaginases (EC 3.5.1.38). Estudos cristalográficos das glutaminase-asparaginases têm revelado que elas apresentam as mesmas estruturas terciária e quaternária das asparaginases tipo II. O interesse por essas enzimas tem crescido desde que foi observado que a atividade anti-tumoral da asparaginase é intensificada pela glutaminase, pois menores níveis de glutamina na circulação sanguínea promovem um maior índice de morte das células tumorais (Wriston e Yellin, 1973; Müller e Boos, 1998).

Roberts *et al.* (1972) purificaram uma asparaginase-glutaminase de *Acinetobacter glutaminasificans*, ilustrada na Figura 2.3, com altos rendimentos, obtidos a partir de crescimento aeróbico em meio sintético composto de ácido L-glutâmico, sulfato de amônio, tampão fosfato e traços de minerais. Esta enzima possui ação antitumoral, com uma razão de atividade para L-glutaminase e L-asparaginase de 1,2 para 1,0, estrutura tetramérica e peso molecular semelhante à asparaginase de *E. coli*. O ponto isoelétrico é alto (pI = 8,43) e a enzima não contém dissulfetos nem grupos sulfidrila e nem carboidratos. A atividade específica da proteína foi de 190 ± 20 IU/mg proteína, com valor de K_M para a asparaginase de $1,5 \times 10^{-6}$ M e para a glutaminase de $1,5 \times 10^{-6}$ M.

Outra enzima glutaminase-asparaginase com estrutura tetramérica e peso molecular semelhante à da asparaginase de *E. coli* foi isolada de *Alcaligenes eutrophus*, hoje denominada *Cupriavidus necator* (Wriston e Yellin, 1973), apresentando pI 8,6 e K_M , com asparagina como substrato, similar ao da asparaginase II de *E. coli*. Contudo, sua atividade antitumoral é menor que a da asparaginase de *E. coli*, possivelmente devido ao seu baixo tempo de meia-vida.

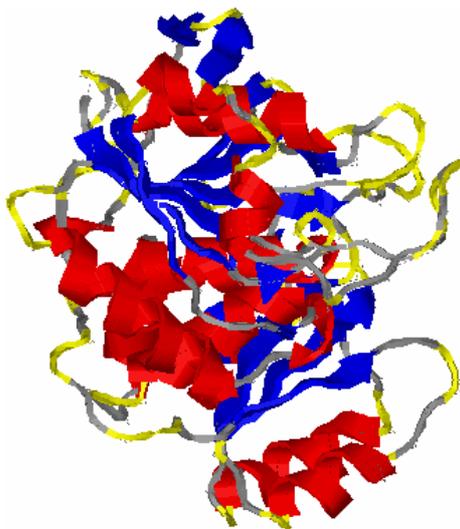


Figura 2.3 – Modelo da estrutura terciária da asparaginase-glutaminase (EC 3.5.1.38) de *Acinetobacter glutaminasificans*, obtida a partir do Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P10172>).

Em espécies de *Chlamydomonas*, Paul & Cooksey (1981) observaram que, quando a L-asparagina é a única fonte de nitrogênio, apenas a amida da L-asparagina é utilizada para crescimento, sendo liberada pela ação de uma L-asparaginase localizada próximo à superfície celular. Quando as células foram crescidas em concentrações de L-asparagina, nitrato de sódio ou cloreto de amônio limitantes ao crescimento (0,1 mM), observou-se um aumento da atividade de L-asparaginase. Níveis de glutamina sintetase também mostraram aumento em resposta à carência de nitrogênio, enquanto que a atividade de glutamato desidrogenase mostrou resposta inversa em culturas crescendo com amônia e L-asparagina.

Imada *et al.* (1973) mostraram que muitos microrganismos produtores de L-asparaginase também produzem glutaminase. Verificaram também que a distribuição das atividades enzimáticas está relacionada com a classificação do microrganismo. Entre as 464 bactérias estudadas, as atividades dessas enzimas ocorreram em muitas bactérias Gram-negativas e em poucas Gram-positivas, observando-se que no gênero *Pseudomonas* as atividades de asparaginase e glutaminase ocorrem simultaneamente e em grande proporção. Nas 261 espécies do gênero *Streptomyces* e *Nocardia* observaram-se atividades de asparaginase e glutaminase apenas quando os organismos foram lisados. Nas 4158 espécies de fungos estudadas, foi observada atividade de asparaginase em todas elas; no entanto, apenas em algumas espécies foi observada a formação de glutaminase. O mesmo ocorre nas 1326 espécies de leveduras analisadas.

Contudo, a atividade antilinfoma foi encontrada apenas nas enzimas da família *Enterobacteriaceae*, fazendo com que as mesmas sejam utilizadas em experimentos clínicos.

Alexandri *et al.* (1990) estudaram o consumo de glutamina em *Zymomonas mobilis* e observaram que o mecanismo de transporte segue a equação clássica de Michaelis-Menten, para o qual determinaram os valores das constantes para os meios completo e mínimo. Segundo citam os autores, a única publicação referente ao consumo de nutrientes por esta bactéria trata de um sistema com transporte facilitado para o consumo de glicose, indicando que não existe um bom conhecimento sobre o consumo de aminoácidos e de outros substratos nitrogenados.

Um panorama geral das asparaginases bacterianas é apresentado na Figura 2.4 (Borek e Jaskólski, 2001), em concordância com a árvore da vida e claramente dividida em duas ramificações, tipo I e tipo II. As asparaginases tipo II são geralmente secretadas no periplasma, em contraste às asparaginases tipo I, que são citoplasmáticas.

2.2.5 – Asparaginases em Leveduras

As leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* também produzem duas asparaginases biológica e geneticamente distintas. Uma delas é uma enzima secretada para o espaço periplasmático, em resposta à estarvação por nitrogênio e que atua na hidrólise de asparagina externa à célula, enquanto a outra é uma enzima constitutiva interna (Dunlop e Roon, 1975). Por ser um organismo eucariótico, manipulável por quaisquer dos métodos da engenharia genética clássica e molecular, tendo o seu genoma sido totalmente seqüenciado, muitos estudos têm sido realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Oliveira, 1998).

Uma importante característica das leveduras é a produção de enzimas a partir de células que estão fora da barreira de permeabilidade da membrana plasmática. Deste modo, essas enzimas são prontamente acessíveis aos seus substratos e reagem prontamente a mudanças no meio externo. A invertase (β -D-frutofurano- frutohidrolase, EC 3.2.1.26) é o exemplo mais estudado desta enzima, existindo tanto na forma intracelular quanto na extracelular. Similarmente, existem duas formas distintas de asparaginase em *Saccharomyces cerevisiae* (Pauling e Jones, 1980).

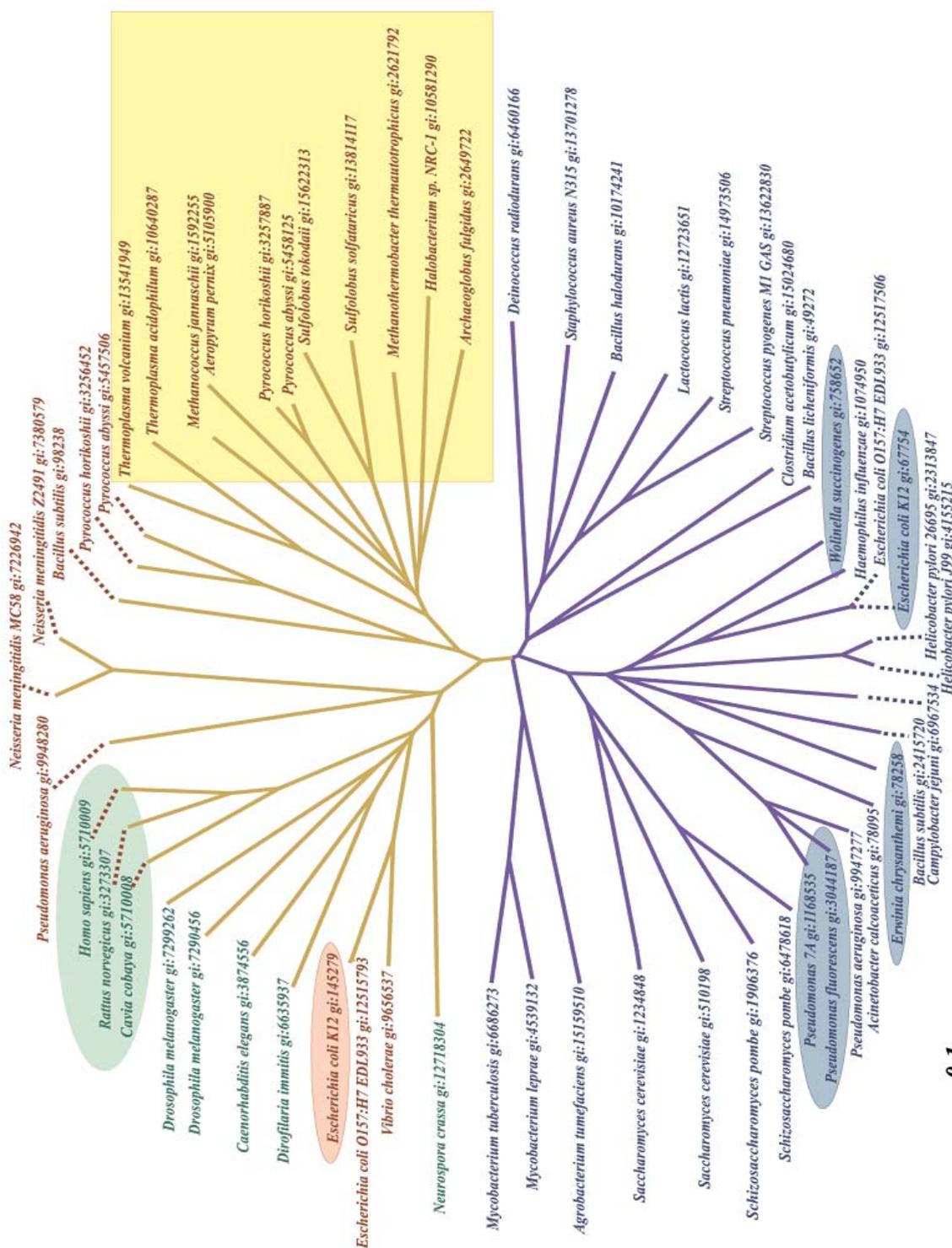


Figura 2.4 – Asparaginases bacterianas. Ramo laranja, asparaginase tipo I; ramo azul, asparaginase tipo II. Letra azul, seqüências altamente homólogas às asparaginases EC-2; letra marrom, seqüências altamente homólogas às asparaginases EC-1; letra verde, seqüências altamente homólogas às lisofosfolipases. Caixa amarela, subunidade de Glu-AdT amidotransferase; caixa verde, lisofosfolipases; caixa laranja, forma dimérica ativa de EC-1; caixa azul, asparaginase tetramérica bacteriana tipo II com atividade antitumoral. A terminação *gi* indica as únicas seqüências identificadas do NCBI (Borek e Jaskólski, 2001).

Quando as células crescem em meio mínimo de cultivo com fonte de nitrogênio abundante, a atividade de asparaginase II de células de *Saccharomyces cerevisiae* é maior no início da fase exponencial, ocorrendo perda da atividade à medida que vai se atingindo o final da fase exponencial de crescimento, antes mesmo do decréscimo da taxa de crescimento. Suplementando-se o meio de cultivo exatamente antes do início do período de perda de atividade com metabólitos como glicose, NH_4^+ , L-arginina, L-prolina, L-glutamato, L-aspartato ou D-asparagina, observa-se que a perda de atividade não é afetada. Contudo, a adição de L-asparagina ou L-glutamina retarda o início do período de perda de atividade de 3 horas para 7 horas (Pauling e Jones, 1980).

Pauling e Jones (1980) analisaram as causas da perda de atividade de asparaginase de levedura, baseando-se em três possíveis mecanismos para explicar a perda de atividade extracelular. Com base nos resultados, os autores concluíram que a perda de atividade durante a transição da fase exponencial para a estacionária é o resultado de uma degradação proteolítica. Um dos fatores que sustentam esta observação é o fato de o inibidor específico de protease, o TCPK, poder inibir a perda de atividade.

Oliveira (1998) cita que a produção de asparaginase com ação antitumoral pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* parece não ser regulada por glicose, sendo sua atividade afetada pelo metabolismo de nitrogênio. Estudando a influência da regulação do nitrogênio na produção de L-asparaginase por *Saccharomyces cerevisiae* em células mutantes com o plasmídeo contendo o gene URE2 (cepa P40-3C+), Oliveira (1998) observou que, após a incubação em 3% de glicose e ausência de fonte de nitrogênio, a atividade enzimática de asparaginase em células na fase exponencial de crescimento aumenta cerca de 6 vezes ao se utilizar um meio contendo prolina. O produto do gene URE2 é a proteína Ure2, que participa na regulação por nitrogênio. Os valores de atividade obtidos variaram de 36 IU/g células em peso seco, em células recém colhidas, a 219 U/ g células em peso seco, em células mutantes estavadas para o nitrogênio. A cepa selvagem de *Saccharomyces cerevisiae* (D273-10B) em meio contendo prolina não apresentou atividade asparaginásica. Também foi observado que os níveis de atividade são dependentes da fonte de nitrogênio presente no meio, uma vez que meios contendo sulfato de amônio e nitrato de sódio não resultaram num aumento significativo da atividade.

A regulação por nitrogênio ocorre quando os microrganismos são capazes de selecionar fontes mais facilmente metabolizáveis (amônia, glutamina e asparagina),

conhecidas como fontes ricas em nitrogênio, e inibir a expressão de sistemas de transporte e enzimáticos que permitem a assimilação de fontes conhecidas como pobres, tais como nitrato, prolina e uréia.

Segundo Arima *et al.* (1972), os fungos e leveduras mostram modos de regulação de L-asparaginase similar aos das células vegetais, onde a produção extracelular da enzima é estimulada por uma carência de nitrogênio.

2.2.6 – Asparaginases em Células Vegetais

Em células vegetais, a asparagina é o metabólito mais abundante para armazenamento e transporte de nitrogênio, que é utilizado na biossíntese de proteínas (Borek e Jaskólski, 2001). É leguminosa a maioria das enzimas envolvidas em rotas metabólicas de assimilação do nitrogênio atmosférico. A afinidade por L-asparagina é baixa ($K_M = 10^{-2}$), mas a alta concentração de asparagina (40 mM) apresentada em presença de atividade asparaginásica garante a eficiência do processo. As asparaginases em células vegetais mostram cerca de 60% de similaridade às seqüências de aspartilglicosaminidases (glicosilasparaginases). Aspartilglicosaminidases (EC 3.5.1.26) em humanos catalisa a última fase de degradação de proteínas glicosiladas, isto é, hidrolisa a ligação glicosídica entre o açúcar e a L-asparagina. Elas também podem agir como asparaginases, apesar da baixa afinidade de substrato ($K_M = 10^{-3}$ M).

Um panorama sobre as asparaginases em células vegetais também é apresentado por Borek e Jaskólski (2001), sendo ilustrado na Figura 2.5. Este é dividido em quatro ramificações. As aspartilglicosaminidases, as enzimas vegetais e suas formas homólogas, seqüências arquegoniadas (planta cujos gametas femininos se originam no interior de um arquegônio, como os musgos) com função desconhecida e as seqüências eucarióticas sem função conhecida. O produto do gene *ybiK* de *E. coli* (EC-III) é apresentado na 2ª ramificação, apoiando a hipótese bioquímica da sua proximidade à asparaginase de células vegetais.

O estudo das propriedades e isolamento da asparaginase em folhas de ervilha (*Pisum sativum*) realizado por Sieciechowicz e Ireland (1989) mostra que a atividade enzimática decresce com a idade da folha e varia ao longo do dia, em função do transporte de elétrons na fotossíntese. Em folhas jovens de *Pisum sativum* e em duas espécies de tremoço (*Lupinus*), o íon potássio é necessário para a máxima atividade de asparaginase.

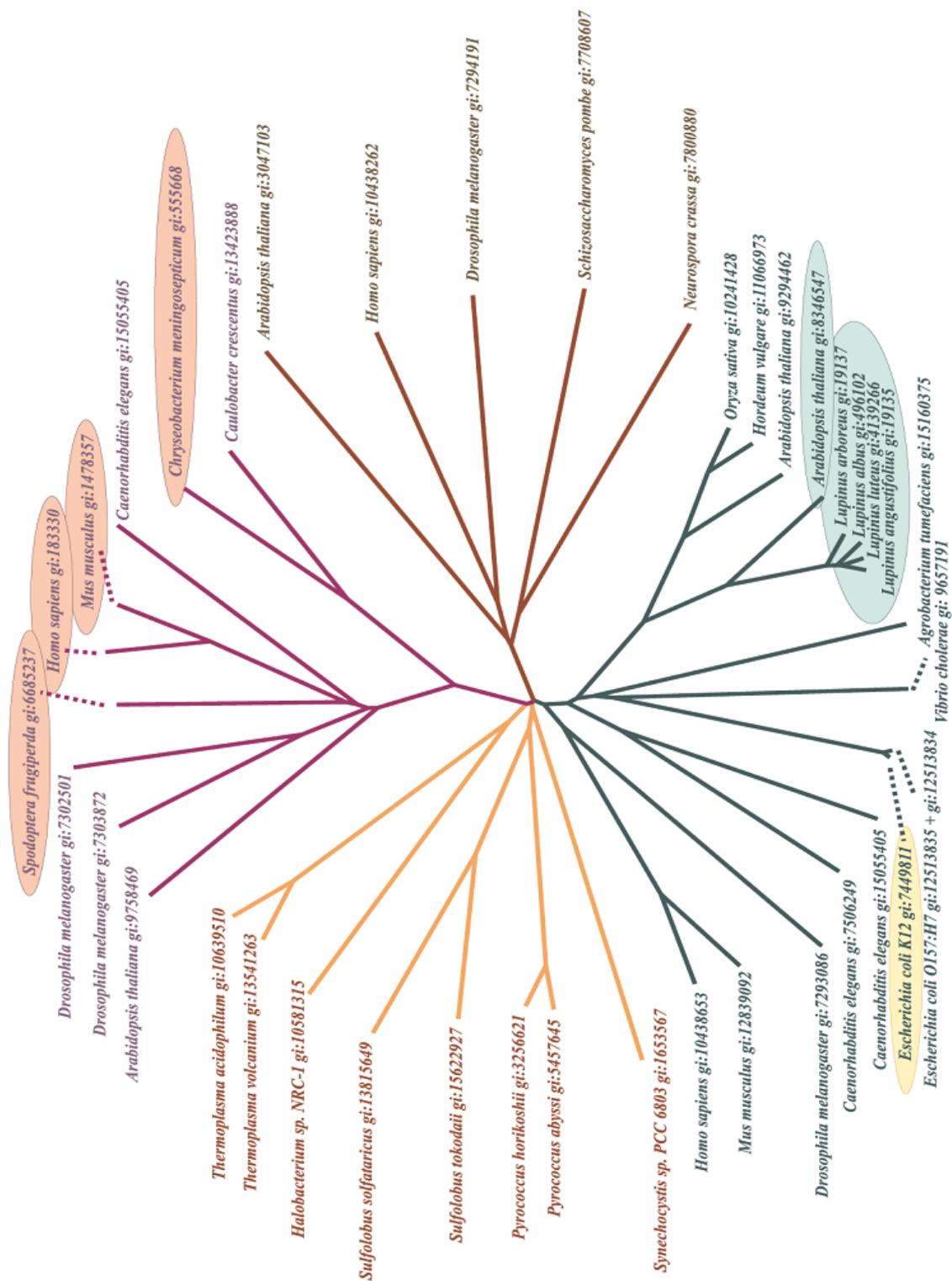


Figura 2.5 – Asparaginases de células vegetais. Ramo violeta, aspartilglicosaminidasas; ramo amarelo, asparaginases de células vegetais predominantemente arqueoniadas; ramo marrom, seqüências eucarióticas com homologia às asparaginases vegetais de características bioquímicas desconhecidas; ramo verde, asparaginases vegetais caracterizadas bioquimicamente (caixa verde) e seus homólogos em outros organismos. Caixa rosa, aspartilglicosaminidasas bioquimicamente caracterizadas; caixa amarela, o produto do gene *ybiK* de *E. coli* com atividade asparaginásica (Borek e Jaskólski, 2001).

2.3 - A Bactéria *Zymomonas mobilis*

Os primeiros estudos sobre a bactéria *Zymomonas mobilis* datam do início do século XX. Em 1911, ela foi isolada por Baker e Hillier a partir da cidra, uma bebida produzida pela fermentação do suco de maçã, que freqüentemente se deteriorava e apresentava sinais característicos como formação de espuma, liberação de gases e diminuição da doçura, gerando um líquido turvo, com depósito no fundo da garrafa (Swings e De Ley, 1977). Contudo, a descoberta da bactéria é comumente atribuída a Lindner, que a isolou no México, em 1924, a partir da seiva fermentada do *Agave atrovirens*, conhecida como pulque, dando à bactéria o nome de *Thermobacterium mobilis*. Em 1931, Kluyver e Hoppenbrouwers mudaram o nome da bactéria para *Pseudomonas lindneri* e, em 1936, criaram o gênero *Zymomonas* e deram o nome de *Zymomonas mobilis* à bactéria descoberta por Lindner.

Na década de 50, esta bactéria chamou a atenção dos bioquímicos por utilizar a via de Entner-Doudoroff, que é utilizada por microrganismos estritamente aeróbios, como os do gênero *Pseudomonas*. Nos anos 70 esta bactéria foi descoberta como a mais rápida e eficiente produtora de etanol, empregando sacarose, glicose ou frutose como únicas fontes de carbono e energia (Doele et al., 1993).

Clavigero, em seu livro intitulado “A História do México”, relata o uso pelos astecas do “aguamiel”, seiva açucarada do *Agave* considerada o habitat natural da *Zymomonas mobilis*, com propósitos terapêuticos (Swings e De Ley, 1977). Lindner menciona a utilização de soluções de *Zymomonas mobilis* no tratamento de doenças renais, de doenças contra a febre aftosa e brucelose em gados bovinos, e no tratamento de furúnculos e feridas purulentas no homem (Gonçalves de Lima, 1958). Estas aplicações despertaram o interesse de pesquisadores por estudos sobre esta bactéria, como o isolamento e identificação do seu princípio ativo. No Brasil, a pesquisa com a bactéria foi iniciada pelo pesquisador Gonçalves de Lima em 1952, quando trouxe do México a cepa Ag11. Em 1970, o pesquisador isolou as cepas CP1, CP2, CP3 e CP4 de amostras de caldo de cana-de-açúcar ligeiramente degradadas. A cepa conhecida como CP4 foi mundialmente distribuída e tem sido detectada como contaminante nas indústrias de fermentação alcoólica. Pinheiro (2001) cita em seu trabalho que no Departamento de Antibióticos da UFPE estão sendo realizados estudos sobre a atividade antitumoral da levana produzida por *Zymomonas mobilis* (Calazans, 1997) e sobre o desenvolvimento de probióticos (culturas de microrganismos vivos administrados a humanos e/ou animais para fins terapêuticos) a base de *Zymomonas mobilis* (Cachiado,

2001). Morais (1982) cita a ação terapêutica no tratamento de distúrbios intestinais e ginecológicos. No Laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE, estudos têm sido realizados visando a produção de substâncias com alto valor agregado, como sais de gliconato, sorbitol e GFOR (glicose-frutose oxidorreductase), concomitantemente à produção de etanol (Alves, 1993; Wilberg, 1996; Ferraz, 1999; Fonseca, 2003). Pinheiro (2001) deu início aos estudos de fermentação da bactéria *Zymomonas mobilis* em meio contínuo, visando correlacionar o comportamento dinâmico da cultura e a síntese da enzima L-asparaginase, utilizando meio sintético com apenas L-asparagina como fonte de nitrogênio.

As bactérias *Zymomonas mobilis* são bastonetes Gram-negativos, que medem de 2 a 6 μm de comprimento e de 1 a 1,5 μm de largura, geralmente móveis e não esporulantes. São encontradas geralmente aos pares, embora também apareçam isoladas. Possuem rotas catabólicas comparativamente simples e a ausência de uma variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros microrganismos. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, *Z. mobilis* tem de catabolizar o substrato com altas taxas específicas, resultando em baixos rendimentos de biomassa porque a maior parte do substrato carbono é incluído no catabolismo do produto final, o etanol (Toma *et al.*, 2003).

A fermentação de 1 mol de glicose dá origem a 1,6 moles de etanol, 1,8 moles de CO_2 e pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácido acético, glicerol, acetoina, dihidroxicetona, sorbitol, manitol e ácido glicônico. As condições ideais para o crescimento desta bactéria são intervalos de temperatura de 30 a 36°C e intervalos de pH entre 5 e 7. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO_2 , lactato e outros, seguindo um balanço metabólico simples. Apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa (Swings e De Ley, 1977).

Açúcares fermentáveis como glicose, frutose e, em alguns casos, sacarose, são indispensáveis na composição do meio de cultura de *Zymomonas mobilis*. Fermentam glicose e frutose gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e CO_2 , formando colônias de coloração branca ou creme. Na hidrólise da sacarose, ou de misturas de glicose e frutose, os subprodutos da formação de etanol são a levana e o sorbitol (Viikari e Gisler 1985). A frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação

de levana e fruto-oligômeros pela ação da enzima levanasacarase (Loos *et al.* 1994). *Zymomonas mobilis* não crescem bem em frutose.

O interesse em *Zymomonas mobilis* tem sido reavivado nos últimos anos. Esse microrganismo é usado com sucesso na produção de etanol combustível, apresentando uma produtividade 3 a 5 vezes maior que na fermentação com levedura, com um rendimento em etanol a partir de glicose acima de 97% do valor teórico máximo (Sprenger, 1996). As simples condições para seu crescimento, a alta tolerância ao açúcar e a resistência a altas concentrações de etanol tornaria o microrganismo um sério competidor para as tradicionais leveduras, não fosse a pequena faixa de tipos de substrato. Apesar de sua alta capacidade fermentativa, a *Zymomonas mobilis* apresenta funções de cadeia de transporte de elétrons e bom crescimento em ambientes microaeróbicos, ocupando uma posição taxonômica claramente próxima dos organismos aeróbios *Glucanobacter* e *Acetobacter* (Sprenger, 1996).

O metabolismo de açúcares de *Zymomonas mobilis*, ilustrado na Figura 2.6, aparece como uma “via metabólica” com algumas rotas ramificadas. A sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase e levanasacarase (Sprenger, 1996). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxidorreductase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotódeo-fosfato) e que existe apenas na bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR madura está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol (Sprenger, 1996). Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético, apesar de não ser a única fonte de carbono para a *Zymomonas mobilis*. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial do estresse osmótico.

Segundo Doelle *et al.* (1993), *Zymomonas mobilis* é, sem dúvida, uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura extremamente peculiares, causando um grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial. Os autores afirmam que a habilidade da bactéria *Zymomonas mobilis* em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente, bem como sua

limitada formação de produtos, tornam-na um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos.

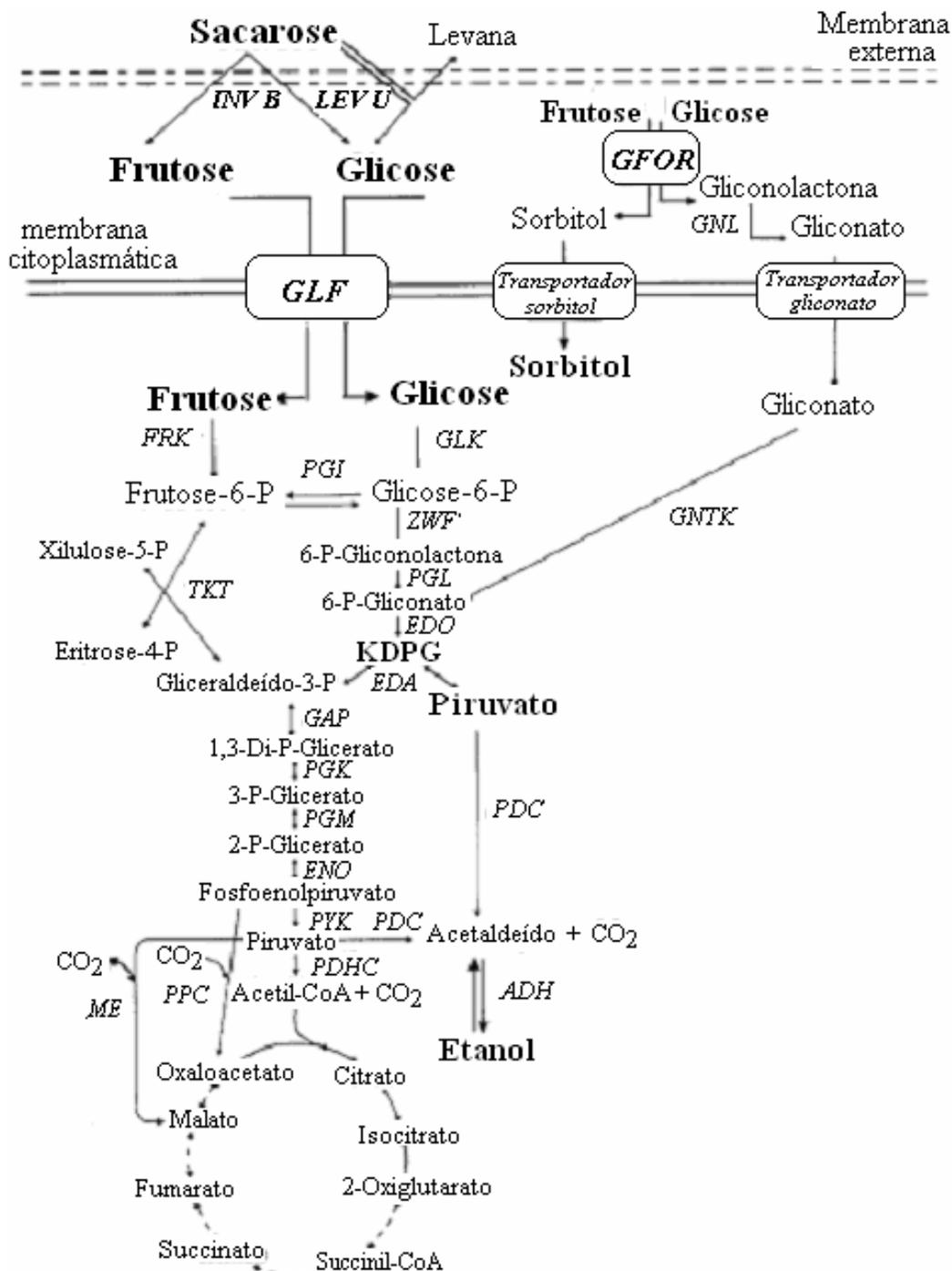


Figura 2.6 – Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis* (Sprenger, 1996).

Todas as proteínas envolvidas na rota de Entner-Doudoroff já foram purificadas, o que torna *Zymomonas mobilis* uma das poucas bactérias onde isto foi feito. Por isso,

muitos dos seus genes têm sido identificados e suas seqüências de DNA estabelecidas (Sprenger, 1996).

Tanto o baixo rendimento em biomassa quanto as condições anaeróbias de cultivo tornam a *Zymomonas mobilis* um excelente modelo para estudos sobre os efeitos de mistura no crescimento. Investigando o efeito da intensidade de agitação, numa faixa de 300 a 1100 rpm, sobre o crescimento e formação de produto em fermentações contínuas, Toma *et al.* (2003) observaram que a intensidade da mistura pode afetar fortemente o metabolismo de *Zymomonas mobilis*. Uma agitação vigorosa conduziu a um melhor acoplamento entre o catabolismo e o anabolismo. A altas velocidades de agitação, a taxa específica de consumo de glicose diminuiu, enquanto o rendimento em biomassa (Y_{XS}) aumentou substancialmente, tornando a bactéria um exemplo clássico de catabolismo altamente ativo, pobremente acoplado às necessidades biossintéticas de crescimento celular (o chamado crescimento desacoplado). O cultivo em baixa velocidade de agitação esteve longe das condições de limitação por glicose, especulando-se que foi a taxa de remoção de algum produto volátil inibitório (muito provavelmente o CO_2 produzido e inibitório à *Zymomonas mobilis*) o fator limitante ao crescimento. Com isso, a melhora da transferência de massa numa maior velocidade de agitação estimulou o crescimento da bactéria, afetando, também, a formação de bioprodutos e obtendo-se o máximo de produtividade a 700 rpm. Admitindo-se que a frutose foi sintetizada a partir da glicose via glicose-6-fosfato, a atividade de fosfoglicose isomerase – a enzima que cataliza a interconversão reversível entre glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato – também apresentou o pico de atividade específica a 700 rpm, correspondendo ao máximo da síntese de frutose. Isto mostra que a fosfoglicose isomerase tem uma função importante no metabolismo de *Zymomonas mobilis*, sendo um componente essencial da rota periférica que traz a frutose para o catabolismo central.

O cultivo de microrganismos geralmente ocorre em meios controlados, de forma a se obter enzimas ou metabólitos desejados. Estes meios, por sua vez, devem conter todos os nutrientes para a síntese das células numa forma assimilável pelo microrganismo. Estes constituintes são água, carbono, nitrogênio, fósforo, enxofre, elementos minerais, fator de crescimento e oxigênio.

Belaich *et al.* (1972) estudaram o efeito da limitação de pantotenato no crescimento de *Zymomonas mobilis*, observando que a limitação deste resulta na redução da velocidade específica de crescimento. Sreekumar e Basappa (1995) citam

que o pantotenato é uma vitamina essencial à produção de etanol porque a bactéria não sintetiza pantotenato, mas necessita desta substância para produzir compostos orgânicos essenciais para o crescimento celular, produzindo, conseqüentemente, etanol.

As características únicas do metabolismo de açúcar da bactéria *Zymomonas mobilis* têm atraído um considerável interesse, servindo como um excelente modelo para as investigações do fluxo glicolítico e sua regulação. As enzimas envolvidas na rota de Entner-Doudoroff constituem mais de 50% do total de proteína das células e cada gene glicolítico é altamente expresso. Recentemente, foi relatado que o fluxo glicolítico é controlado, principalmente, pela atividade da glicose-6-fosfatodehidrogenase, apesar de GLF e gliconoquinase também contribuírem para o controle do fluxo (Sprenger, 1996). Além disso, essa bactéria é capaz de crescer em meio mínimo, tendo como única fonte de nitrogênio asparagina ou glutamina.

Nas fermentações com *Zymomonas mobilis* em meio de cultivo contendo glicose, extrato de levedura, sulfato de amônio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio, quando a glicose é exaurida, cessa-se a utilização da fonte inorgânica de nitrogênio (NH_4) e a bactéria começa a metabolizar os aminoácidos do meio como fonte de carbono, com liberação do nitrogênio na forma de amônia, resultando num aumento do pH do meio. Alimentando-se novamente o meio com glicose após a sua exaustão, o mecanismo que gera o potencial eletroquímico e direciona o processo de transporte de entrada de glicose opera via excreção de prótons com os produtos metabólicos por ação de uma proteína de membrana, a próton-translocante ATPase, fazendo com que o pH do meio de cultivo decresça gradualmente (Ishizaki *et al*, 1994).

Quanto ao metabolismo do nitrogênio por essa bactéria, pouco se sabe, pois poucos são os trabalhos dedicados à fermentação de *Zymomonas mobilis* em meio sintético com somente uma fonte orgânica de nitrogênio (Pinheiro, 2001).

Os microrganismos são capazes de utilizar uma ampla variedade de fontes de nitrogênio para crescimento, mas nem todas as fontes de nitrogênio suportam bem um crescimento. Sanchez e Demain (2002) citam que, em geral, amônia, glutamina e asparagina são boas fontes de nitrogênio, enquanto prolina e uréia são qualificadas como más fontes de nitrogênio. A síntese de enzimas utilizando outras fontes de nitrogênio é reprimida até o substrato primário ser completamente exaurido. A regulação do nitrogênio é de fundamental importância na microbiologia industrial, uma vez que afeta a síntese de enzimas envolvidas tanto no metabolismo primário quanto no secundário. Muitas rotas metabólicas secundárias são negativamente afetadas por fontes

de nitrogênio favoráveis ao crescimento, como os sais de amônio. Como resultado, o meio complexo de fermentação inclui uma fonte de proteína (como farinha de soja) e o meio definido contém um aminoácido lentamente assimilável (como prolina) como fonte de nitrogênio para encorajar a produção de metabólitos secundários.

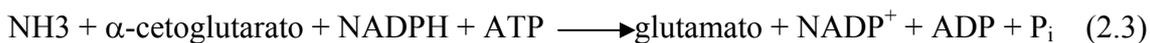
As bactérias podem usar uma grande variedade de componentes como única fonte de nitrogênio, variando de simples componentes inorgânicos, como nitratos, a componentes complexos, como os aminoácidos. As rotas metabólicas para o metabolismo do nitrogênio podem ser divididas em duas classes: a rota necessária para a assimilação do nitrogênio proveniente do meio extracelular e a rota biossintética para a produção intracelular de compostos que contêm nitrogênio.

Os aminoácidos são fontes orgânicas de nitrogênio, sendo mais ricas do que a amônia e o nitrato. Contudo, alguns aminoácidos, tais como a prolina e a leucina, são difíceis de serem metabolizados. Os aminoácidos após a metabolização são incorporados diretamente às proteínas ou catabolisados de acordo com as necessidades da célula em termos de carbono, nitrogênio e energia. Através dessas reações degradativas, os aminoácidos contribuem também para o “pool” de nitrogênio intracelular, por meio de transaminações ou de deaminações, seguido de uma reassimilação da amônia pela ação da glutamato desidrogenase (Oliveira, 1998).

Na bactéria, glutamina e glutamato são os doadores chaves de nitrogênio para a biossíntese. Estes dois aminoácidos recebem seus átomos de nitrogênio por duas rotas: a rota glutamina sintetase/glutamato sintetase (GS/GOGAT) e a rota glutamato desidrogenase (GDH) (Sanchez e Demain, 2002). A glutamina sintetase produz glutamina a partir de glutamato e amônia, enquanto a glutamato sintetase remove o grupo amida da glutamina e o transfere para o α -cetoglutarato, gerando duas moléculas de glutamato.



A reação global pode ser vista como a formação de glutamato a partir de amônia e α -cetoglutarato, na forma



A glutamato desidrogenase catalisa a aminação do α -cetogluturato por amônia, gerando glutamato através de uma reação dependente de NADPH. Esta reação, denominada aminação redutiva, é muito importante, pois o grupo amino (-NH₂) do glutamato pode ser trocado por um átomo de oxigênio de vários compostos orgânicos para convertê-los em aminoácidos, processo esse chamado de transaminação.

Altas concentrações de nitrogênio afetam a síntese de enzimas sensíveis envolvidas no metabolismo primário e secundário, bem como na utilização de diferentes fontes de nitrogênio do meio de fermentação. Devido a isto, várias abordagens têm sido estudadas para se evitar o efeito negativo do nitrogênio na produção de metabólitos. Dentre elas, a manipulação genética é a que tem sido mais utilizada. Pela engenharia genética clássica, é possível isolar linhagens mutantes resistentes ao efeito negativo do nitrogênio. As estratégias incluem isolamento do mutante resistente à inibição do crescimento por amônia e aminoácido análogo ou a seleção de mutantes superprodutores na presença de altas concentrações de amônia. Uma outra maneira de se evitar a regulação por nitrogênio é limitar a concentração da fonte repressiva de nitrogênio no meio de fermentação. Como exemplo, a inclusão na fermentação de um aminoácido lentamente assimilável como fonte de nitrogênio (a prolina, por exemplo) para encorajar a alta produtividade de metabólitos secundários (Sanchez e Demain, 2002).

Morais *et al.* (1993) citam que o caldo fermentado da bactéria *Zymomonas mobilis* possui ação terapêutica contra aftose e doença de Bang (brucelose) em gado bovino e contra furúnculos, feridas purulentas e distúrbios intestinais e ginecológicos em seres humanos, a maioria colites crônicas resistentes a medicamentos quimioterápicos e antibióticos. Tais propriedades medicinais motivam a pesquisa sobre a produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* em função do efeito antagônico desta bactéria, com desaparecimento de seus sintomas e erradicação completa de bactérias patológicas como *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* tipo A, *Proteus morgani*, *Serratia* sp., *Providencia*, *Proteus rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter hafniae*, *Escherichia coli* e *Clostridium* sp. ao final do tratamento terapêutico.

2.4 – Permeabilização de células

A bactéria Gram-negativa, ilustrada na Figura 2.7, tem, além da membrana citoplasmática, uma membrana externa que consiste de fosfolipídeos e lipopolissacarídeos (LPS). Entre a membrana externa e a membrana citoplasmática está uma fina camada de peptidoglicano, formando o suporte para o envelope celular. O espaço periplásmico na bactéria Gram-negativa está entre a membrana plasmática e a membrana externa, principalmente entre a membrana plasmática e a camada de peptidoglicano. De forma a liberar as enzimas e proteínas do espaço periplásmico, a barreira de permeabilidade (membrana externa) deve ser enfraquecida.

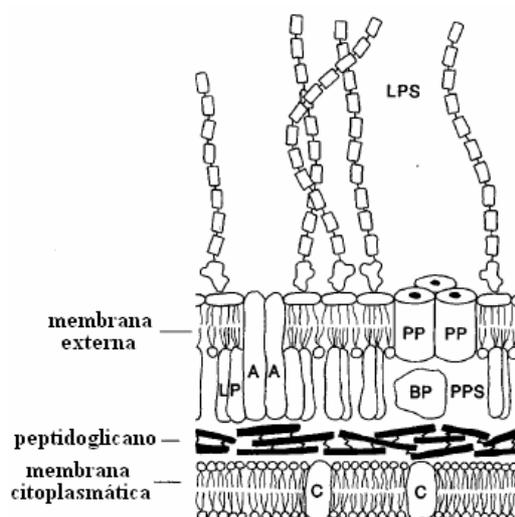


Figura 2.7 – Apresentação esquemática do envelope celular da bactéria Gram-negativa. A – membrana externa; BP – proteína de ligação; C – proteína embutida na membrana citoplasmática; LP – lipoproteína; LPS – lipopolissacarídeo; PP – porina; PPS – espaço periplásmico (Sikkema *et al.*, 1995).

A membrana externa funciona como uma peneira molecular, permitindo a difusão trans-membrana de substâncias com peso molecular baixo, como é o caso dos açúcares, para a região periplásmica. Uma vez nesta região, os açúcares são transportados ativamente para o citoplasma ou então processados pelas enzimas periplásmicas (Pelczar *et al.*, 1980).

Um método ideal para a liberação de uma enzima como a asparaginase deve ser rápido, barato, suave e compatível com etapas de tratamento e purificação. Geckil *et al.* (2005) citam que em muitos estudos relacionados a esta enzima, as células são rompidas por métodos mecânicos, como sonicação, causando muitas desvantagens, como alto

custo e necessidade de mão-de-obra intensiva, tornando-os úteis apenas em escala de laboratório. Além disso, uma vez que as células são rompidas completamente, todo o material intracelular é liberado no meio, contribuindo para a impureza da enzima e tornando a separação uma tarefa difícil, por obter no final uma mistura complexa de proteínas, ácidos nucleicos e fragmentos da parede celular.

A permeabilização de células é uma técnica simples (rápida e branda) que envolve a utilização de agentes capazes de aliviar a resistência da barreira de permeabilidade da membrana celular, facilitando o acesso às enzimas intracelulares. Durante a permeabilização, moléculas pequenas, solúveis em água, como cofatores e íons metálicos, são removidos das células (Bhat *et al.* 1993; Gowda *et al.*, 1991).

Bansal-Mutalik e Gaikar (2003) citam que a permeabilização celular por choque osmótico, em combinação com o uso de EDTA (ácido etileno diaminotetracético), chega a atingir rendimentos de 70% da proteína, sem variação na viabilidade celular. A clivagem seletiva de cadeias glicosídicas da parede celular através combinação de lisozima e EDTA, apesar de eficiente, sofre desvantagens como o alto custo e as dificuldades para a remoção final da lisozima e do EDTA. O uso de EDTA apenas pode causar a liberação específica de enzimas do periplasma da célula, mas com baixos rendimentos, na faixa de 18-50%.

O uso de compostos orgânicos, como solventes (hexano, tolueno, xileno, benzeno, éter), detergentes não-iônicos (Triton), catiônicos (CTAB – brometo de cetil trimetilamônio) e aniônicos (SDS – dodecil sulfato de sódio) e agentes quelantes (EDTA – ácido etileno diaminotetracético) para a liberação das enzimas periplásmicas podem ser vantajosos no que se refere ao custo do processo, causando permeabilização seletiva das barreiras da parede celular e permitindo preparação em larga escala das enzimas periplásmicas numa forma relativamente pura. Apesar dos solventes orgânicos serem menos caros que os detergentes e poderem ser eliminados por evaporação simples, pouca informação está disponível sobre os efeitos das suas propriedades físico-químicas, como a atividade, durante os processos de permeabilização celular.

De Leon *et al* (2003) relatam que as forças eletrostáticas afetam a estrutura da proteína e sua funcionalidade e que as enzimas normalmente são muito flexíveis em solventes com altas constantes dielétricas, como álcool, capaz de induzir a denaturação de muitas enzimas. Outra propriedade do solvente que afeta a atividade da enzima é a hidrofobicidade, comumente medida pelo log P, onde P é o coeficiente de partição do solvente no sistema 1- octanol / água. Observaram que a atividade de PGA (penicilina G

acilase) em células recombinantes de *E. coli* reduziu drasticamente em solventes mais polares (baixos log P), provavelmente devido à denaturação da proteína, enquanto que solventes altamente hidrofóbicos ($\log P > 2$) como clorofórmio, benzeno, tolueno, xileno e hexano foram mais eficientes no aumento da atividade de PGA através de permeação de celular.

O procedimento de permeabilização descrito por Rehr *et al* (1991) para a bactéria *Z. mobilis*, com o detergente aniônico CTAB, é bastante aplicado para as enzimas glicose-frutose oxidoreductase (GFOR) e glicono- δ -lactonase (GL) (Wilberg, 1996; Carra *et al.*, 2005), com algumas modificações. As células tratadas com detergentes catiônicos apresentam atividade da GFOR praticamente igual à dos extratos enzimáticos, o que indica completa permeabilização, já que esta é uma enzima intracelular, localizada no citoplasma da célula. Dentre os detergentes catiônicos que impediram a formação de etanol, o CTAB (0,1% (m/v) por 10 minutos) foi o que apresentou os melhores resultados de permeabilização.

Chun e Rogers (1988) utilizaram tolueno como agente permeabilizante de *Z. mobilis* a uma concentração de 10% (v/v). Mantendo as células nesta solução por 5 minutos, em agitador tipo vortex, alcançam permeabilização suficiente para minimizar a produção de etanol e obter uma alta conversão.

2.5 - Eletroforese de Proteínas

A eletroforese é um método de separação de biomoléculas que tem papel fundamental no desenvolvimento de pesquisa em bioquímica, biologia, química de proteínas, farmacologia, controle de qualidade de alimentos e biologia molecular, entre outras. Está baseada no movimento que é produzido sobre uma determinada molécula carregada eletricamente, quando um campo elétrico é aplicado sobre a mesma. Como as moléculas se movem com velocidade dependente de sua carga, forma e tamanho, a eletroforese tem sido amplamente empregada para a separação de moléculas (Andrews, 1986). Uma representação deste princípio é apresentada na Figura 2.8.

A eletroforese de macromoléculas é geralmente conduzida por aplicação de uma fina camada de amostra em uma solução estabilizada por uma matriz porosa. Sob a influência de um campo elétrico, as diferentes espécies moleculares presentes na amostra se movem através da matriz a diferentes velocidades. No final da separação, as diferentes espécies são detectadas como bandas em diferentes posições na matriz (Rabilloud, 1996).

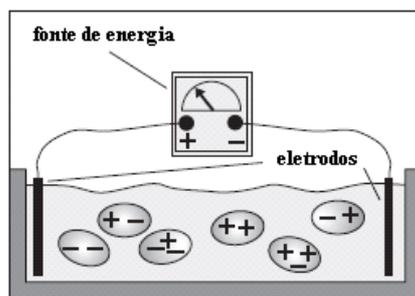


Figura 2.8 – Esquema do princípio eletroforético (Manual de Eletroforese de Proteínas da Amersham Biosciences).

O gel de poliacrilamida (PAGE) é a matriz mais comumente empregada para a separação de proteínas de peso molecular variando de 5000 a 200000 Da. A facilidade com que as proteínas migram através do gel é condicionada pelo tamanho dos poros do mesmo e pelo peso molecular das proteínas. Considerando um determinado tamanho de poro, tem-se que quanto menor for o peso molecular da proteína, mais facilmente ela migrará em relação às proteínas de alto peso molecular.

No sistema proposto por Laemmli (Laemmli, 1970), as proteínas são tratadas previamente com um detergente aniônico (SDS - dodecil sulfato de sódio) que rompe quase todas as interações não-covalentes nas proteínas nativas. A carga negativa adquirida através da ligação com o SDS é em geral muito maior do que a carga da proteína nativa. Os complexos de SDS com proteínas desnaturadas são então submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida. A direção da eletroforese é de cima para baixo, ou seja, do anodo para o catodo. As proteínas pequenas movem-se rapidamente no gel, enquanto as grandes ficam em cima, perto do ponto de aplicação da mistura. Finalmente, as proteínas no gel podem ser visualizadas após coloração com prata ou com um corante como o azul de Coomassie.

2.6 - Controle de Qualidade no Laboratório de Biotecnologia

Como as exigências de qualidade em serviços e produtos vêm se tornando cada vez mais um fator preponderante, é imprescindível que todos os setores estejam atentos a essas mudanças, aos conceitos e às técnicas para a qualidade, aplicando-as na busca de uma melhoria contínua de seus processos. O conceito de qualidade está relacionado a dois elementos principais, que são os requisitos e a conformidade. Os requisitos de qualidade para um produto estão relacionados a sua finalidade ou uso, ou seja, às características que se espera do produto, determinadas pelas expectativas e necessidades

de mercado. A conformidade, por sua vez, está relacionada à capacidade do produto satisfazer as exigências do cliente, ao passo que uma não conformidade se refere ao defeito do produto em relação ao resultado esperado. A ênfase na qualidade freqüentemente conduz a uma melhoria da produtividade e otimização do processo (Pinto *et al.*, 2000).

O controle da qualidade num processo biotecnológico é fundamental porque esta é a única indústria baseada no uso de microrganismos vivos para a fabricação de produtos comercialmente viáveis, independentemente de estes organismos serem geneticamente manipulados ou não. Nos últimos 10 anos, um grande conjunto de produtos foi desenvolvido, com profundo impacto na qualidade de vida do homem (Garnick *et al.*, 1988). A maior distinção entre os produtos da “nova biotecnologia” e os da “biotecnologia clássica” é que os primeiros são constituídos por produtos com um valor extremamente alto, necessários apenas em pequenas quantidades, enquanto que os últimos são geralmente de baixo a médio valor agregado, produzidos geralmente em larga escala. Por isso, a produção desses produtos envolve problemas semelhantes aos das indústrias químicas tradicionais, abordados com técnicas da mecânica dos fluidos, da transferência de calor e de massa, de cinética de reação e dos processos de separação.

A biotecnologia é uma indústria em constante expansão e seus processos são baseados em fontes renováveis. Apesar de os processos biotecnológicos serem basicamente similares aos processos químicos no que diz respeito aos três estágios essenciais (preparação da matéria-prima, reação e recuperação do produto), há algumas diferenças muito importantes. A mais importante delas é a faixa quase infinita de produtos que podem ser produzidos a partir de uma certa matéria-prima, fonte de alimento (substrato) para o crescimento microrganismos, pois o que governa qual produto é produzido pela reação é o microrganismo escolhido para conduzi-la. Mesmo isto não garante a especificidade, pois um mesmo microrganismo crescido num mesmo substrato pode produzir, por exemplo, etanol ou ácido láctico, ou uma enzima particular ou um antibiótico (Webb e Atkinson, 1992). Com isso, devido às diferenças dos processos químicos convencionais, há muitas áreas onde a engenharia (bio)química pode contribuir com o planejamento e otimização dos processos biológicos, tais como a redução da variabilidade do processo e o melhoramento do controle de processo.

A matéria-prima de alguns bioprocessos é originária de agro-produtos naturais, como farinha de soja e de mandioca, sujeitas a variabilidades significativas e não

controladas em sua composição. O monitoramento pode prevenir que estas mudanças venham a interferir no processo.

Registros industriais de contagem microbiana, preparo do meio, conteúdo da mistura ou pH, importantes controles de um processo, apresentam freqüentemente uma série de flutuações temporais, que podem indicar ou não uma tendência. A existência de uma tendência pode ser alarmante, indicando a perda da qualidade ou comprometimento da segurança, requerendo uma ação corretiva. Se as flutuações excederem a faixa considerada segura ou aceitável, uma ação corretiva deve ser conduzida para restaurar o valor médio e trazer as flutuações de volta à faixa permitida. Há casos, entretanto, onde uma inesperada alta contagem microbiana ou a baixa concentração de um importante nutriente, por exemplo, ocorre acima do limite de controle, o que pode ser devido a uma causa conhecida, como falha do equipamento ou erro humano. Mas há casos onde uma causa de origem desconhecida pode implicar num sério problema de qualidade. Gonzalez-Martinez *et al.* (2003) mostram na Figura 2.9 gráficos de controle de qualidade de uma contagem microbiana ao longo de um processo fermentativo nas três condições acima citadas. Na Figura 2.9a, tem-se um processo sob controle, ou seja, dentro dos seus limites inferior e superior de controle, dados pelo valor da média ± 2 vezes o desvio padrão. Na Figura 2.9b, mostra-se um processo totalmente fora de controle, com pontos aleatórios fora dos limites de controle, necessitando que ações corretivas sejam tomadas. Na Figura 2.9c, tem-se apenas um ponto fora do limite de controle, indicando pouca probabilidade de ser um erro aleatório (aproximadamente 5%), ou seja, existe um fator externo que tira o processo de controle e cuja investigação não permite concluir a sua causa. Através da seleção de uma função de distribuição do conjunto de dados, normal ou lognormal, desenvolveram uma planilha em Excel para estimar a probabilidade de uma inesperada alta contagem microbiana a partir dos últimos valores, podendo, também, avaliar a eficácia de mudanças ou melhorias para reduzir o risco de futuros problemas de qualidade.

Os gráficos mostram a importância do monitoramento de quaisquer das etapas do processo para prevenir problemas, uma vez que sem esse acompanhamento o defeito não é observado e ações corretivas não podem ser tomadas para que o processo volte às condições de controle. A complexidade dos sistemas de controle de qualidade é, fundamentalmente, função da amostragem e das características estruturais dos processos de fabricação e do produto final. Assegurar o desenvolvimento, consistência e segurança destes produtos é um dos aspectos mais importantes do processo na indústria

de biotecnologia. A qualidade no controle biotecnológico difere dos sistemas de controle tradicionais nas seguintes áreas: o desenvolvimento e a caracterização da produção de organismos; características significantes relacionadas ao controle dos processos de fermentação e cultivo celular; e o controle de qualidade do processo de purificação/recuperação de produtos finais, obtidos a partir de técnicas da biotecnologia (Garnick *et al.*,1988).

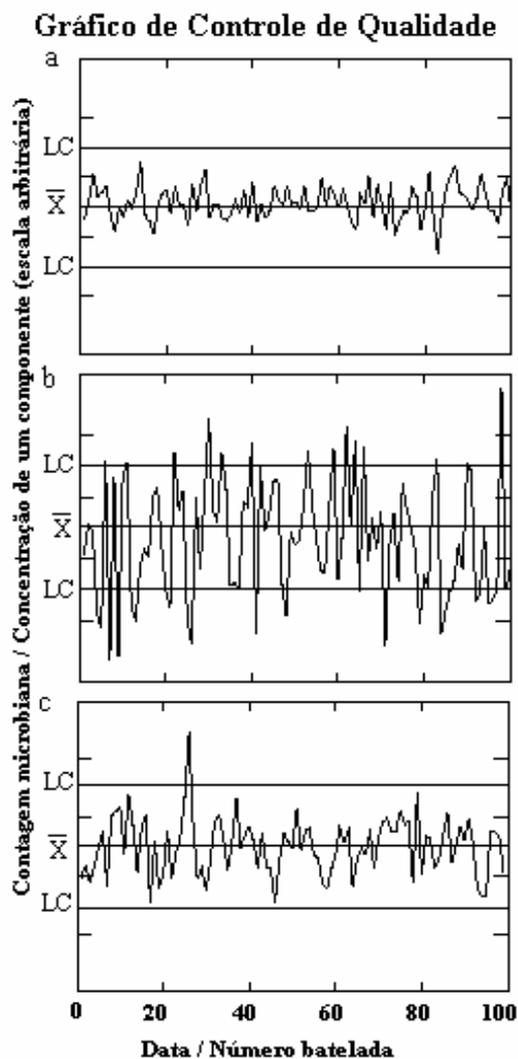


Figura 2.9 – Gráficos típicos de controle de qualidade microbiano. No topo (2.9a), um processo dentro da faixa de controle. No meio (2.9b), processo sem controle, freqüentemente excedendo os limites permitidos. Na base (2.9c), um processo com uma análise fora do limite de controle e sem explicação aparente. LC significa o limite de controle para as medições ($\bar{X} \pm 2 \sigma$) e \bar{X} a média das medidas.

Um inóculo de qualidade e quantidade consistentes é um destes exemplos, uma vez que o mesmo passa por várias etapas de fermentação antes de chegar ao reator propriamente dito (Webb e Atkinson, 1992). Lopes *et al.* (2004) desenvolveram modelos matemáticos para controlar as variáveis ao longo do processo de produção de antibiótico, mostrando que a qualidade da matéria-prima, do microrganismo e do inóculo na fermentação afetam a produção e purificação do produto final, demonstrando a importância da quimiometria no desenvolvimento de bioprocessos. A engenharia de processos não pode esperar os resultados analíticos das concentrações residuais do meio de cultivo para tomar ações corretivas necessárias, uma vez que os métodos analíticos tomam em média de 30 minutos a algumas horas para se ter um resultado. Por esta razão, o controle e monitoramento de parâmetros físicos como densidade ótica, pH e reologia do caldo fermentativo, por exemplo, podem fornecer estimativas para a redução da variabilidade e imprevisibilidade do bioprocessos (Webb e Atkinson, 1992).

Para a realização deste monitoramento do processo, fazem-se necessárias as operações de homogeneização, amostragem, dissolução se necessário e medição propriamente dita em instrumentos específicos. Estas técnicas são extremamente variáveis e necessitam de atenção para que se evitem erros sistemáticos e aleatórios.

O erro aleatório é normalmente gerado por variações imprevisíveis de grandezas que influem no resultado da medição. Embora não seja possível compensar o erro aleatório de um resultado de medição, ele pode ser reduzido aumentando-se o número de observações. O erro sistemático é definido como um componente de erro que, no decorrer de um número de análises do mesmo mensurando, permanece constante ou varia de uma forma previsível. Ele é independente do número de medições feitas e não pode ser reduzido pelo aumento do número de análises, sob condições de medição constantes (EURACHEM/CITAC, 2002). Entre os erros sistemáticos mais comuns estão os erros instrumentais, os erros devido à presença de impurezas, os erros de operação, os erros pessoais e os erros de método. Uma correção ou fator de correção pode ser aplicado para compensar este efeito (Leite, 1996).

Não é difícil imaginar as conseqüências quando, numa análise ou numa avaliação estatística dos resultados medidos, o “positivo” se torna “falso”, ou a margem de incerteza da concentração medida parece ser igual a 100%, e não igual a 10% inicialmente imaginada. A avaliação e validação de métodos analíticos e procedimentos laboratoriais são, dessa forma, de fundamental importância, tendo como base a

utilização de materiais de referência adequados e a participação em testes interlaboratoriais (Zoonen *et al.*, 1999).

Qualidade demanda infra-estrutura, equipamentos, procedimentos operacionais, pessoal e organização do laboratório. Uma das funções dos laboratórios de análise, ensaio e calibração, é permitir o aumento da eficiência do processo e uma melhor avaliação e desenvolvimento da qualidade e segurança de seus produtos e serviços, procurando-se minimizar e/ou eliminar as causas que gerem os erros nas análises efetuadas.

A qualidade de um trabalho analítico é dependente da amostragem, especificidade, sensibilidade, processamento e precisão da técnica, exatidão e representatividade do resultado (McSherry *et al.*, 2003). Além disso, deve-se dar atenção a etapas intermediárias, como amostragem, estocagem, homogeneização, reações químicas e tratamento da amostra, especialmente no caso de análises em que estas etapas contribuem com a incerteza total mais diretamente que a determinação final. Estes fatores devem ser melhorados, garantidos e padronizados pelo analista. Os reagentes e solventes utilizados nos estudos também não devem interferir nos resultados, além de possuírem um tempo e uma área de estocagem adequada. A estocagem garante que a amostra mantém as características físicas e químicas do instante de sua coleta, de tal forma que a análise a ser realizada represente a veracidade do objeto de estudo.

A medida precisa do volume em muitos métodos analíticos é tão importante quanto a medida da massa. Por isso, é preciso considerar alguns pontos imprescindíveis para a medição exata de um determinado volume, como a manutenção dos instrumentos de medição, a qualidade dos instrumentos e a calibração periódica.

A adequação dos métodos analíticos usados no laboratório é de fundamental importância no processo. A obtenção de grandes quantidades de informações de alta qualidade através de menores quantidades de material, menos tempo e poucos recursos tem sido o maior objetivo da química analítica desde a realização das suas primeiras medidas (Valcárcel e Ríos, 1994). O estabelecimento de procedimentos confiáveis a partir de uma série de estudos, planejamentos, avaliações e correções das atividades executadas simultaneamente com material analítico usual de trabalho em laboratório, de forma a assegurar a qualidade da química analítica, é o principal objetivo de uma metodologia analítica padronizada. A qualidade pode ser definida em termos de pureza (dos reagentes e padrões), exatidão e incerteza (para materiais de referência, se

certificados ou não), no próprio funcionamento (propósito, aparato e instrumentos específicos) e na consistência de toda a metodologia analítica utilizada (Valcárcel e Ríos, 1994).

O pilar do processo biotecnológico é o processo de produção a partir de sistemas vivos. As características diretamente relacionadas aos controles de tais processos necessitam ser avaliadas em detalhe. Por exemplo, durante a produção de proteínas por bactérias, é de fundamental importância assegurar a estabilidade genética, a consistência do produto protéico formado e a ausência de contaminação microbiana. Segundo Garnick *et al.* (1988), as características mais importantes para assegurar a qualidade de um processo fermentativo, exemplificando a produção de proteína por um microrganismo geneticamente modificado, são:

- estabilidade genética, evitando que ocorra uma mutação quando se tratar de um enzima manipulada geneticamente;
- rendimento do produto / estabilidade do produto (intra ou extracelular), para evitar ou limitar a suscetibilidade ao ataque de proteases;
- ausência de contaminação, pois a presença de qualquer organismo contaminante, que geralmente é detectado a partir dos efeitos causados na taxa de crescimento, pode causar o término do processo fermentativo;
- condições de cultivo (viabilidade celular / taxa de crescimento, densidade celular), que facilitam a determinação de qualquer alteração no processo;
- condições de fermentação / taxa de crescimento, porque é extremamente importante se ter um processo otimizado para que sejam atingidos requisitos de obtenção e qualidade da proteína alvo;
- condições ambientais, para que sejam evitados riscos de contaminação;
- meio de cultivo, porque em muitos casos trabalha-se com proteínas complexas e aminoácidos;
- glicosilação do produto final, que pode levar a dificuldades de recuperação, bem como baixo rendimento do produto.

Uma das áreas de maior relevância na análise laboratorial é a de realização de ensaios de determinação da atividade biológica de produtos biotecnológicos, uma vez que os ensaios de atividade são os mais suscetíveis a grandes variações na exatidão e precisão (Garnick *et al.*, 1988). Como abordado anteriormente, a confiança nos bioensaios é de fundamental importância para o desenvolvimento e aprovação por

agências reguladoras de novos produtos porque, literalmente, centenas destes ensaios devem ser realizados para desenvolver, validar e controlar novos produtos. Estes ensaios são geralmente utilizados para monitoramento da estabilidade da cultura e necessitam exatidões na faixa de 95-100% e valores de desvio padrão relativo menores que 5%.

A revisão da literatura realizada por Lindholm *et al.* (2003) mostra que, para a produção de medicamentos em particular, há poucos procedimentos que tratam da quantificação em processos biotecnológicos, em contraste com as recomendações feitas pelo FDA (Food and Drug Administration) para os métodos bioanalíticos. As tolerâncias sugeridas para avaliação de parâmetros bioanalíticos são relativamente amplas, com coeficiente de variação (CV) inferior a 15%. Os autores utilizaram as regras de validação estipuladas pelo FDA para os métodos analíticos no processo de síntese enzimática de 9 α -hidroxiprogesterona por *Escherichia coli* em HPLC, investigando a seletividade, linearidade das curvas de calibração, precisão, exatidão, sensibilidade, recuperação e estabilidade do produto. É importante validar a quantificação tanto do substrato quanto do produto durante o processo, em intervalos de tempo definidos, para assegurar o cálculo adequado da cinética do processo; ou seja, dos coeficientes de conversão de substrato e as produtividades. O estudo mostra que, para produtos farmacêuticos, a tolerância de processo pode ser reduzida para 10%, que o padrão interno deve ser suficientemente diferente da estrutura do substrato para não participar do processo enzimático e que a seletividade deve ser checada freqüentemente para se eliminar possíveis variações do branco com o tempo.

A seletividade é a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação cromatográfica dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado não é afetado por esses materiais. Vários testes estatísticos podem ser utilizados para o estudo da seletividade, dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes *F* (Fischer) de homogeneidade de variâncias e o teste *t* (Student) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores

de referência. Normalmente, parte-se da hipótese em que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa. Preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida (INMETRO, 2003).

As curvas de calibração, que representam a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, devem ser analisadas por métodos estatísticos apropriados, como, por exemplo, o cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. A linearidade do método é confirmada pela avaliação do coeficiente de correlação do analito (composto químico a ser mensurado) na amostra, com no mínimo 5 concentrações diferentes.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (ANVISA, 2003). Uma definição mais completa envolve não apenas a amostragem múltipla, mas a repetição do procedimento analítico. Assim, pode-se definir precisão como a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de repetições do procedimento analítico de uma mesma amostra. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. O coeficiente de variação, por sua vez, é a relação entre o desvio padrão e a média determinada. Segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da ANVISA (2003), o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite inferior de quantificação (LIQ), para o qual se admitem valores menores ou iguais a 20%. Entende-se por limite de quantificação a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais.

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. É expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (a partir de, no mínimo, 9 determinações) e a concentração teórica correspondente.

Para qualquer análise química, Leite (1996) menciona que, em termos de desvios, à medida em que se aumenta a sensibilidade, ou seja, diminui-se a massa analisada, os desvios tornam-se maiores e a variabilidade tende a aumentar. A Tabela 2.3 apresenta uma correlação entre concentração e coeficiente de variação para comparações interlaboratoriais. O aumento das concentrações diminui o valor do coeficiente de variação.

Tabela 2.3 – Valores máximos do coeficiente de variação em função da concentração para garantir um processo analítico estável (Leite, 1996).

Concentração	Coeficiente de variação (CV)
1 µg/kg (1 ppb)	45
10 µg/kg (10 ppb)	32
100 µg/kg (100 ppb)	23
1 mg/kg (1 ppm)	16

O limite de detecção (sensibilidade) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. É detectado por meio de análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável.

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Seu cálculo deve ser realizado em função da relação de área do padrão extraído e não extraído.

A maioria das técnicas analíticas usadas para a aplicação no controle de qualidade são baseadas em testes interlaboratoriais, fazendo-se uma estimativa da repetitividade e reprodutibilidade entre os laboratórios para se conhecer a segurança com a qual um resultado obtido pode ser repetido pelo mesmo analista, por outros analistas no mesmo laboratório, assim como por diferentes analistas em distintos laboratórios (Leite, 1996; Quevauviller *et al.*, 1999).

Elementos essenciais aos sistemas da qualidade num laboratório analítico, as Boas Práticas de Laboratório (BPL) são conjuntos de regulamentações, procedimentos operacionais e práticas de cumprimento obrigatório que são estabelecidas pelo Manual da Qualidade e pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) de forma a garantir a qualidade na informação gerada pelos laboratórios. Estas práticas permitem a avaliação externa via Qualidade Assegurada (QA) e são constituídas pelos Procedimentos Operacionais

Padrões (POP), que são descrições detalhadas de operações específicas realizadas no laboratório, incluindo desde a recepção das amostras até o arquivamento dos resultados de análise. A acreditação do Laboratório, como no sistema ISSO 17025, por exemplo, é o reconhecimento da competência do laboratório analítico em conduzir análises específicas (Valcárcel e Rios, 1994).

Quando a interpretação e avaliação dos resultados analíticos não têm nenhuma base estatística, não fica claro quão significantes eles são e qual é de fato a sua utilidade. Na prática de um laboratório deve-se considerar o planejamento racional de amostragem, os métodos de validação, os instrumentos e procedimentos laboratoriais, a exatidão e precisão das concentrações medidas e a comparação dos resultados do laboratório com informações produzidas. A partir de ferramentas estatísticas, pode-se definir qual o erro envolvido em determinado conjunto de dados e sua distribuição estatística.

Uma medida experimental apresenta incertezas porque em um processo de medição todas as etapas apresentam variabilidade ou imperfeições, seja na matéria-prima utilizada, no equipamento, na técnica utilizada, na escala ou até mesmo no próprio analista. É, portanto, necessário que haja um procedimento prontamente implementado, facilmente compreendido e de aceitação geral para caracterizar a qualidade de um resultado de uma medição, isto é, para avaliar e expressar a sua incerteza.

De acordo com a amostra a ser analisada, uma metodologia apropriada deve ser desenvolvida (tendo-se em mente que as fontes de variabilidade devido a vários tipos de interferência devem ser eliminadas ou controladas), calibrada e monitorada de forma oportuna, utilizando-se um CRM (material de referência certificado). O processo ou procedimento analítico pode ser mantido sobre controle por gráficos de controle estatístico, que devem auxiliar a estabelecer a reprodutibilidade dos resultados (McSheery *et al.*, 2003).

Os erros existentes num processo de análise laboratorial se devem a duas fontes principais de variação: os erros determinados ou sistemáticos, que ocorrem regularmente e são mais ou menos constantes em quantidade, podendo ser, quando conhecidos, avaliados e corrigidos; e os erros indeterminados ou aleatórios, que ocorrem de forma casual e não possuem valores definidos, sendo considerados apenas através de procedimentos estatísticos. Assim, aos pesquisadores e estatísticos compete a

identificação e quantificação dos erros associados às fontes de variação, garantindo o controle, assim como a qualidade na mensuração correta ou verdadeira.

2.7 – Ferramentas Estatísticas

A estatística é a ciência que lida com a coleta, o processamento e a interpretação dos dados, facilitando o estabelecimento de conclusões confiáveis sobre o estado da qualidade do processo. Por este motivo, o Controle de Qualidade (CQ) e a monitoração da precisão e da exatidão é muitas vezes denominado Controle Estatístico do Processo.

A validação de um método é um importante componente na determinação da confiabilidade e reprodutibilidade de um resultado bioanalítico, e uma exigência de todo sistema regulatório. A política do FDA (*Food and Drug Administration*) declara que, para cada método analítico utilizado para quantificar concentrações de um medicamento/droga a partir de fluidos biológicos, parâmetros analíticos específicos devem ser determinados com relação à exatidão, linearidade, precisão, sensibilidades, especificidade e recuperação (Lang e Bolton, 1991). Estes procedimentos também estão referenciados no manual de bioequivalência da Anvisa (www.anvisa.org.br/legislacao). No planejamento de um novo método bioanalítico, o mesmo deve seguir todos os parâmetros da exigência regulatória e possuir confiabilidade metrológica através da incorporação de técnicas que permitam a avaliação do seu desempenho. Também deve ser incorporada uma validação contínua para monitorar a reprodutibilidade do método em função do tempo.

A exatidão de uma determinação analítica pode ser validada somente através da comparação do resultado com diferentes técnicas analíticas dentro do Laboratório, com a comparação do resultado com procedimentos analíticos conduzidos em outros Laboratórios ou através do uso de CRMs (certificação de materiais de referência) certificados, que capacitam a calibração, rastreabilidade e exatidão a ser determinada, bem como a validação de novos métodos a serem desenvolvidos (ANVISA, 2002).

A precisão de um método analítico descreve a proximidade entre as diferentes medidas individuais de uma amostra. O parâmetro repetitividade da precisão é obtido quando as amostras são preparadas nas mesmas condições de manuseio: lote, operador, equipamento, instrumento e ocasião. Quando as amostras são preparadas em diferentes condições de manuseio, o parâmetro da precisão medida é a reprodutibilidade. No desenvolvimento do método, a precisão deve ser determinada usando um mínimo de 3

pontos da variável de interesse, em toda faixa de estudo, com 5 repetições (ANVISA, 2002).

O método analítico em desenvolvimento deve atender os requisitos de sensibilidade e limites de detecção e quantificação planejados. Dessa forma, é necessário determinar a relação concentração da amostra versus resposta do detetor, visando a determinação da faixa de concentração onde a resposta é linear e os respectivos limites de quantificação.

Um número suficiente de padrões deve ser usado para definir adequadamente a relação entre concentração e resposta. Uma curva de calibração deve conter no mínimo 5 amostras, cobrindo uniformemente a faixa esperada. O modelo mais simples que descreve adequadamente a relação concentração/resposta deve ser usado (EURACHEM/CITAC, 2002).

Especificidade é a busca individualizada do sinal de uma única espécie do analito, enquanto seletividade é a capacidade de um método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros compostos na amostra, denominados de interferentes, que podem ser originados de fontes endógenas ou exógenas. Uma vez que o método esteja no estágio de validação, o teste de seletividade deve assegurar níveis e reprodutibilidade dos interferentes e seu impacto na precisão e exatidão do método em relação ao limite de quantificação.

Segundo Lang e Bolton (1991), a validação propriamente dita consiste na condução de corridas analíticas geradas em dias separados, envolvendo dois analistas, onde cada analista tem a responsabilidade de ajudar a determinar o desempenho e reprodutibilidade do método, além de avaliar possíveis problemas ao longo do ensaio. A partir dos dados gerados, parâmetros analíticos específicos são relatados, incluindo linearidade, exatidão, precisão, sensibilidade e recuperação. A partir da curva padrão, a inclinação, interseção, coeficiente de correlação e variância são monitorados. Análises estatísticas são utilizadas para determinar as variâncias na corrida e entre corridas, bem como para demonstrar a expectativa do método no desempenho da análise diária. A partir dos resultados de concentração e baseado no controle de qualidade inicial dos dados, critérios de aceitação são estabelecidos. Corridas analíticas posteriores são monitoradas durante o estudo propriamente dito para determinar se os dados gerados são válidos. Segundo estes autores, muitos problemas potenciais podem ser encontrados no processo de validação a partir da avaliação estatística do dado analítico.

A incerteza é um parâmetro que, associado com o resultado da medida, caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao mensurando, ou seja, é um parâmetro que define a qualidade dos resultados medidos. A abordagem da ISO para o cálculo da incerteza é definida em quatro principais etapas, definidas na Figura 2.10.

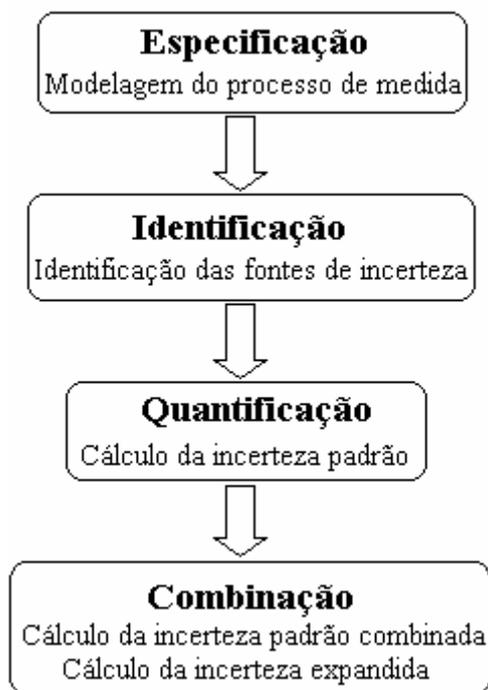


Figura 2.10 – Etapas básicas para o cálculo da medida da incerteza abordada pela ISO (Maroto *et al.*, 1999).

A etapa de especificação visa obter a relação entre o resultado analítico e os parâmetros dos quais o resultado analítico depende. Isto significa que o resultado analítico (y) pode ser descrito como uma função baseada nas variáveis experimentais (x_1, x_2, \dots, x_n)

$$y = f(x_1, \dots, x_n) \quad (2.4)$$

Normalmente, as dificuldades de se formalizar a relação algébrica entre os resultados analíticos e os parâmetros que intervêm no procedimento analítico se tornam claras. Neste caso, a etapa de especificação é feita em diferentes etapas nas quais o procedimento de medida pode ser detalhado como, por exemplo, amostragem, etapas de processamento, medida instrumental, etc.

A etapa de identificação, como o próprio nome diz, visa identificar todas as fontes de incerteza presentes em diferentes etapas do procedimento analítico. Todos os componentes da incerteza em que se espera ter uma contribuição significativa para a incerteza global são quantificados (etapa de quantificação). Estes componentes podem ser quantificados a partir de trabalho experimental (incerteza tipo A) ou por utilização de informação prévia ou por experiência do analista (incerteza tipo B).

A incerteza tipo A é estimada com base na distribuição estatística dos resultados das séries de medições e pode ser caracterizada por desvios padrão experimentais, que é uma estimativa não tendenciosa para o desvio padrão. A incerteza tipo B, que também pode ser caracterizada por desvios padrões, é avaliada por meio de distribuição de probabilidades para valores possíveis da grandeza, baseada na experiência ou em outras informações, sendo que esta escolha deve incorporar toda informação disponível sobre o mensurando e a medição (Vuolo, 1998).

Apesar de ser uma metodologia bem estruturada, originalmente desenvolvida para estimar a incerteza em medidas físicas e, subseqüentemente, adaptada aos processos químicos, o número de fontes potenciais de erro nas medidas químicas e a estrutura dos erros, principalmente os aleatórios, torna difícil a geração de estimativas válidas para as incertezas químicas. Além disso, o desenvolvimento de experimentos que podem caracterizar com exatidão a influência das incertezas no método e outros efeitos sistemáticos é bastante complexo. Por essa razão, o analista é impulsionado a fazer estimativas baseadas em dados anteriores ou na experiência prévia (incerteza tipo B) as quais, por serem fundamentadas no conhecimento de um especialista ou por um senso comum, podem ser consideravelmente diferentes das estimações de outros analistas devido às dificuldades de um completo entendimento dos métodos químicos de medida. Ao mesmo tempo, a aplicação dessa abordagem na rotina de medidas químicas envolve custos e esforços significativos.

O resultado de uma medição, após a correção dos efeitos sistemáticos reconhecidos, é ainda tão somente uma estimativa do valor do mensurando por causa da incerteza proveniente dos efeitos aleatórios e da correção imperfeita do resultado para efeitos sistemáticos. O erro aleatório é minimizado pelo controle de fatores externos e pela repetição de medidas. Em análises químicas, as etapas analíticas de extração, derivatização, separação e detecção são passíveis de erros, os quais não podem ser observados pelo analista. Fontes de contaminação, perda ou degradação do analito, erros na calibração e interferência podem contribuir para afetar o resultado. Os erros

sistemáticos, que ocorrem continuamente e são controlados experimentalmente até onde possível, distorcem o valor verdadeiro da determinação, causando inexatidão. A incerteza de um resultado pode ser baixa e, a menos que o resultado seja verificado com o procedimento de controle de qualidade, a mesma pode não ser detectada. Os erros aleatórios causam uma alta incerteza e são observados pelo analista, que tem a responsabilidade de verificar cada etapa de estágio do procedimento analítico para tentar eliminar ou controlar a fonte de erro. Eles refletem as incertezas inevitáveis em todas as medidas, tornando necessário o procedimento estatístico.

A incerteza que surge de uma variação experimental ao se aplicar um procedimento analítico para futuros resultados de medida é associada à influência dos diferentes valores da corrida e aos erros aleatórios que surgem (Maroto *et al.*, 1999). Em qualquer procedimento experimental, vários fatores ou variáveis experimentais podem influenciar o resultado. Para isso, uma varredura experimental deve ser elaborado de forma a determinar as variáveis experimentais e interações que têm significativa influência no resultado e na medida, em uma ou em muitas respostas.

A normalização dos procedimentos e serviços tem sido utilizada cada vez mais como um meio para se alcançar a redução do custo da produção e do produto final, mantendo-se ou melhorando a qualidade. Segundo as normas da ABNT, os seus benefícios qualitativos e quantitativos são explicitados na Tabela 2.4 a seguir.

Tabela 2.4 – Benefícios que a normalização permite.

Qualitativos	Quantitativos
➤ utilização adequada dos recursos (equipamentos, materiais e mão-de-obra)	➤ redução do consumo de materiais ➤ redução do desperdício
➤ uniformização da produção	➤ padronização dos componentes
➤ facilitação do treinamento da mão-de-obra	➤ padronização dos equipamentos
➤ registro do conhecimento tecnológico	➤ redução da variedade de produtos
➤ facilitação de contratação ou venda de tecnologia	➤ fornecimento de procedimentos para cálculos e projetos
	➤ aumento da produtividade
	➤ melhoria de qualidade
	➤ controle de processo

Um dos métodos mais utilizados e reconhecidos internacionalmente para a manutenção do controle da qualidade é a comparação interlaboratorial, que tem provado ser uma ferramenta bastante útil na detecção de erros sistemáticos em análises. Nestes testes, distribui-se uma amostra comum para todos os Laboratórios participantes do programa. Isto faz com que os erros de amostragem, caso a homogeneização da amostra seja garantida, sejam eliminados e apenas os erros associados com o Laboratório e o procedimento analítico sejam encontrados, se todos utilizarem o mesmo procedimento. Pode-se, assim, definir que metodologia de análise deve ser seguida, que controles devem ser feitos e quais métodos estatísticos se adaptam melhor à realidade local, permitindo desenvolver critérios de comparação para discutir problemas comuns (McSheery *et al.*, 2003).

De acordo com o guia EURACHEM/CITAC (2002), as fontes típicas de incerteza são:

- amostragem. Quando amostragem formam parte do procedimento especificado, efeitos como variação aleatória entre diferentes amostras e qualquer potencial para gerar uma tendência nas amostragens formam componentes de incerteza, afetando o resultado final;
- condições de armazenamento. Quando os itens de ensaio são armazenados por algum período anterior à análise, as condições deste armazenamento podem afetar o resultado;
- efeitos de instrumentos, que podem incluir, por exemplo, os limites de exatidão da calibração de um balança analítica, um controlador de temperatura que deve manter uma temperatura média que difere de seu ponto de ajustagem indicado, um auto-analisador que esteja sujeito a efeitos de carreamento, etc;
- pureza do reagente, já que a pureza de muitas substância é declarada pelos fabricantes como sendo não inferior a um valor especificado. Muitos corantes orgânicos, por exemplo, não são 100% puros e podem conter isômeros e sais orgânicos;
- estequiometria assumida, podendo ser necessário se tolerar desvios em relação à estequiometria esperada, ou reações incompletas, ou reações colaterais;
- condições de medição, onde grandes efeitos em função da temperatura devem ser corrigidos, mas qualquer incerteza quanto à temperatura do

líquido e da vidraria dever ser considerada. Analogamente, a umidade pode ser importante no caso de materiais sensíveis às possíveis alterações de umidade. Outros fatores que devem ser levados em conta são a força iônica e a acidez da amostra;

- efeitos da amostra, pois a estabilidade de uma amostra/analito pode variar durante a análise por conta de alteração do regime termal ou efeito fotolítico;
- efeitos computacionais, onde a seleção errada de um modelo de calibração leva a uma correlação menor e a uma incerteza maior. Corte e arredondamento de algarismos podem levar a inexatidões no resultado final e, como são raramente previsíveis, pode ser necessária a consideração de uma incerteza;
- correção de branco, onde haverá uma incerteza tanto no valor quanto na adequação da correção do branco. Isto é particularmente importante na análise de traço;
- efeitos do operador, como a possibilidade de leitura de uma escala consistentemente acima ou abaixo do valor indicado ou a possibilidade de haver uma interpretação ligeiramente diferente do método;
- efeitos aleatórios, que contribuem para a incerteza em todas as determinações.

As medidas analíticas podem ser conduzidas por técnicas instrumentais altamente sofisticadas ou por procedimentos gravimétricos ou volumétricos clássicos, todos produzindo resultados influenciados por erros aleatórios. Por essa razão, os resultados devem ser apresentados com intervalos de confiança de forma a descrever a dispersão natural. A estimação correta dos parâmetros do intervalo de confiança é um desafio somente atingido depois da validação do método.

Em geral, a incerteza padrão originada de efeitos aleatórios é medida a partir de experimentos de repetitividade e quantificada em termos de desvio padrão dos valores médios.

Em adição aos fatores analíticos que introduzem variação sistemática e variação aleatória nos procedimentos analíticos, os resultados do laboratório também estão sujeitos a erros grosseiros ou enganos que geram um grande desvio nos resultados. Este tipo de erro é aleatório e gera resultados discrepantes, muitas vezes devido a enganos ou trocas, que não são consideradas erros estatísticos.

Em muitas situações pode ser difícil distinguir se um resultado incorreto é devido a um erro analítico ou a um engano, mas é fundamental aplicar todos os esforços para a identificar e eliminar a causa do erro, criando condições para prevenir sua recorrência.

As causas primárias destes erros são:

- incorreções na escolha dos processos analíticos, sendo importante a utilização de um procedimento já definido;
- desvios dos procedimentos prescritos (modificações nas etapas do ensaio, uso de recipiente ou equipamento incorreto), que podem ser observados a partir da validação do método pré-estabelecido;
- repetidas preparações incorretas de amostras e padrões;
- equipamento com defeito ou ajustado incorretamente;
- erros aritméticos sistemáticos;
- erros nos cálculos;
- erros na transmissão e na interpretação da informação.

O monitoramento regular dos testes de laboratório utiliza limites de variação preestabelecidos e se baseia em probabilidades estatísticas. Como não podemos eliminar totalmente a variabilidade analítica, devemos criar condições para exercer seu monitoramento e procurar mantê-la dentro de limites aceitáveis, a fim de que os resultados obtidos sejam úteis para o diagnóstico e o tratamento. Os limites aceitáveis de variação definem o nível da qualidade do processo analítico.

Quando medições repetidas de um material estável sob condições idênticas (o mesmo operador, usando os mesmos equipamentos e reagentes) são realizadas, obtêm-se uma série de resultados diferentes decorrentes da variação aleatória que ocorre em todo o processo de medida. Muitas são as causas desta variabilidade, que é decorrente de mudanças nas condições em que as medidas são realizadas. Estas variações podem ser devidas a diferenças no comportamento dos reagentes, na calibração e desempenho dos equipamentos, nos métodos de trabalho, nas condições ambientais e no desempenho dos operadores envolvidos no processo. Assim, existem diversos fatores no processo analítico que podem afetar as características da qualidade, podendo produzir resultados com defeitos ou resultados não conformes, também chamados resultados fora de controle. Como não é possível eliminar a variabilidade totalmente, o controle da qualidade tem a função de medi-la e mantê-la dentro de limites aceitáveis, sem comprometer os resultados.

Uma parcela importante dos procedimentos de garantia da qualidade consiste na prevenção de erros obtida pela otimização dos processos operacionais. Toda a base do controle da qualidade assume que a distribuição dos resultados é gaussiana e, para que todos os resultados obtidos possam ser analisados corretamente, deve-se ter a certeza da distribuição e de que fatores como resultados discrepantes (outliers), desvios, variação não aleatória, instabilidade do sistema analítico, procedimentos de análise mal conduzidos e outras causas que produzem erros grosseiros não estejam ocorrendo. E, quanto mais organizado é o laboratório, maiores são as possibilidades de eliminar a ocorrência desses erros.

A elaboração de um protocolo de qualidade permite uma abordagem simplificada das Ferramentas da Qualidade, visando a implantação de uma gestão voltada para a qualidade dentro de um laboratório de ensaios químicos, enfocando características como higiene e segurança no laboratório, a limpeza, ajuste, manutenção e instruções de uso dos equipamentos, preparo de soluções, manutenção e identificação dos microrganismos, cuidados ao longo de um processo de fermentação para que se atinja a repetitividade e reprodutibilidade (qualidade e confiabilidade), armazenamento, registro de dados (controle e monitoramento) e controle estatístico, sem que seja necessária a certificação do mesmo.

Os trabalhos na literatura demonstram pouco conhecimento na regulação pelo nitrogênio da bactéria *Zymomonas mobilis* e a busca incessante por novas fontes produtoras da enzima asparaginase de ação antilinfoma, cuja principal característica é a alta afinidade pelo seu substrato, a asparagina. Este trabalho efetua uma varredura sobre diferentes fontes de nitrogênio na capacidade de síntese da enzima asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis*, descoberta que gerou o desenvolvimento em nosso laboratório da patente PI0404952-7 (Abud *et al.*, 2004). Para dar confiabilidade analítica ao processo estudado, e por falta de trabalhos que conduzam a um processo com qualidade, também são realizados estudos, etapa por etapa, de mecanismos que podem ser utilizados para se atingir um processo repetitivo e reprodutível.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as metodologias analíticas utilizadas nos experimentos para avaliação do processo de produção da enzima asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis*, técnicas de permeabilização e eletroforese de proteína em gel SDS-PAGE.

3.1 – Microrganismo e Composição do Meio

O microrganismo utilizado neste trabalho é a bactéria *Zymomonas mobilis* linhagem CP4 (ATCC 31821), fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e armazenadas a 4°C em meio contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de extrato de levedura.

A manutenção é feita em meio contendo 10 g/L de glicose e 5 g/L de extrato de levedura. Após a inoculação, as células são incubadas por 24 horas a 30 °C e, então, estocadas a 4 °C. Para melhor conservação da cultura, repiques são feitos, em média, a cada três meses. Também se mantém o microrganismo em placas contendo 10 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e 15 g/L de ágar.

O meio sintético de crescimento utilizado nas fermentações é igual àquele definido por Pinheiro (2001), variando-se as concentrações de glicose e de L-asparagina. Em alguns casos, para se avaliar o efeito da fonte de nitrogênio, substitui-se a L-asparagina por sulfato de amônio e por aspartato. Nos estudos de otimização do meio de cultura, além de variar as concentrações, variam-se também as fontes de carbono e de nitrogênio.

A Tabela 3.1 apresenta a composição do meio de crescimento sintético usado nas fermentações. Os seus componentes são dissolvidos em água milli-Q e esterilizados separadamente em grupos (sulfatos, fosfatos, cloretos, glicose, L-asparagina, pantotenato e sulfato ferroso) a 121°C por 20 minutos e misturadas a frio, assepticamente. A amostra de sulfato ferroso tem o seu pH ajustado para 3,0 a fim de se evitar a precipitação do mesmo.

Tabela 3.1 – Composição do meio sintético de crescimento

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,25 mg/L
KCl	8,0 mg/L
NaCl	8,0 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,2 mg/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,7 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,0 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 mg/L
K ₂ HPO ₄	1,75 g/L
KH ₂ PO ₄	3,5 g/L
Glicose	1 – 50 g/L
L-asparagina	0,5 g/L
Pantotenato de cálcio	10 mg/L

3.2 – Cultivo

Os ensaios realizados com *Zymomonas mobilis* foram conduzidos em estufa a 30 ± 2°C, sem agitação e sem controle de pH. O preparo do inóculo nestes ensaios segue o esquema ilustrado na Figura 3.1, a não ser nos estudos relativos à determinação do percentual de inóculo a ser utilizado nos ensaios.

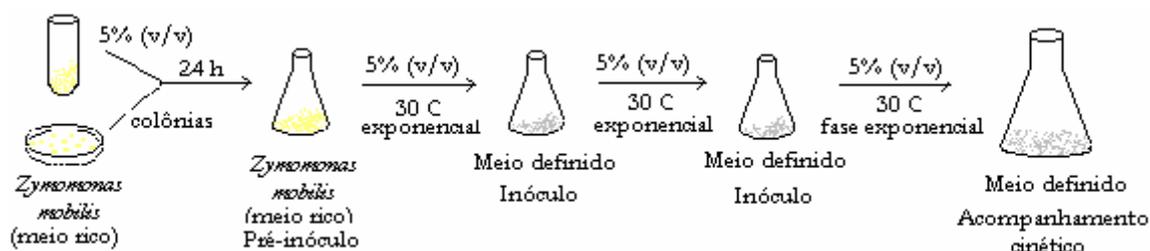


Figura 3.1 – Esquema de preparo de inóculo e cultivo.

Da cultura armazenada em geladeira, em meio rico, faz-se o pré-inóculo em novo meio rico para a reativação das células. Acompanhando-se o crescimento a partir da medida da densidade ótica e de um gráfico do tempo versus esta medida, sabe-se o instante em que as células estão na fase exponencial de crescimento, realizando-se, então, a passagem destas células para uma nova etapa de meio de cultivo, agora em meio definido. Repete-se este procedimento mais uma vez para que as células se

adequem ao novo meio, partindo-se, em seguida, para o acompanhamento da cinética de fermentação.

Para ilustrar o comportamento do crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* frente aos meios rico e definido, é apresentada a Figura 3.2, com fotos obtidas em cultivos antes e após o crescimento bacteriano.

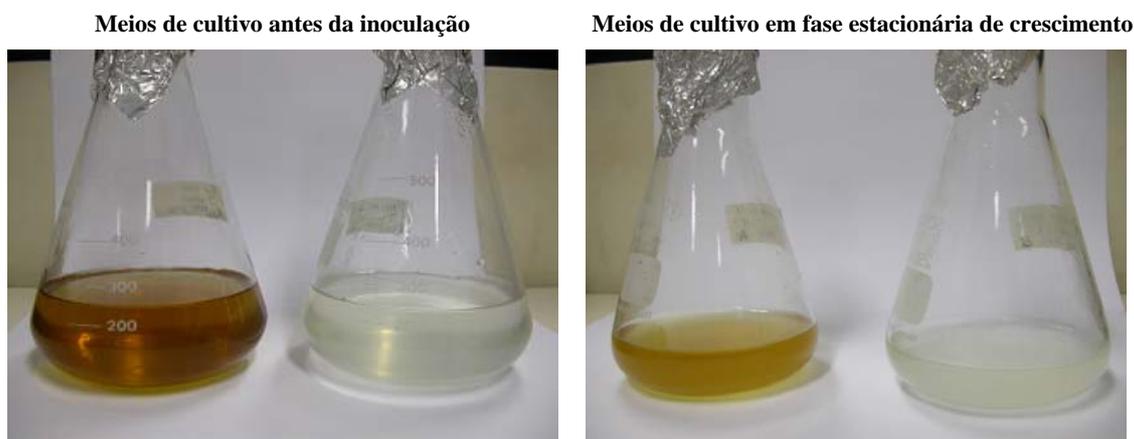


Figura 3.2 – Meios rico e definido antes e após o crescimento celular.

A Figura 3.3 apresenta um frasco de final de cultivo em meio rico com algumas células decantadas no fundo do mesmo.



Figura 3.3 – Células de *Zymomonas mobilis* ao final de um cultivo em meio rico.

3.3 – Metodologia Analítica

Durante os ensaios, acompanha-se, através de retiradas assépticas periódicas de amostras, o pH, a concentração celular (X), a concentração de glicose (G), a

concentração de L-asparagina (Asn), a concentração de aspartato (Asp), a concentração de etanol (E) e a atividade de L-asparaginase nas células (Ativ).

O esquema de tratamento analítico das amostras está representado na Figura 3.4.

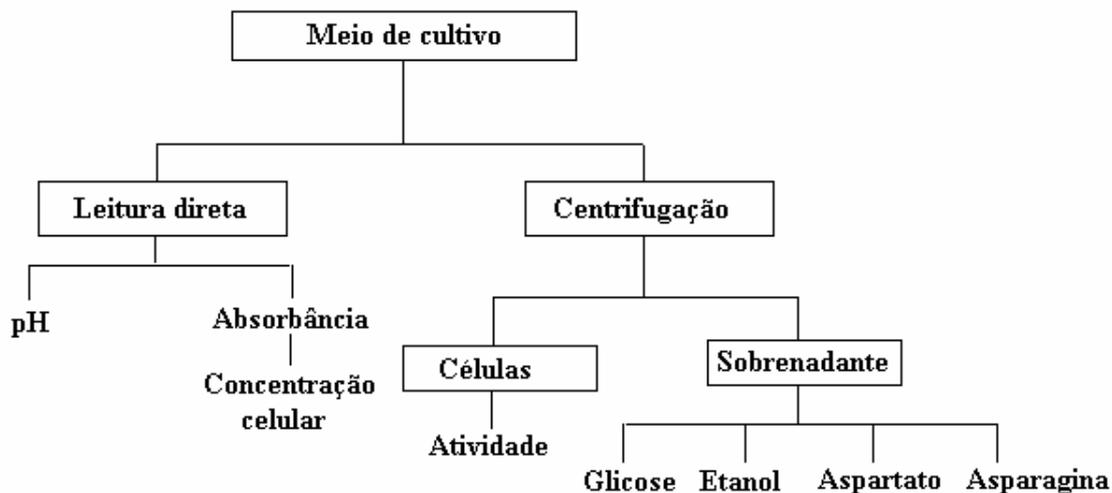


Figura 3.4 – Esquema de coleta e tratamento analítico das amostras.

Os ensaios de permeabilização e eletroforese de proteínas são realizados a partir das células centrifugadas, visando confirmar a presença da enzima L-asparaginase.

3.3.1 – Concentração Celular

A concentração de células é determinada através da medição da absorbância do meio de cultura (Abs) no espectrofotômetro Spectronic 20D+ a 600nm e convertida para concentração através da curva de calibração obtida por gravimetria (peso seco).

Para a análise de peso seco, após a fase exponencial de crescimento, 40 mL do meio de cultivo (V_0) são colhidos sob agitação constante e centrifugados, lavados com NaCl 0,85% e ressuspensos em um pequeno volume de água destilada.

A suspensão de células assim obtida é transferida para um recipiente de papel de alumínio previamente pesado (M_p) e levada para estufa a 85 °C por cerca de 24 horas, até apresentar peso constante (M_a).

Paralelamente, alíquotas do meio de cultivo são diluídas em água destilada, obtendo-se concentrações de amostra de 0,02 a 0,4 g/L. A absorbância destas soluções é medida a 600 nm.

A concentração de células em cada solução é dada pela expressão:

$$X = \frac{(M_a - M_p)}{V_o} \cdot \text{fator de diluição} \quad (3.1)$$

onde os valores de M_a , M_p , V_o são obtidos como indicado no texto.

A curva de calibração é obtida a partir da representação das medidas de absorbância em relação à concentração de células nas amostras, como mostra o exemplo da Figura 3.5. Para determinar a concentração de células nos meios de cultivo, as medidas de absorbância são realizadas, observando-se sempre a faixa de linearidade da curva.

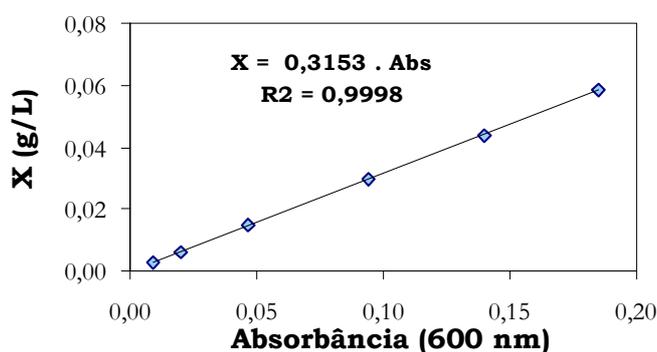


Figura 3.5 – Curva de calibração da concentração de células para o cultivo de *Z. mobilis*.

3.3.2 – Concentração de Glicose

A concentração de glicose é determinada no sobrenadante recolhido da centrifugação através do método enzimático-colorimétrico glicose-oxidase-peroxidase (GOD-POD), a partir do kit de Glicose SL da CELM (Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos). Este kit é composto de reativo tampão fenol/fosfato pH 7,4, de uma solução estabilizada de enzimas glicose-oxidase, peroxidase e 4-aminofenazona e de uma solução padrão de glicose de 100 mg/dL. O reativo de trabalho é feito a partir da mistura do tampão com a solução de enzimas.

Adiciona-se a cada tubo 40 μL de amostra e 4,0 mL do reativo de trabalho. No branco, não se adiciona amostra, apenas 4,0 mL do reativo de trabalho. Paralelamente, é realizada a leitura com 40 μL da amostra padrão de glicose e 4,0 mL do reativo de trabalho. Os tubos são incubados a 37°C por 30 minutos.

As amostras são lidas em espectrofotômetro a 505 nm, tendo como zero do espectrofotômetro o branco. A concentração de glicose é calculada pela expressão:

$$\text{Glicose (g/L)} = \frac{\text{Absorbância amostra}}{\text{Absorbância padrão}} \cdot \text{fator de diluição} \quad (3.2)$$

Para verificar a eficiência e/ou interferência do kit, fez-se uma curva de calibração construída com base numa solução de glicose, nas faixas de 0,1 a 1,0 g/L e não se observou diferença significativa nos valores de concentração obtidos.

3.3.3 – Concentração de L-asparagina e L-aspartato

Inicialmente, a concentração de asparagina foi determinada conforme proposta de Pinheiro (2001), baseado na metodologia descrita por Sheng *et al.* (1993).

Colocava-se 0,2 mL de amostra centrifugada do meio em presença de 9,8 mL de uma solução de ninhidrina em álcool etílico absoluto 0,05% (m/V) e realizava-se a leitura em espectrofotômetro a cada minuto, ao longo de 7 minutos, a 350 nm.

A partir dos coeficientes angulares da reta, obtinham-se os valores de velocidade de reação. A concentração de asparagina era determinada com base numa curva padrão de asparagina com concentrações conhecidas, em função da velocidade de reação, onde também era realizada a medida espectrofotométrica ao longo de 7 minutos com solução de ninhidrina em álcool etílico (0,05% m/v).

Por se observar que algumas amostras, ao longo do tempo, passavam da coloração alaranjada para uma coloração púrpura, coloração esta característica da reação de mistura de aminoácidos com ninhidrina, e com base no texto descrito por Sheng *et al.* (1993), realizou-se uma análise de varredura (espectro de absorção) com asparagina, aspartato e mistura dos aminoácidos. Observou-se que, para a asparagina, o comprimento de onda característico é de 350nm, enquanto para o aspartato os comprimentos de onda característicos são 410 e 570 nm.

A partir desta observação descreve-se uma nova proposta para a determinação simultânea para as concentrações de asparagina e aspartato, conforme será mostrado no capítulo de Resultados e Discussão.

Colocam-se 0,5 mL de amostra em presença de 4,5 mL de solução de ninhidrina em álcool etílico 0,05% (m/V) e leva-se a um banho a 37°C por 3 horas. O branco da amostra é feito com 0,5 mL de meio sem asparagina e/ou aspartato e 4,5 mL de solução de ninhidrina. Após o banho, a amostra é colocada em banho de gelo, tendo sua coloração permanecida estável por 2,5 horas. O precipitado formado é decantado, não dificultando a leitura da amostra. A leitura da amostra é realizada nos comprimentos de

onda de 350, 410 e 570 nm. A partir de uma curva padrão de asparagina e aspartato e de um sistema de 2 equações e 2 incógnitas, é possível determinar as concentrações de asparagina e aspartato.

3.3.4 – Concentração de Etanol

A concentração de etanol é determinada por cromatografia gasosa em um cromatógrafo CG, contendo um detetor de ionização de chama e uma coluna de separação tipo Carbowax-20-M sobre Chromosorb, tendo nitrogênio como gás de arraste. As temperaturas do injetor e do detetor são mantidas a 225 °C e a temperatura da coluna em 150°C. O tamanho da amostra é de 1µL e o tempo de retenção aproximado do etanol nestas condições de operação é de 1 minuto.

Tendo-se como base amostras de etanol com concentrações conhecidas, constrói-se uma curva padrão de etanol, como a ilustrada na Figura 3.6, a cada batelada de análises. As áreas resultantes da integração dos picos são representadas em função da concentração das amostras. Triplicatas são empregadas neste procedimento.

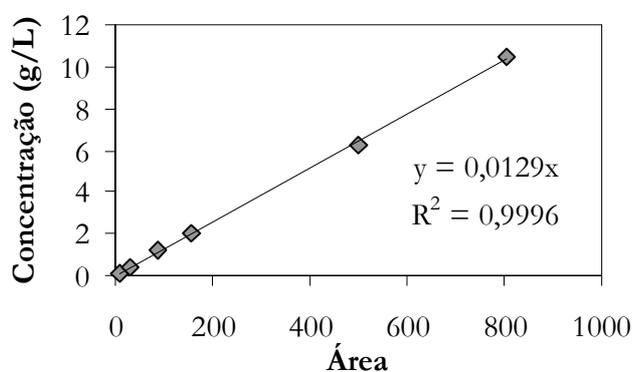


Figura 3.6 – Curva de calibração da concentração de etanol.

3.3.5 – Atividade de L-asparaginase

As células são removidas do meio por centrifugação e ressuspensas em igual volume de NaCl 0,85%. Após nova centrifugação e descarte do sobrenadante, as células centrifugadas são suspensas em 1,0 mL de tampão tris-HCl 0,05M, pH 8,6, e 1,0 mL de L-asparagina 0,01M e incubadas a 37°C por 30 minutos. A reação é interrompida adicionando-se 0,1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5M. Para cada amostra analisada realiza-se um branco, diferenciando-se da amostra teste por se adicionar 0,1

mL de TCA 1,5M antes de se levar a amostra a 37°C por 30 min. A proteína precipitada é removida por centrifugação e a amônia liberada é determinada por Nesslerização direta, colocando 0,5 mL do clarificado centrifugado da reação em 7,0 mL de água bidestilada e 1,0 mL do reagente de Nessler, à temperatura ambiente por 10min. A leitura é conduzida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 480nm. A concentração de amônia produzida na reação é determinada com base numa curva padrão previamente obtida, utilizando sulfato de amônia como padrão. Uma unidade internacional de L-asparaginase (IU) é a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de amônia por minuto a 37°C e pH 8,6 (Mashburn e Wriston, 1963).

A curva de calibração, cujo modelo é apresentado na Figura 3.7, é construída com base numa solução de sulfato de amônia, nas faixas de 0,1 a 2,0 μ mol de NH₃ liberados a partir da reação com o reagente de Nessler. O zero do espectrofotômetro é realizado com água milli-Q.

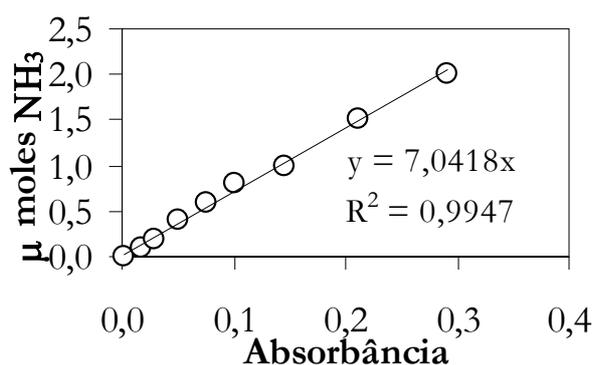


Figura 3.7 – Curva de calibração de sulfato de amônio.

As amostras de células centrifugadas não analisadas logo após a coleta do meio podem ser mantidas congeladas em tampão tris-HCl por um período de 7 dias, sem variação na atividade de L-asparaginase.

3.3.6 – Concentração de Proteínas

A dosagem de proteínas é realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), com base em uma curva padrão com diferentes concentrações de uma proteína conhecida, usualmente a albumina do soro bovino (BSA), e a solução corante.

A solução corante é preparada dissolvendo-se 50 mg de Azul Brilhante de Coomassie G (Sigma) em 25 mL de etanol 95%, sob agitação constante. São adicionados, então, 50 mL de ácido fosfórico 85% e 500 mL de água destilada. A solução é mantida sob agitação por no mínimo 1 hora e, então, filtrada. A solução pode ser armazenada a 4°C e sempre antes de ser utilizada deve ser filtrada.

A curva de calibração, ilustrada na Figura 3.8, é construída utilizando soluções de BSA na faixa de 0,02 g/L a 0,10 g/L. Os pontos da curva são determinados fazendo-se uso de misturas contendo alíquotas de 0,5 mL das soluções de BSA e de 5 mL da solução corante. Após 10 minutos de contato, procede-se à leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, tomando-se como zero a absorbância de uma amostra contendo 0,5 mL de água e 5 mL da solução corante.

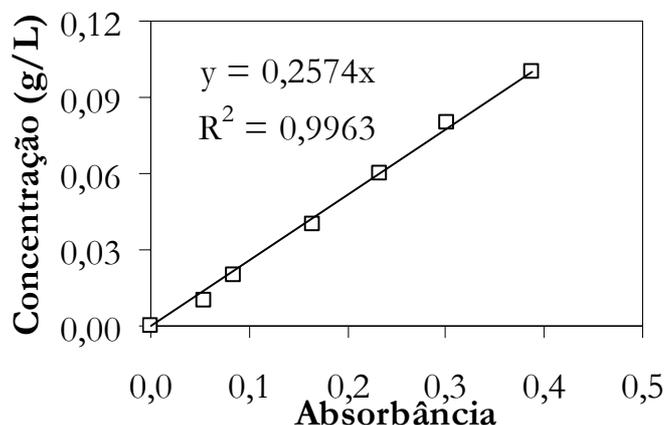


Figura 3.8 – Curva de calibração de proteínas, com BSA, pelo método de Bradford.

3.3.7 – Permeabilização de Células

Os testes de permeabilização são realizados com as células obtidas do cultivo de *Z. mobilis*. Várias foram as técnicas utilizadas, dosando-se no sobrenadante obtido a atividade enzimática e a concentração de proteínas e realizando a eletroforese em gel SDS-PAGE.

3.3.7.1 – Rompimento celular com lisozima e sonicação

A cada 0,5 g de células é adicionado 1 mL de uma solução 4 g/L de lisozima. Esta solução é colocada em sonicador BRANSON 250, em intervalos de 30 segundos, passando para banho de gelo para resfriamento durante 1 minuto antes da repetição, realizada 5 vezes.

3.3.7.2 – Permeabilização com CTAB e EDTA

Adiciona-se a cada 0,5 g de células 5 g de CTAB, EDTA, ou uma mistura de ambos, diluídos em 100 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,1M e pH 7,0.

Segundo Gowda *et al.* (1991), a razão célula/detergente é importante na permeabilização das células. O fato de a permeabilização de células de levedura ser dependente da quantidade de detergente presente no meio, tanto quanto da concentração de células, aliado ao fato de que a permeabilização pode ocorrer mesmo com uma solução detergente muito diluída, indica que o CTAB tem uma afinidade muito alta para se ligar às células até mesmo irreversivelmente. Assim, na permeabilização far-se-á um estudo variando-se a razão de CTAB/g célula.

Para a permeabilização com EDTA, Chen *et al.* (1999) citam que a adição de EDTA numa bactéria Gram negativa pode desestabilizar a membrana externa e que tais variações enfraquecem a membrana interna. Para a bactéria *Alcaligenes eutrophus*, mesmo uma quantidade muito pequena de EDTA permite uma pureza acima de 90% na recuperação de poli-3-hidroxitirato (PHB). A partir destas observações, numa nova etapa de testes com EDTA utiliza-se 0,08 g EDTA/ g de células em 200 mL de solução tampão fosfato de sódio 0,1M e pH 7,0 por 10 minutos.

3.3.7.3 – Permeabilização com lisozima

Cada 0,5 g de células são lavadas em 40 mL de tampão de lavagem e centrifugadas a 6000 rpm e 4°C por 10 min. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se à massa retida 10 mL do tampão de lavagem com 5 mg de lisozima, incubando a amostra a 37°C por 30 min. O tampão de lavagem contém Tris-HCl 10mM a pH 8,0, NaCl 0,15M, EDTA 1mM e 20% de sacarose.

3.3.7.4 – Choque osmótico (Souza, 2002).

Cada 1 g de células é ressuspensa em 20 mL da mistura de tampão glicina 250 mM, acetato de potássio 100 mM e KCl 50 mM em pH 7,0, contendo 50% de sacarose e incubada, sob agitação forte por 2 horas à temperatura ambiente. As células são separadas por centrifugação a 10000 rpm por 5 min e ressuspensas em 20 mL de água gelada. Essa suspensão é colocada em agitador rotatório por 30 min, em banho de gelo, e centrifugada nas mesmas condições acima.

3.3.8 – Eletroforese de Proteínas

A eletroforese de proteínas é realizada em equipamento Hoefer MiniVE, tendo como principal padrão de comparação o medicamento Elspar, que contém a enzima L-asparaginase.

Para a realização da eletroforese são preparados os géis de corrida e de nivelamento. O gel é corrido em presença de tampão de corrida. Cada banda eletroforética é composta de 10 µL de uma solução da proteína com o tampão de aplicação de amostra. A eletroforese é realizada a 20 mA e 100 V. Após o tempo de corrida, os géis são retirados e colocados em presença de solução corante por, no mínimo, 2 horas e sob agitação lenta. Em seguida, são rinsados e colocados em presença de soluções descolorantes, para que as bandas possam ser visualizadas.

O gel de corrida é composto por 2,5 mL de solução Tris-HCl 1,5 M e pH 8,8, 4,0 mL de solução de monômero, 100 µL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), 3,3 mL de água, 100 µL de persulfato de amônio 10% e 10 µL de TEMED. A solução de monômero é composta de 30% T e 2,7 % C, onde:

$$T = \% \text{ acrilamida} + \% \text{ bis-acrilamida} \quad (3.3)$$

$$C = \% \text{ bis-acrilamida} / T \quad (3.4)$$

O gel de nivelamento é composto de 1,25 mL de solução Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8, 650 µL de solução de monômero, 50 µL de SDS 10% (dodecil sulfato de sódio), 3,0 mL de água, 50 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED.

O tampão de corrida contém 3 g/L de Tris base, 14,5 g/L de glicina e 10 mL de SDS 10%. O tampão de aplicação de amostra é feito com 1,25 mL de solução Tris-HCl 0,5 M e pH 6,8, 2,0 mL de SDS 10%, 0,5 mL de β-mercaptoetanol, 4,0 mL de azul de bromofenol 0,05%, 1,0 mL de glicerol e 1,25 mL de água.

A solução corante é composta de 0,025% de azul de coomassie R-250, 40 % de metanol e 7 % de ácido acético. A solução descorante I contém 30 mL de metanol e 7 mL de ácido acético, com água em quantidade suficiente para completar 100 mL do volume total. A solução descorante II possui 3 mL de metanol e 5 mL de ácido acético, com água em quantidade suficiente para 100 mL de solução.

As soluções de proteínas de peso molecular conhecido devem conter de 10 a 20 mg/mL para que em uma mistura 1:1 com tampão de aplicação elas possuam na banda

eletroforética de 5 a 10 μg proteína/ μL . Para misturas complexas são necessárias 50 μg de proteína/banda eletroforética.

3.3.9 – Determinação de μ e dos rendimentos Y_{xs} e Y_{ux}

A taxa específica de crescimento (μ) é obtida a partir da evolução temporal da massa de células da bactéria *Z. mobilis* ao longo do tempo. Representando-se em um gráfico do tipo $\ln X$ (crescimento celular) em função do tempo, obtém-se uma reta durante a fase característica do crescimento exponencial. Os valores de μ determinados nos experimentos realizados são obtidos a partir do melhor coeficiente linear da reta.

Os fatores de conversão de substrato em células (rendimento em células), Y_{xs} , e a atividade específica, Y_{ux} , são obtidos a partir das diferenças entre as concentrações iniciais da fase estacionária de crescimento e as concentrações iniciais da fermentação.

$$Y_{xs} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (3.5)$$

$$Y_{ux} = \frac{U_f - U_0}{m_f - m_0} \quad (3.6)$$

onde X_f é a concentração final de células (fase estacionária), X_0 é a concentração inicial, S_0 é a concentração inicial de substrato, S_f a concentração final, U_f a atividade de asparaginase no final do crescimento, U_0 é a atividade inicial de asparaginase, m_f é a massa final de células e m_0 a massa de células ao se iniciar o cultivo fermentativo.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os experimentos realizados visando o entendimento do processo de produção da enzima asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis* e o desenvolvimento de estudos para se ter um processo de qualidade e confiabilidade. Os objetivos principais deste estudo são:

- Identificar as etapas importantes do processo
 - ✓ Inoculação (itens 4.1 e 4.2)
 - ✓ Mensuração (itens 4.3, 4.4, 4.9 e 4.10)
 - ✓ Fermentação (itens 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 e 4.12)
- Identificar as variáveis relevantes
- Identificar as principais fontes de erro e mapear o fluxo destes erros
- Otimizar o processo e as técnicas de análise
- Avaliar as melhores fontes de carbono e nitrogênio para a enzima
- Otimizar as condições de processo de produção
- Avaliar o tempo e a melhor forma de armazenamento das células para a análise de atividade asparaginásica
- Comprovar a eficiência do estudo realizado a partir da reprodutibilidade dos experimentos
- Identificar a melhor técnica de permeabilização

4.1 – Manuseio da Bactéria

A primeira etapa de qualquer processo analítico é a amostragem da cultura a ser analisada, que precisa ser realizada de forma planejada, documentada e controlada. Para uma amostra biológica, onde a bactéria é mantida, é importante manter a cultura estocada a baixa temperatura a fim de se prevenir qualquer atividade biológica que possa vir a modificar a natureza da amostra. A homogeneidade da amostra é um outro fator importante para minimizar variações na quantificação que geram incertezas em relação ao valor real (McSheery *et al.*, 2003).

Foi observada, em alguns ensaios realizados com inóculo proveniente de uma cultura em geladeira por mais de 4 meses, a necessidade de se estabelecer uma rotina de ativação da cultura e de padronização das etapas de inoculação e preparação do inóculo, visto que nos ensaios em questão passava-se para etapa de inóculo após um certo tempo de incubação, sem acompanhamento do seu crescimento. Sem tal acompanhamento não se pôde perceber a inativação das células, sendo, por isso, necessários tanto o acompanhamento do crescimento do inóculo quanto a manutenção da cultura a cada três meses. Na Figura 4.1 pode-se perceber os resultados de um inóculo mal conduzido, quando comparado a um cultivo normal de *Z. mobilis* nas mesmas condições.

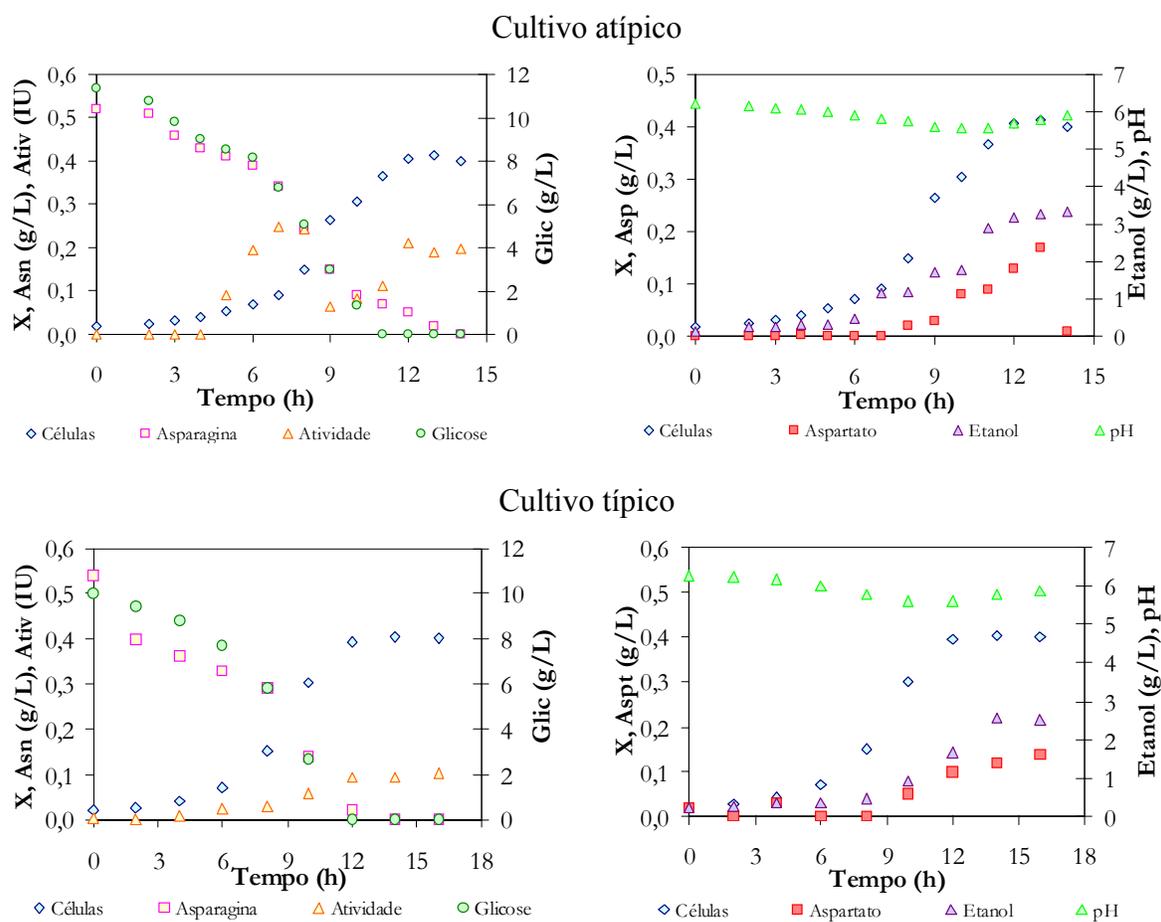


Figura 4.1 - Comportamento cinético de um cultivo de *Z. mobilis* com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (◇ células, ○ glicose, □ asparagina, ■ aspartato, △ atividade, ▲ pH e ▲ etanol).

No cultivo atípico da bactéria, observa-se um crescimento mais lento ($0,22 \text{ h}^{-1}$, enquanto a velocidade de crescimento típica está em torno de $0,32 \text{ h}^{-1}$) e um menor rendimento de células em enzima asparaginase ($8,0 \text{ IU/g}$ para o crescimento atípico e $13,0 \text{ IU/g}$ para um cultivo típico de *Z. mobilis*). Outro fator a ser observado é o lento consumo de glicose no crescimento atípico da bactéria, mais lento que o da fonte de nitrogênio, a asparagina. Num cultivo típico de 10 g/L de glicose e $0,5 \text{ g/L}$ de asparagina, as fontes de carbono e de nitrogênio tendem a cessar praticamente no mesmo instante.

Apesar da atividade de asparaginase ser intracelular, muitos trabalhos abordam o assunto utilizando a medição IU/L de meio de cultura. Entretanto, para se conhecer a eficiência da enzima produzida pelo microrganismo *Z. mobilis*, será utilizada a atividade específica que mede a atividade de asparaginase por grama de peso seco de células.

A partir destes resultados foram realizados estudos para ativação da cultura tanto em meio sólido quanto em meio líquido, estabelecendo o prazo de 3 meses para a reativação das mesmas. Também foi definido que cada etapa de preparo de inóculo só era passada para a etapa seguinte quando a cultura estivesse na fase exponencial de crescimento, a partir de acompanhamento da absorbância a 600 nm ao longo do tempo.

4.2 – Influência do Tamanho do Inóculo

A inoculação é a etapa mais importante de um processo fermentativo, visto que o comportamento da enzima depende da velocidade de crescimento do microrganismo. Os estudos do desenvolvimento do inóculo permitem dar a confiabilidade necessária ao método. Ao mesmo tempo, a condição de armazenamento da cultura, seja ela em meio ágar ou em meio líquido, em uma dada temperatura por um determinado tempo, deve ser baseada em dados científicos que possam afirmar que naquelas condições o microrganismo não sofre alteração.

Com a finalidade de verificar a influência do tamanho do inóculo na produção da asparaginase, realizaram-se fermentações com inóculos de 2%, 5% e 10% v/v. Na Figura 4.2, observa-se o perfil de concentração de células em função do tempo.

Como era esperado, o tempo de fermentação diminui com o aumento do tamanho do inóculo. Os parâmetros bioquímicos globais foram aproximadamente iguais para as 3 condições experimentais. Como pode ser observado na Tabela 4.1, as taxas específicas de

crescimento e os fatores de conversão de substrato em células foram próximos, com valores semelhantes aos encontrados na literatura para o crescimento de *Z. mobilis* em meio complexo (meio rico). Devido ao fato da atividade de asparaginase com inóculo de 5% ter sido superior em relação às demais condições estudadas, esta condição de inóculo foi empregada nos demais experimentos.

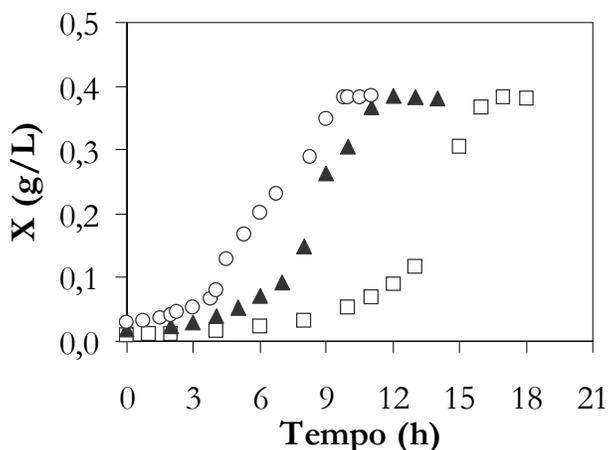


Figura 4.2 – Comportamento do crescimento celular de *Zymomonas mobilis* em diferentes tamanhos de inóculo (○ 10% de inóculo, ▲ 5% de inóculo e □ 2% de inóculo).

Tabela 4.1 – Comportamento das principais variáveis do processo de fermentação a 10 g/L de glicose frente a diferentes percentuais de inóculo.

	2%	5%	10%
S₀ (g/L)	10	10	10
Tempo (h)	18	14	10
μ (h⁻¹)	0,26	0,30	0,30
Y_{XS} (g/g)	0,040	0,038	0,036
Y_{UX} (IU/g)	7,9	13,0	9,1

Os valores dos rendimentos foram calculados no final da fase exponencial de crescimento, no tempo indicado na Tabela 4.1. A taxa específica de crescimento foi calculada na fase exponencial de crescimento, a partir da tangente da reta de $\ln X$ em função do tempo. Observa-se que o fator de conversão substrato em células reduz com o aumento do inóculo. Entretanto, a maior diferença entre as condições estudadas ocorre na

produtividade em enzimas, onde o inóculo com 5% gerou uma produtividade cerca de 40% superior às demais condições estudadas.

4.3 – Padronização da Metodologia de Análise de Atividade

Na revisão da literatura, observou-se que em alguns trabalhos emprega-se o tampão tris-HCl para a reação de atividade, enquanto que em outros trabalhos a solução utilizada é o tampão fosfato. Visando uma obtenção de maior atividade de L-asparaginase, foram realizados testes com tampão fosfato de sódio e com tampão tris-HCl, ambos em concentração 0,05M e pH 8,6. Como pode ser observado na Tabela 4.2, a partir de um cultivo com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina, observou-se que o tampão tris-HCl apresentou melhores resultados.

Tabela 4.2 – Influência do tampão na atividade de asparaginase.

Tempo (h)	X (g/L)	Asparagina (g/L)	Atividade (IU)		Y _{UX} (IU/g)	
			Tris-HCl	Fosfato	Tris-HCl	Fosfato
6	0,29	0,27	0,06	0,03	5,48	2,77
8	0,48	0,17	0,12	0,09	6,10	4,33
10	0,55	0,10	0,13	0,13	6,14	5,75
11	0,55	0,06	0,16	0,13	7,34	5,61

Em média, a reação de atividade das células em tampão tris-HCl gerou um rendimento em células cerca de 24 % superior que quando em presença de tampão fosfato nas mesmas condições de pH. Além disso, o tampão tris-HCl apresenta uma atividade específica mais estável com o tempo, tendo uma maior produção de enzima com a bactéria já na fase estacionária de crescimento. O tampão fosfato, por sua vez, gera uma atividade crescente, porém menos estável ao longo do processo. Isto faz com que o tampão tris-HCl seja o mais indicado para os estudos de atividade de asparaginase com a bactéria *Zymomonas mobilis*.

4.4 – Determinação Simultânea de Asparagina e Aspartato

O ensaio colorimétrico mais amplamente utilizado na determinação de aminoácidos é baseado na formação de cor a partir de sua reação com ninhidrina. A ninhidrina (hidrato

de triacetohidrindeno) reage com grupos α -amino livres para produzir aldeído, dióxido de carbono e ninhidrina reduzida por meio de uma reação em três etapas.

A coloração púrpura formada na reação de aminoácidos em solução ácida com ninhidrina é atribuída ao ânion de diacetohidrindilideno-diacetohidrindamina (DYDA). De acordo com o mecanismo proposto por Ruhemann (1911), na presença de ninhidrina os α -amino ácidos são oxidativamente deaminados e decarboxilados para os correspondentes α -aceto ácidos. A amônia liberada, então, condensa com a forma reduzida da ninhidrina, a hidridantina, para produzir DYDA (púrpura de Ruhemann).

Sheng *et al.* (1993) observaram que, quando a concentração de ninhidrina e o pH eram mantidos constantes, a mistura asparagina-ninhidrina era dependente da concentração de asparagina, do tempo de incubação e da temperatura. Estabeleceu-se como condição padrão a solução de ninhidrina em álcool etílico 0,05% (peso/volume), a temperatura de 37°C e o tempo de incubação de 3 horas, condição na qual a amostra permaneceu inalterada por 2,5 h em banho de gelo.

Um total de 4,5 mL de uma solução 0,05% (peso/volume) de ninhidrina em álcool etílico foi misturado a 0,5 mL da amostra de aminoácido e incubado por 3 horas a 37°C. O sobrenadante da reação foi lido em espectro na faixa de 300 a 600nm, onde o branco foi a mistura de água com a solução de ninhidrina em álcool etílico sob as mesmas condições das amostras. Quando a solução de asparagina foi misturada com a solução alcoólica de ninhidrina, uma coloração alaranjada foi sendo formada com o tempo, apresentando espectro máximo de absorção em 350 nm. Quando a solução de aspartato foi misturada à solução alcoólica de ninhidrina, uma coloração azulada foi sendo formada, apresentando espectros máximos de absorção em 410 e 570nm. Quando a mistura das soluções de asparagina e aspartato foi tratada com ninhidrina em álcool etílico de maneira similar, obteve-se uma coloração variável e espectros de absorção máxima a 350, 410 e 570nm, como mostra a Figura 4.3.

Na Figura 4.4, mostra-se o espectro de cores obtido com diferentes combinações da mistura de asparagina e aspartato após reação com ninhidrina. As setas indicam o aumento da concentração dos componentes, que variaram de 0 a 0,5 g/L.

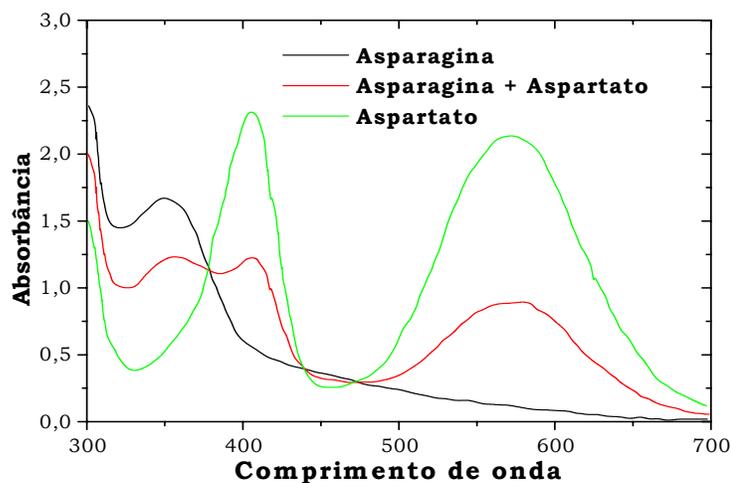


Figura 4.3 – Espectro de absorção UV-visível do aminoácido puro (asparagina (0,5 g/L) ou aspartato (0,5 g/L)) e da mistura dos mesmos (0,25 g/L asparagina + 0,25 g/L aspartato) ao se fazer uma varredura na faixa de 300 a 700 nm para os componentes .

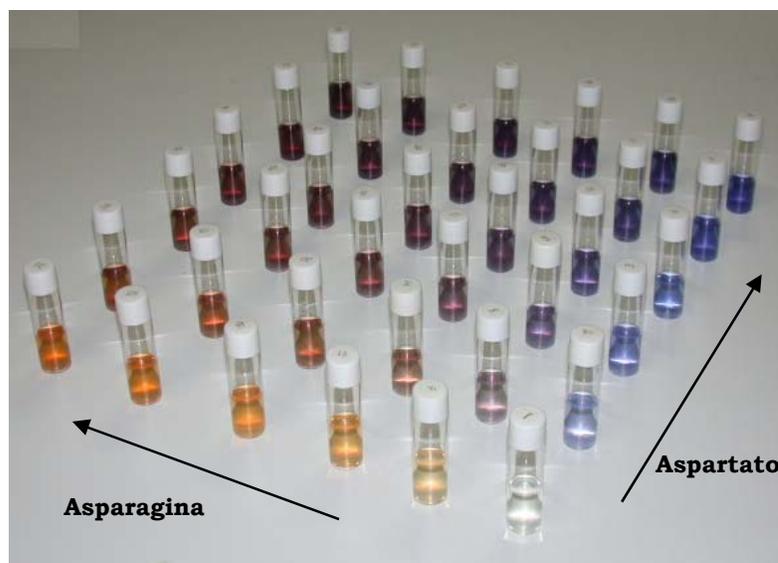


Figura 4.4 – Reação de ninhidrina com diferentes concentrações de asparagina e aspartato.

Com a finalidade de se determinar as concentrações de asparagina e aspartato a partir da absorbância das amostras, analisou-se o melhor sistema de ajuste das equações nos comprimentos de onda de 350, 410 e 570nm, gerando uma curva de calibração a partir de

concentrações. Na Figura 4.5 encontram-se os gráficos de ajuste do sistema linear em função das concentrações de asparagina e aspartato para cada comprimento de onda analisado.

Tendo como base os espectros de absorção obtidos na Figura 4.3, sabe-se que a absorção máxima da asparagina se dá a 350 nm, enquanto que o aspartato tem absorção máxima em 410 e 570 nm. Os dados para o aspartato podem ser utilizados tanto a 410 quanto a 570 nm para a resolução do sistema de equações para a determinação simultânea de asparagina e aspartato a ser definido, uma vez que ambos os comprimentos apresentaram bom ajuste e não possuem diferença significativa (dados não mostrados). Analisando-se apenas um dos aminoácidos, observa-se um pequeno desvio entre os resultados, indicativo da interferência de um aminoácido na leitura do outro aminoácido.

Assim, a partir de cada comprimento de onda foi obtida uma equação do tipo

$$y = a.x_1 + b.x_2 + c \quad (4.1)$$

onde y é a leitura de absorbância no comprimento de onda determinado, x_1 é a concentração de aspartato, x_2 é a concentração de asparagina e a , b e c são as constantes geradas para cada comprimento de onda a partir da linearização da curva de calibração.

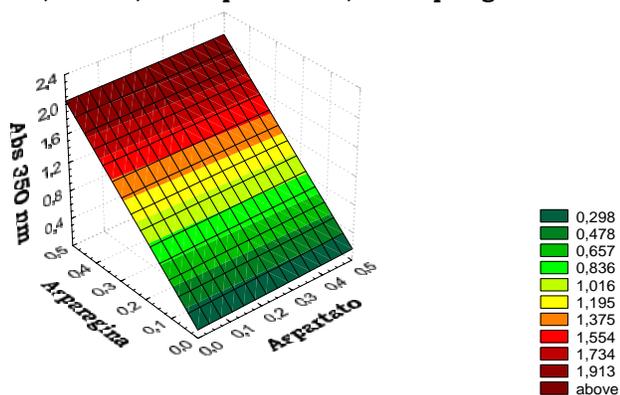
A partir das leituras de absorção em 350 nm e 570 nm gerou-se um sistema com 2 equações e 2 incógnitas, do tipo

$$\begin{aligned} y_{350} &= a_1.x_1 + b_1.x_2 + c_1 \\ y_{570} &= a_2.x_1 + b_2.x_2 + c_2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

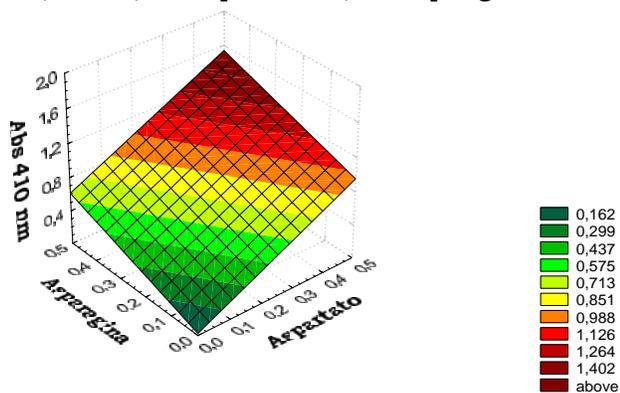
cuja solução resulta nas equações para a determinação de asparagina e aspartato na forma

$$\begin{aligned} x_1 &= \frac{b_2.(y_{350} - c_1) - b_1.(y_{570} - c_2)}{a_1.b_2 - a_2.b_1} \\ x_2 &= \frac{-a_2.(y_{350} - c_1) + a_1.(y_{570} - c_2)}{a_1.b_2 - a_2.b_1} \end{aligned} \quad (4.3)$$

Asparagina + Aspartato - 350 nm
 $Abs\ 350 = 0,119 + 0,092*Aspartato + 3,855*Asparagina$



Asparagina + Aspartato - 410 nm
 $Abs\ 410 = 0,024 + 1,855*Aspartato + 1,177*Asparagina$



Asparagina + Aspartato - 570 nm
 $Abs\ 570 = 0,007 + 1,717*Aspartato + 0,211*Asparagina$

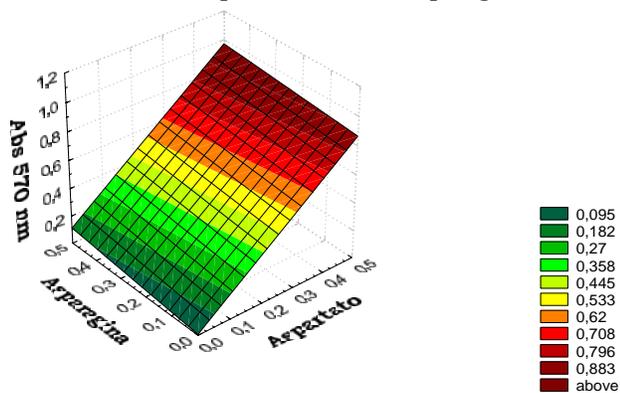


Figura 4.5 – Ajuste da função linear da curva de calibração para cada comprimento de onda analisado.

Visando a qualidade das medidas e a eficiência e estabilidade do método proposto foi realizado um controle interno de qualidade a partir de repetições da curva de calibração, em 3 diferentes equipamentos, sendo que em um deles se realizou a leitura por fotometria e por análise de varredura.

O controle interno de qualidade é direcionado à avaliação do método analítico, onde a atenção é dada não somente à precisão e veracidade, mas também aos limites de detecção, faixa de medida, linearidade/bom ajuste, recuperação, robustez e especificidade/seletividade. A validação, aqui, é definida como o ajuste do método para uma dada aplicação, sendo a variabilidade entre equipamentos considerada como um substituto aceitável da reprodutibilidade. Esquemas internos de validação preenchem um importante nicho na metodologia geral de validação por causa de sua flexibilidade e sua habilidade de gerar resultados rápidos para novos métodos.

A Tabela 4.3 apresenta as equações obtidas para cada curva de calibração gerada, como também uma equação gerada pela junção de todos os dados. Além disso, é apresentado na tabela o erro de predição em cada comprimento de onda. O erro da regressão (σ_p^2) foi calculado a partir da equação de estimação do erro experimental

$$\sigma_p^2 = \frac{F}{NE - NP} \quad (4.4)$$

onde F (*final loss*) é a soma dos resíduos quadráticos, obtido a partir do programa computacional Statistica[®], NE é o número de experimentos realizados e NP o número de parâmetros estimados.

Fazendo-se uma varredura de comparação entre os valores estimados e os valores teóricos para cada equação obtida, encontrou-se em todos os casos um erro praticamente muito próximo a zero. A Figura 4.6 ilustra o desempenho do modelo a partir dos gráficos de valores preditos versus valores observados, com 95% de confiança, para a análise de varredura em espectrofotômetro UV1240.

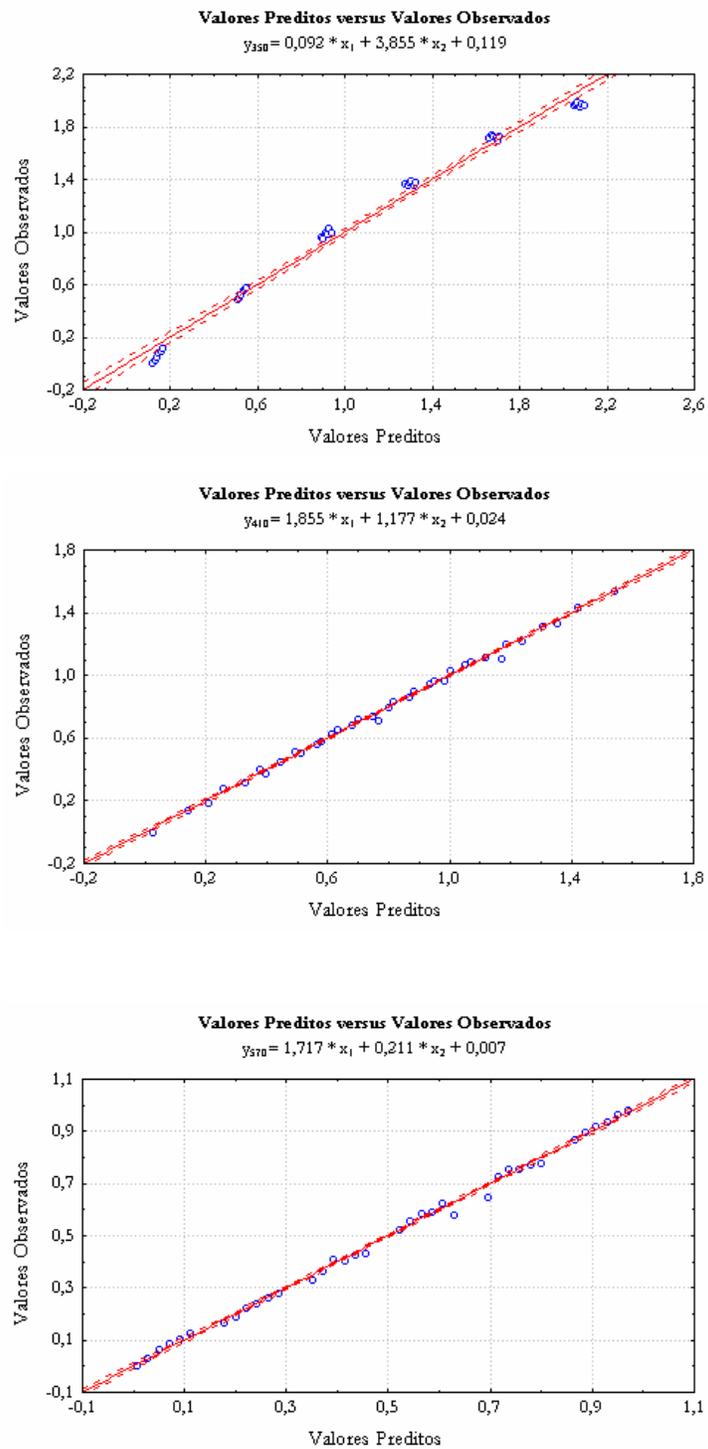


Figura 4.6 – Ilustração do desempenho analítico a partir da análise de varredura das amostras em espectrofotômetro UV1240.

Tabela 4.3 – Sistema de equações da curva de calibração e incertezas para a determinação simultânea de asparagina e aspartato.

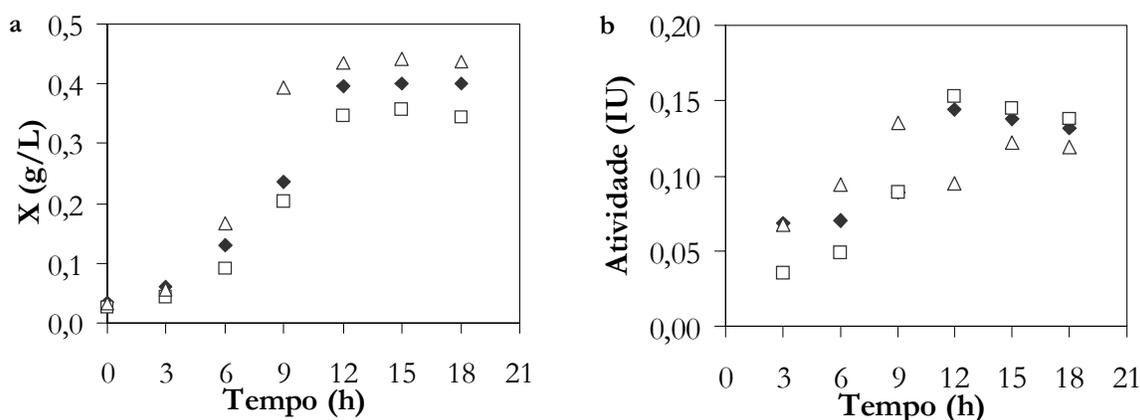
	Equações	σ_p^2
UV1204f	$y_{350} = 0,092 \pm 0,073 \cdot x_1 + 4,476 \pm 0,043 \cdot x_2 + 0,068 \pm 0,017$	0,0019
	$y_{410} = 1,842 \pm 0,036 \cdot x_1 + 1,266 \pm 0,036 \cdot x_2 + 0,016 \pm 0,014$	0,0013
	$y_{570} = 1,695 \pm 0,029 \cdot x_1 + 0,265 \pm 0,029 \cdot x_2 + 0,001 \pm 0,012$	0,0009
UV1204v	$y_{350} = 0,092 \pm 0,073 \cdot x_1 + 3,855 \pm 0,073 \cdot x_2 + 0,119 \pm 0,029$	0,0054
	$y_{410} = 1,855 \pm 0,021 \cdot x_1 + 1,177 \pm 0,021 \cdot x_2 + 0,024 \pm 0,008$	0,0005
	$y_{570} = 1,717 \pm 0,017 \cdot x_1 + 0,211 \pm 0,017 \cdot x_2 + 0,007 \pm 0,007$	0,0003
UV 1501	$y_{350} = 0,200 \pm 0,317 \cdot x_1 + 2,457 \pm 0,317 \cdot x_2 + 0,332 \pm 0,124$	0,1021
	$y_{410} = 1,776 \pm 0,078 \cdot x_1 + 0,963 \pm 0,078 \cdot x_2 + 0,116 \pm 0,031$	0,0062
	$y_{570} = 1,693 \pm 0,028 \cdot x_1 + 0,280 \pm 0,028 \cdot x_2 + 0,033 \pm 0,011$	0,0008
UV 2201	$y_{350} = 0,047 \pm 0,045 \cdot x_1 + 4,090 \pm 0,045 \cdot x_2 + 0,073 \pm 0,018$	0,0029
	$y_{410} = 1,727 \pm 0,016 \cdot x_1 + 1,225 \pm 0,016 \cdot x_2 + 0,006 \pm 0,006$	0,0002
	$y_{570} = 1,595 \pm 0,011 \cdot x_1 + 0,286 \pm 0,011 \cdot x_2 - 0,015 \pm 0,005$	0,0001
Todos	$y_{350} = 0,107 \pm 0,109 \cdot x_1 + 3,719 \pm 0,109 \cdot x_2 + 0,148 \pm 0,043$	0,0498
	$y_{410} = 1,800 \pm 0,027 \cdot x_1 + 1,158 \pm 0,027 \cdot x_2 + 0,041 \pm 0,010$	0,0029
	$y_{570} = 1,675 \pm 0,017 \cdot x_1 + 0,260 \pm 0,017 \cdot x_2 + 0,007 \pm 0,007$	0,0012

4.5 – Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Asparaginase

De forma a analisar a influência da fonte de nitrogênio na produção de asparaginase, foram realizados ensaios com asparagina, aspartato e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio. As Figuras 4.7a e b apresentam as curvas de crescimento e de produção da enzima, respectivamente. O processo fermentativo partiu de um mesmo inóculo de células centrifugadas e lavadas com NaCl estéril 0,85%.

As taxas específicas de crescimento e os fatores de conversão de substrato em células foram praticamente semelhantes, variando-se apenas a quantidade de enzima produzida, o que gerou uma atividade específica final de asparaginase para o meio com aminoácido cerca de 25% maior do que para com uma fonte inorgânica de nitrogênio (9,0 IU/g células). Este resultado demonstra que o aminoácido é uma excelente fonte de nitrogênio para enzima e, também, mostra a necessidade de uma melhor compreensão das relações entre o metabolismo de carbono e do nitrogênio em células de *Zymomonas*

mobilis, de forma a entender o mecanismo de indução da síntese da asparaginase, o que pode vir a gerar uma produção de atividade ainda maior. Resultados finais de cultivos em meio rico, utilizando extrato de levedura como fonte de nitrogênio, também mostram a produção de asparaginase, em torno de 4,0 IU/g células em peso seco, que, em conjunto com os dados obtidos com a fonte inorgânica de nitrogênio, comprovam que a enzima é constitutiva.



Figuras 4.7a e b – Perfis de concentração de células de *Zymomonas mobilis* e da atividade de asparaginase a partir de diferentes fontes de nitrogênio (Δ sulfato de amônio, ◆ asparagina e □ aspartato).

A partir da Tabela 4.4 pode-se concluir que, apesar de haver produção de asparaginase em meio rico e em meio mínimo com fonte inorgânica de nitrogênio, é o aminoácido o melhor nutriente para a síntese da enzima. E, embora o aspartato tenha gerado uma produtividade de enzimas superior a asparagina, utilizar-se-á em alguns ensaios a asparagina como fonte de nitrogênio.

Tabela 4.4 - Principais variáveis do crescimento de *Z. mobilis* em meio mínimo utilizando diferentes fontes de nitrogênio em comparação com o cultivo da bactéria em meio rico.

	Asparagina	Aspartato	Sulfato	Extrato lêvedo
μ (h ⁻¹)	0,25	0,26	0,34	0,29
Y _{XS} (g/g)	0,038	0,033	0,041	0,044
Y _{UX} máx (IU/g)	9,44	10,93	8,58	4,57
Y _{UX} final (IU/g)	8,20	10,03	6,79	3,64

4.6 – Variação da Concentração da Fonte de Carbono

Visando estudar a relação entre carbono e nitrogênio na atividade de asparaginase, realizaram-se estudos em diferentes concentrações de glicose (1, 5, 10, 30 e 50 g/L) e asparagina em torno de 0,5 g/L. Para que todos os cultivos partissem da mesma condição, utilizou-se para todos os ensaios um inóculo de células centrifugadas e lavadas com solução estéril de NaCl 0,85%, originadas de um cultivo de 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina. Observou-se que nos cultivos com 1 e 5 g/L de glicose ainda há um residual de asparagina no meio após a exaustão da glicose. Já no cultivo com 10 e 30 g/L de glicose, a asparagina e a glicose foram exauridas do meio praticamente ao mesmo tempo. No cultivo com 50 g/L de glicose há um residual de glicose em torno de 10% da condição inicial após o término da asparagina. A Tabela 4.5 apresenta os principais parâmetros cinéticos obtidos no crescimento da bactéria frente a diferentes concentrações de glicose.

Tabela 4.5 – Parâmetros cinéticos para o crescimento de *Z. mobilis* frente a diferentes concentrações de glicose na fermentação e inóculo com 10 g/L de glicose.

	1 g/L	5 g/L	10 g/L	30 g/L	50 g/L
μ (h ⁻¹)	0,20	0,21	0,24	0,28	0,29
Y_{XS} (g/g)	0,093	0,027	0,038	0,019	0,015
X final (g/L)	0,115	0,152	0,401	0,632	0,685
Y_{UX} final (IU/g)	25,68	9,54	8,20	9,77	9,47

O elevado valor de Y_{XS} para 1 g/L de glicose indica a utilização de uma outra fonte de carbono, que nesse caso pode ser o aspartato que está sendo gerado durante o crescimento. No ensaio com 50 g/L, por haver um residual de glicose e exaustão da fonte de nitrogênio, observou-se que, diferentemente do que ocorreu nos demais ensaios, também não houve acúmulo de aspartato e o fator de conversão substrato em células foi menor do que o geralmente encontrado na literatura para a bactéria *Zymomonas mobilis*, que está na faixa de 0,03 a 0,04.

Um fato que merece um estudo mais detalhado é o alto rendimento de células em enzima no cultivo com 1 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina, praticamente o triplo do obtido nas demais concentrações de glicose. A utilização de uma outra fonte de carbono

após o término da glicose, no caso, o aspartato, favorece a síntese de asparaginase da mesma forma que no cultivo de *E. coli* (Cedar e Schwartz, 1968).

A título de comparação e verificação da influência do inóculo no crescimento, novas reações com diferentes concentrações de glicose e concentração de asparagina 0,5 g/L foram realizadas. Desta vez, ao invés das etapas de inóculo terem a mesma concentração de glicose (10 g/L), como ocorrido nos experimentos anteriores, cada corrida experimental terá a mesma concentração de glicose tanto para as etapas do inóculo quanto para a fermentação. As fermentações realizadas, conforme ilustrado na Tabela 4.6, mostraram um perfil semelhante ao encontrado nos resultados anteriores.

Tabela 4.6 – Parâmetros cinéticos para o crescimento de *Zymomonas mobilis* frente a diferentes concentrações de glicose com etapas de inóculo e fermentação com mesma quantidade de substrato.

	4 g/L	10 g/L	30 g/L
μ (h ⁻¹)	0,29	0,30	0,32
Y_{XS} (g/g)	0,063	0,038	0,020
X_{final} (g/L)	0,274	0,394	0,676
Y_{UX} final (IU/g)	7,71	6,43	9,22

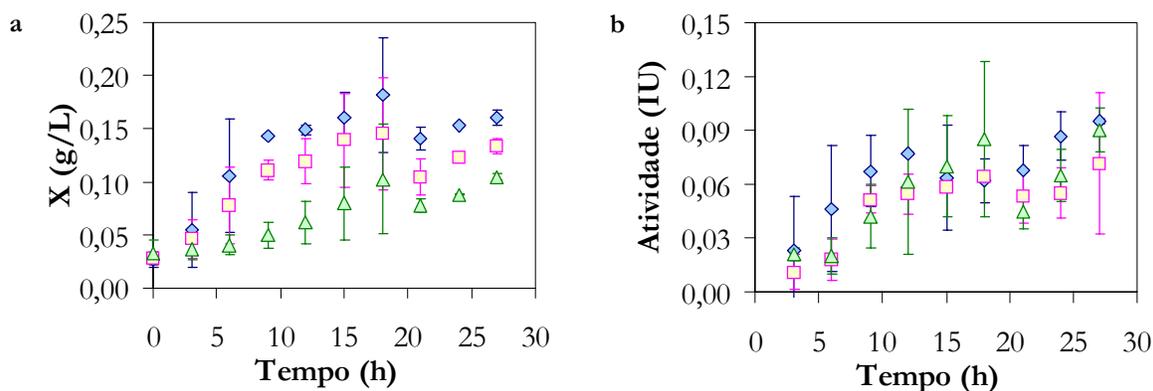
A Tabela 4.6 mostra que, independente do inóculo utilizado, em concentrações de glicose menores ou iguais a 4 g/L há um aumento dos rendimentos de substrato em células e de células em enzimas. Ao mesmo tempo, em concentrações de glicose maiores ou iguais a 30 g/L, apesar de haver crescimento celular, o rendimento de substrato em células é baixo, valor este muito inferior ao encontrado na literatura.

4.7 – Influência da Glicose na Produção da Enzima

Um ensaio em duplicata sem adição de glicose, com asparagina e aspartato em concentração em torno de 0,5 g/L, foi realizado para avaliar se a glicose inibia a produção de asparaginase, semelhante ao descrito por Cedar e Schwartz (1968) para a célula de *E. coli*, onde grandes quantidades da enzima foram produzidas pela bactéria na ausência de açúcares e presença de grandes quantidades de aminoácidos. Dois outros experimentos

foram conduzidos em paralelo, tendo em ambos 1 g/L de glicose e 0,5 g/L do aminoácido, asparagina ou aspartato.

As Figuras 4.8a e b mostram o comportamento da cinética de crescimento e seus desvios. Um rápido crescimento nas oito primeiras horas de cultivo é observado nos ensaios com glicose, enquanto que o crescimento com asparagina e aspartato apresentou uma cinética mais lenta, gerando uma taxa específica de crescimento de $0,21 \text{ h}^{-1}$ e atividade em torno de 4 IU.



Figuras 4.8a e b – Perfis de concentração de células de *Zymomonas mobilis* e da atividade de asparaginase a partir de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (\diamond glicose e asparagina, \triangle glicose e aspartato, \square asparagina e aspartato).

Nos experimentos com glicose, a mesma foi exaurida em torno de 6 horas de cultivo. Após a exaustão da glicose, fonte que fornece carbono e energia mais rapidamente para o crescimento, a bactéria começa a utilizar o aspartato como fonte de carbono, mostrando um crescimento mais lento e uma síntese de enzimas mais rápida. Este comportamento é idêntico ao mecanismo de regulação catábólica do carbono (CCR), que ocorre na síntese de asparaginase por *Enterobacter aerogenes*, evidenciada por Mukherjee *et al.* (2000).

Nas Figuras 4.8a e b observa-se que após 18 horas de cultivo, nos três ensaios observados, há uma queda em alguns pontos experimentais. Isto é devido à troca de frasco das corridas experimentais da duplicata, em função do término da cultura dos frascos iniciais, onde as coletas estavam sendo realizadas anteriormente. Este resultado mostra

como a troca de frasco pode influenciar o processo, mesmo que ambos possuam um mesmo inoculo inicial. Comparando-se os ensaios em duplicata, pode-se observar que o erro gerado na operação de troca de frasco é em torno de 35%.

A atividade específica máxima de asparaginase no ensaio com asparagina e aspartato foi em torno de 30,2 IU/g por peso seco de células. Estes resultados são muito superiores aos máximos obtidos com glicose e asparagina (16,41 IU/g) ou com glicose e aspartato (19,3 IU/g). Os gráficos indicam que, apesar de uma cinética mais lenta, a utilização de quantidades adequadas de um aminoácido ou grupos de aminoácidos como fontes de carbono e de nitrogênio podem vir a estimular a produção da enzima pela bactéria.

4.8 – Avaliação da Reprodutibilidade dos Experimentos

Tendo-se em vista que o escopo da pesquisa envolve a avaliação das fontes de erro e o controle de todas as variáveis do processo para a minimização dos mesmos, ao mesmo tempo que dois ou mais ensaios foram realizados numa mesma condição, investigou-se a reprodutibilidade das análises em cada condição de cultivo, como mostram as Figuras 4.9 a 4.15, analisando-se a média e o desvio padrão de cada amostra ao longo do tempo.

A reprodutibilidade de experimentos se refere ao grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição, enquanto que a repetitividade de ensaios se refere ao grau de concordância entre resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas exatamente sob as mesmas condições de medição.

Nos gráficos apresentados, os símbolos mostram a média entre a reprodutibilidade dos experimentos e as barras representam o desvio padrão da reprodução destes ensaios.

De um modo geral, observam-se desvios bem pequenos nos perfis de concentração de células, de glicose, de etanol e de pH, ao mesmo tempo em que para a asparagina, em alguns instantes de cultivo, grandes desvios são observados. Nos gráficos do aspartato, geralmente se observa que os maiores desvios se encontram quando não há mais asparagina no meio. Estes desvios podem ser devido a uma influência da metodologia analítica simultânea de dosagem da asparagina e do aspartato, apesar de o desvio encontrado ao se realizar a leitura de apenas um aminoácido ser muito pequeno. Tal influência pode ser

resultante não apenas da análise em si, como também do armazenamento das amostras centrifugadas dos cultivos fermentativos, uma vez que a metodologia analítica inicial realizava análise apenas da asparagina e o método colorimétrico de dosagem simultânea foi desenvolvido ao longo do trabalho.

Todavia, de um modo geral, pôde-se observar que as maiores variabilidades na reprodução dos ensaios estão relacionadas com a atividade de asparaginase, o principal produto de interesse. Tal dispersão, ao contrário dos grandes desvios para a asparagina ou o aspartato no início e no final de cultivo, respectivamente, é observado ao longo de todo o cultivo.

Em todas as condições estudadas com glicose como fonte de carbono e energia e asparagina como fonte de nitrogênio observou-se que em ao menos um dos experimentos a formação de aspartato foi muito pequena, ocorrendo em muitos casos no final da fase exponencial de crescimento. Nos experimentos com glicose como fonte de carbono e aspartato como fonte de nitrogênio foi verificado que em um dos ensaios o aspartato foi totalmente consumido, enquanto no outro apenas 42% do aspartato foi consumido. Como citado anteriormente, isto gerou uma grande dispersão nos resultados analíticos para o aspartato, que pode ser devido tanto a influência da metodologia analítica simultânea de dosagem de asparagina e aspartato, quanto a variações ocorridas devido ao armazenamento das amostras, uma vez que em muitos ensaios tal análise só foi realizada após um certo tempo de acondicionamento em congelador, quanto pelo fato de que em um dos ensaios houve troca de frasco após 18 horas de cultivo.

Uma das possíveis causas da grande dispersão na análise de atividade em todas as condições estudadas pode ser a sensibilidade do método de dosagem de amônia, a reação de Nessler, ou a própria reação enzimática do método de dosagem da atividade asparaginásica.

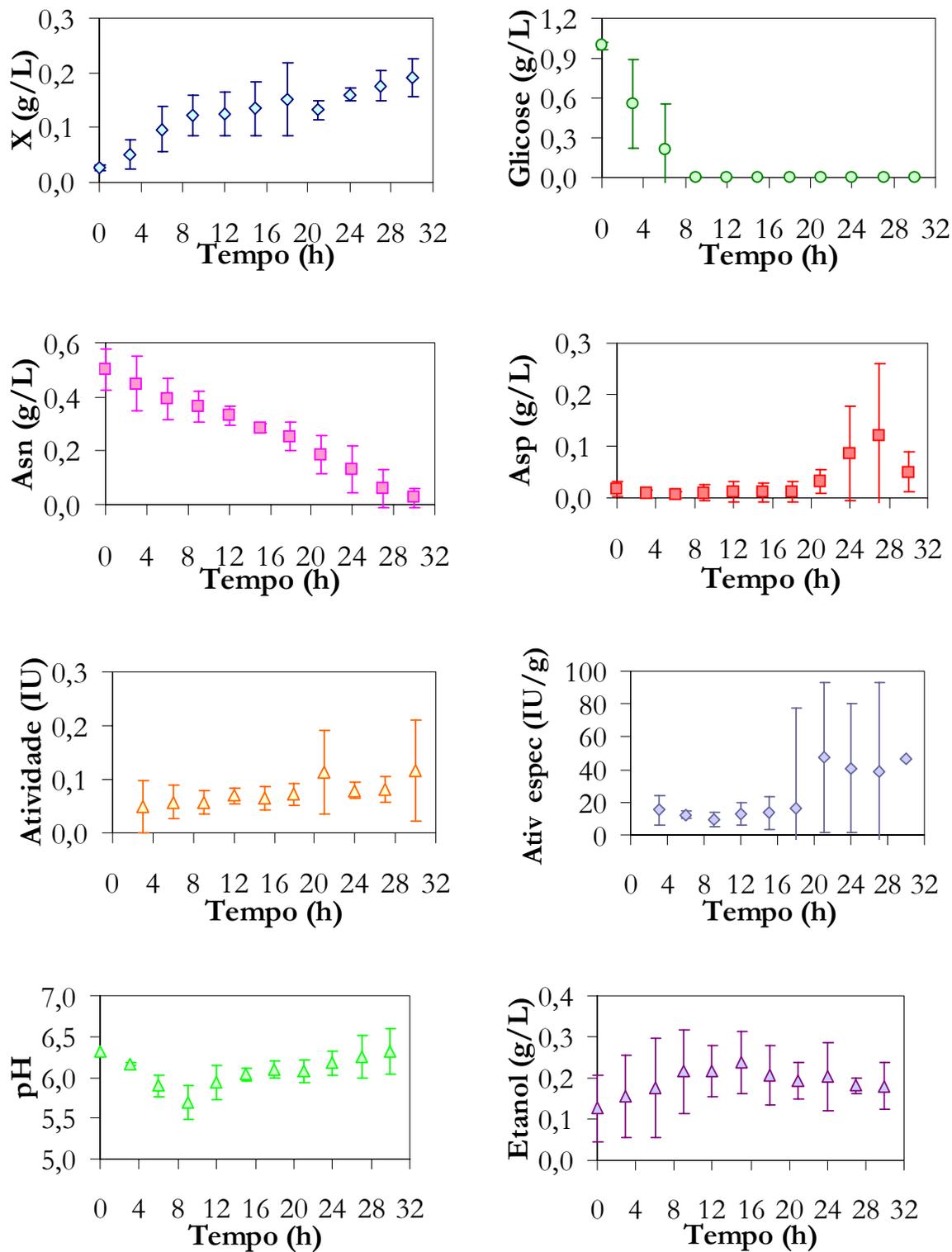


Figura 4.9 – Avaliação da reprodutibilidade de 3 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 1g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina.

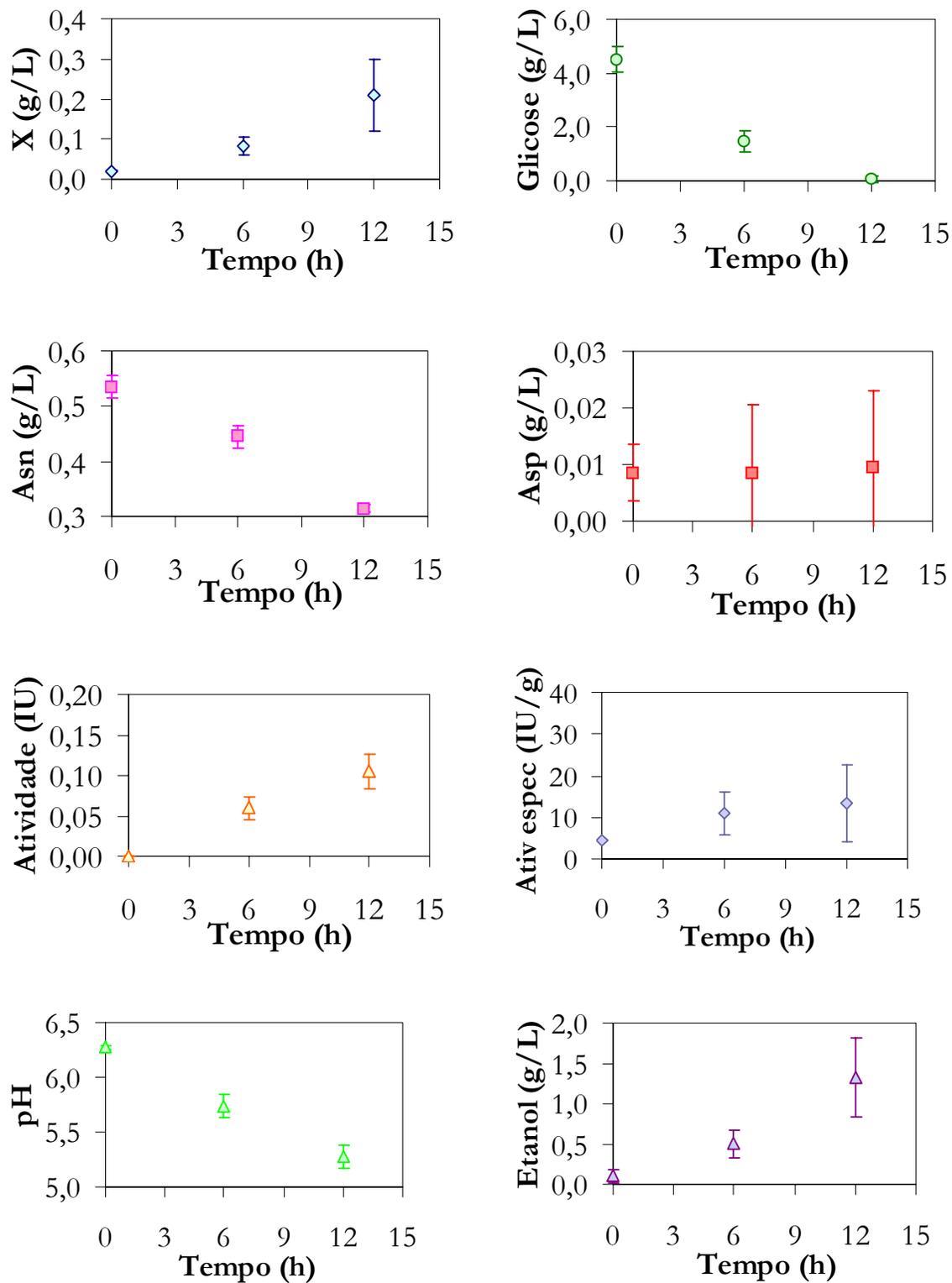


Figura 4.10 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina.

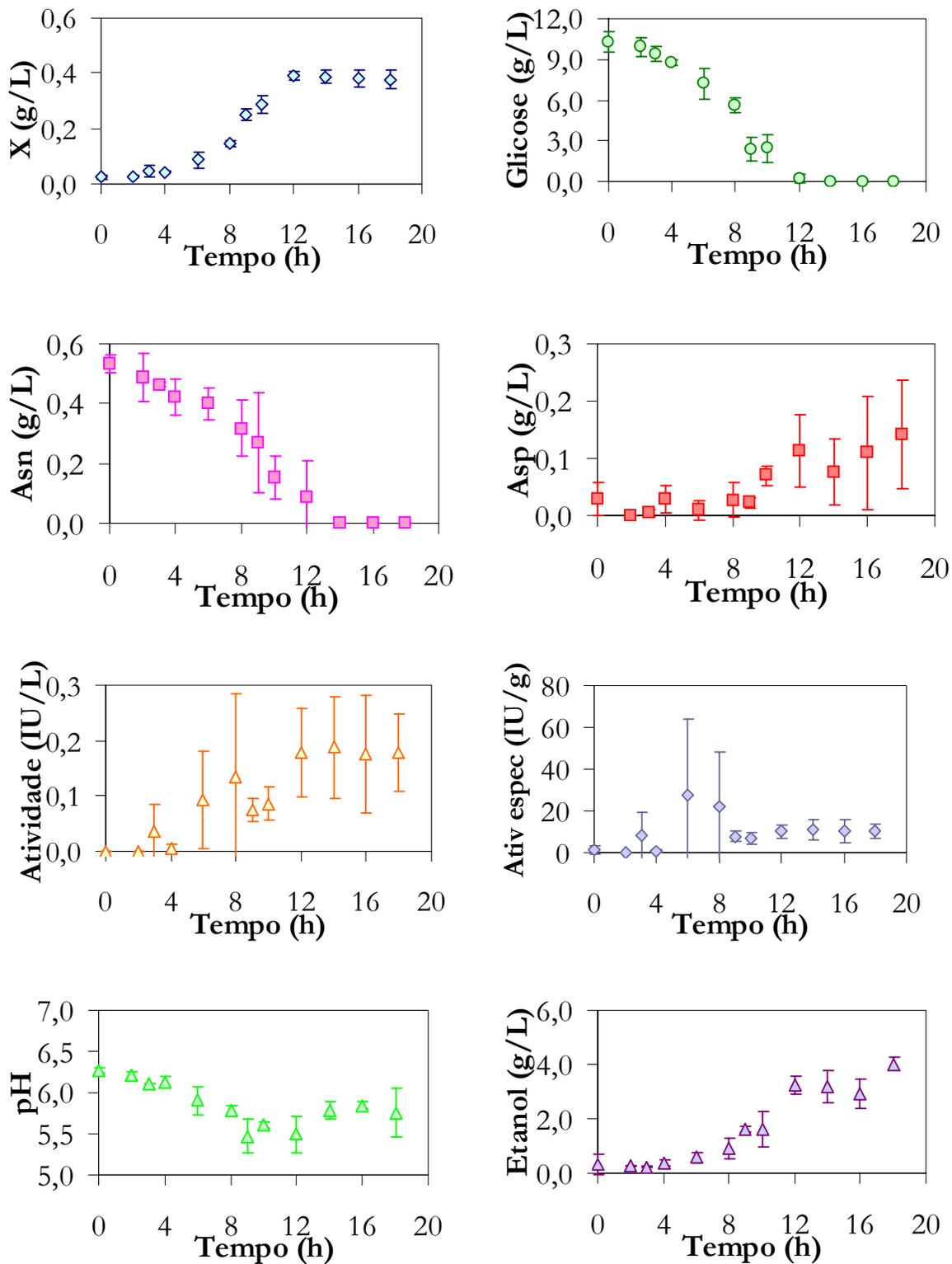


Figura 4.11 – Avaliação da reprodutibilidade de 4 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 10 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina.

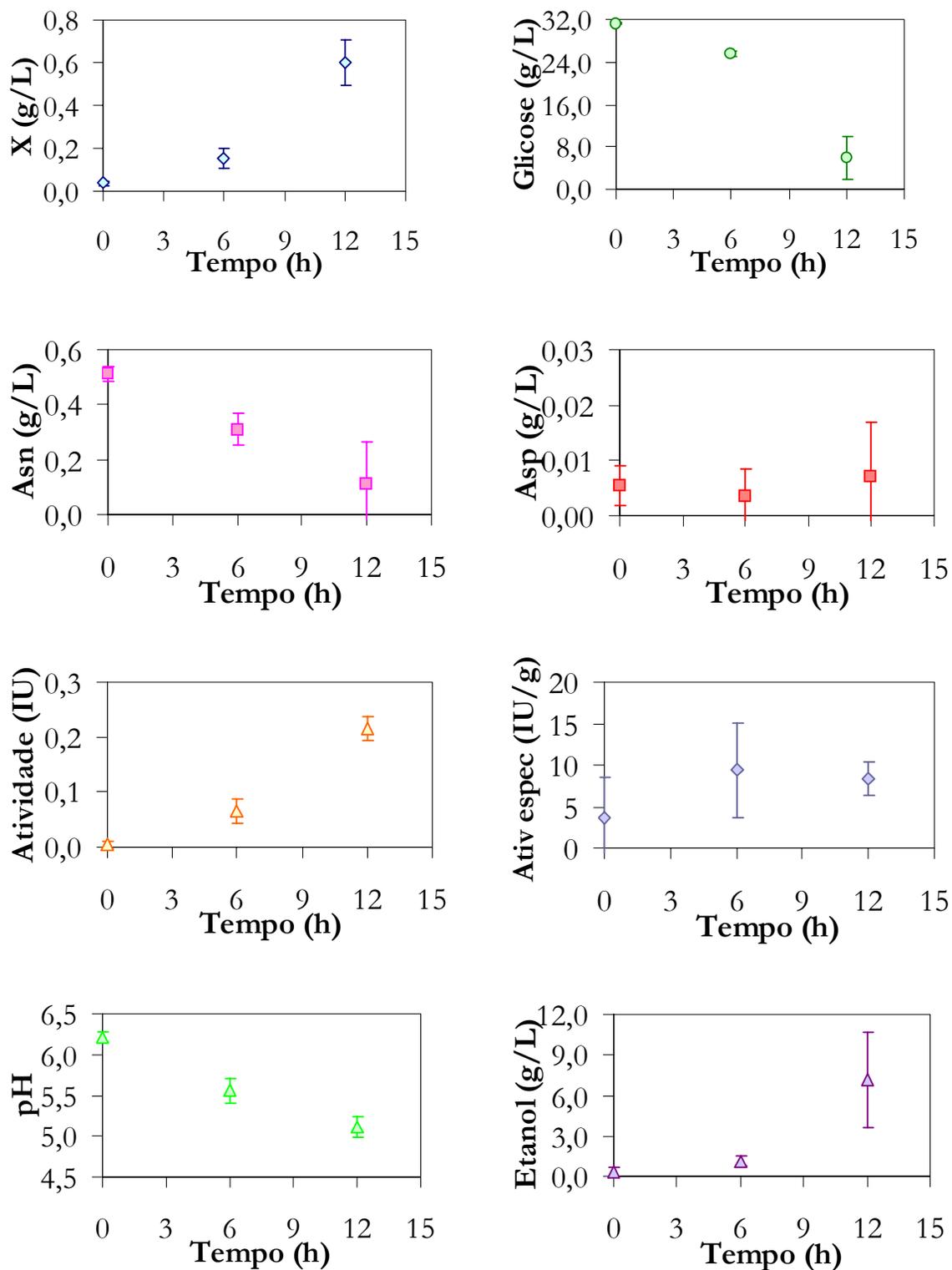


Figura 4.12 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 30 g/L de glicose + 0,5 g/L de asparagina.

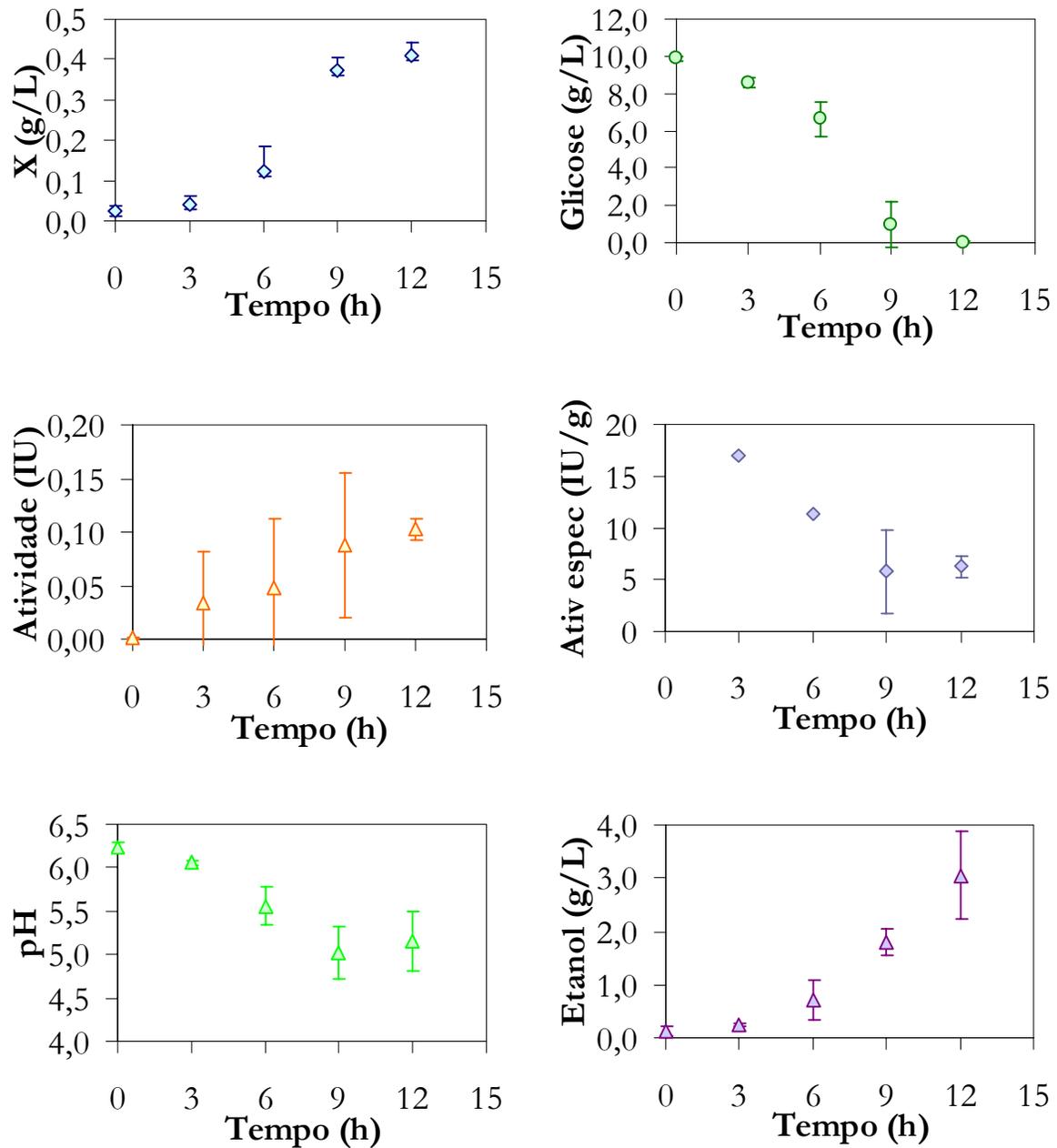


Figura 4.13 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios, com condição de inóculo diferente, no cultivo de *Z. mobilis* com 10 g/L de glicose + 0,5 g/L de sulfato de amônio.

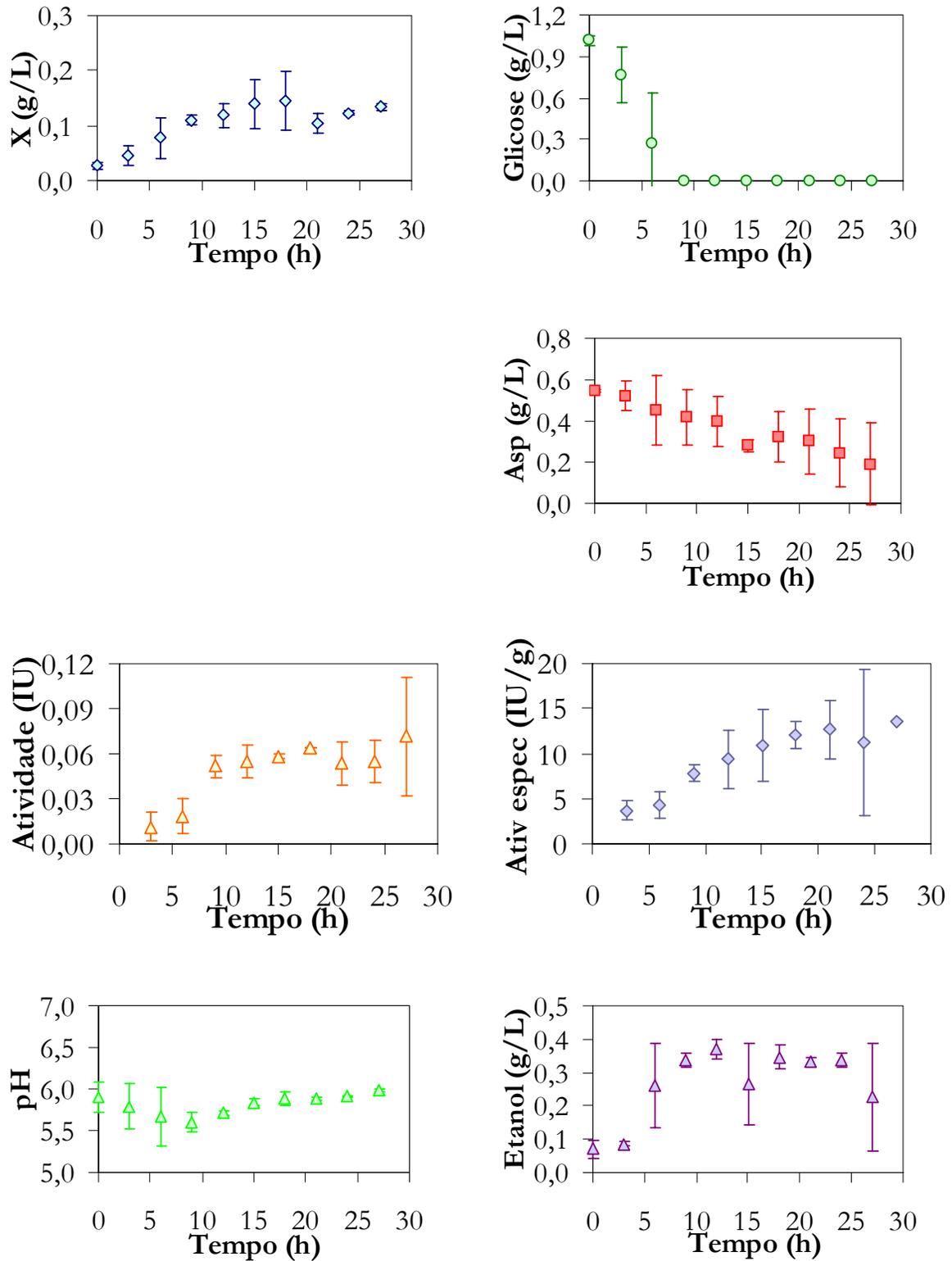


Figura 4.14 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 1g/L de glicose + 0,5 g/L de aspartato.

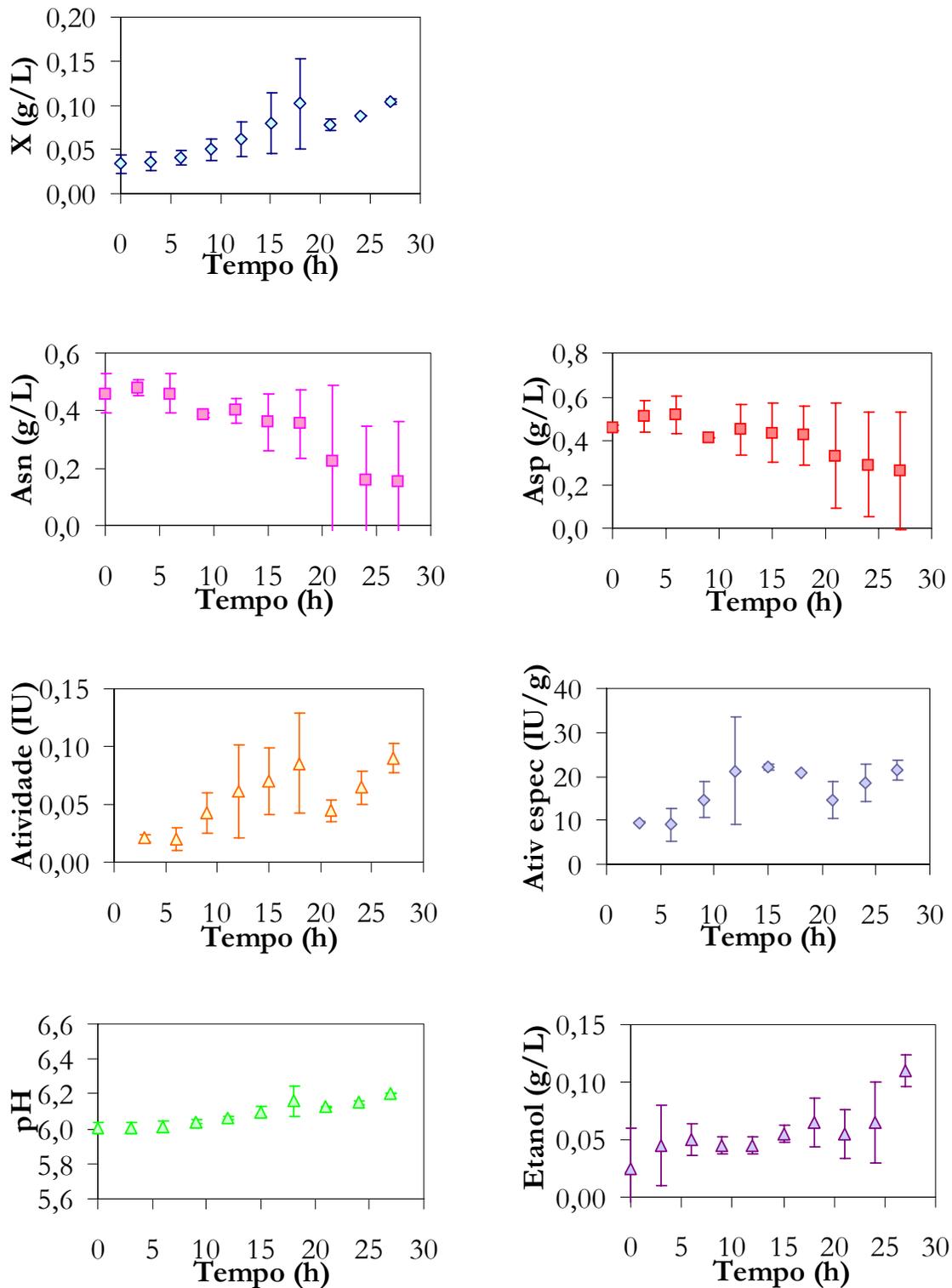


Figura 4.15 – Avaliação da reprodutibilidade de 2 ensaios no cultivo de *Z. mobilis* com 0,5 g/L de asparagina + 0,5 g/L de aspartato.

Baseando-se nos resultados obtidos e com todo o histórico de cada processo, fez-se uso dos diagramas de causa e efeito, ferramenta utilizada para apresentar a relação existente entre o resultado de um processo (efeito) e os fatores (causas) que podem afetar o resultado do mesmo. Tal diagrama, também denominado espinha de peixe ou diagrama de Ishikawa, é frequentemente utilizado para sumarizar e apresentar as possíveis causas do problema considerado, atuando como um guia para a identificação da causa fundamental do problema e para a determinação das medidas corretivas que deverão ser adotadas. No estudo em questão, três foram os processos analisados: o preparo do meio de cultivo, o preparo de inóculo e o procedimento analítico, representados pelas Figuras 4.16 a 4.18, respectivamente.

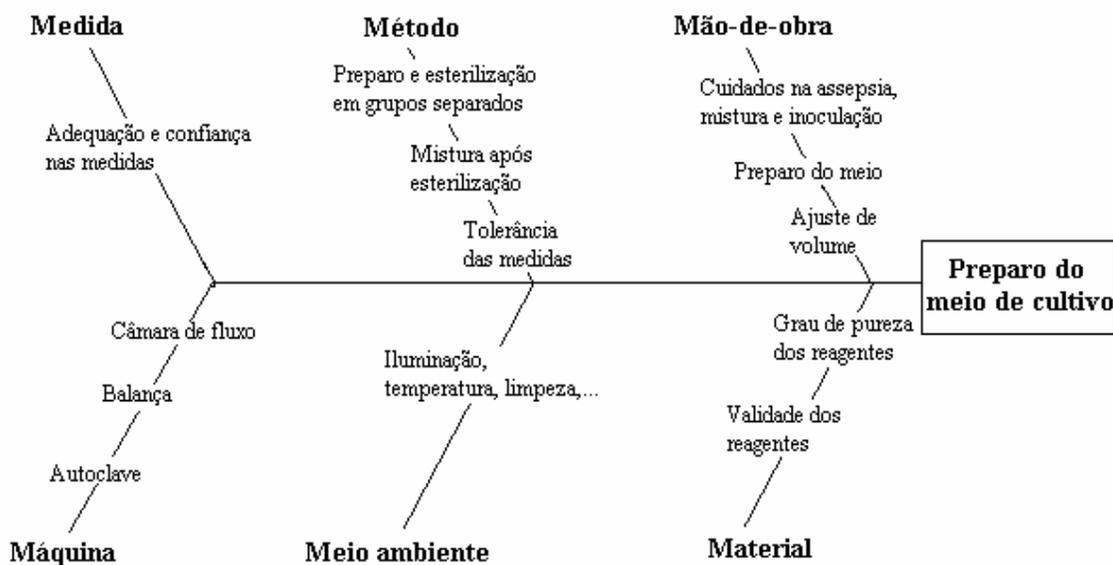


Figura 4.16 – Diagrama de causa e efeito para o processo de preparo de meio de cultivo.

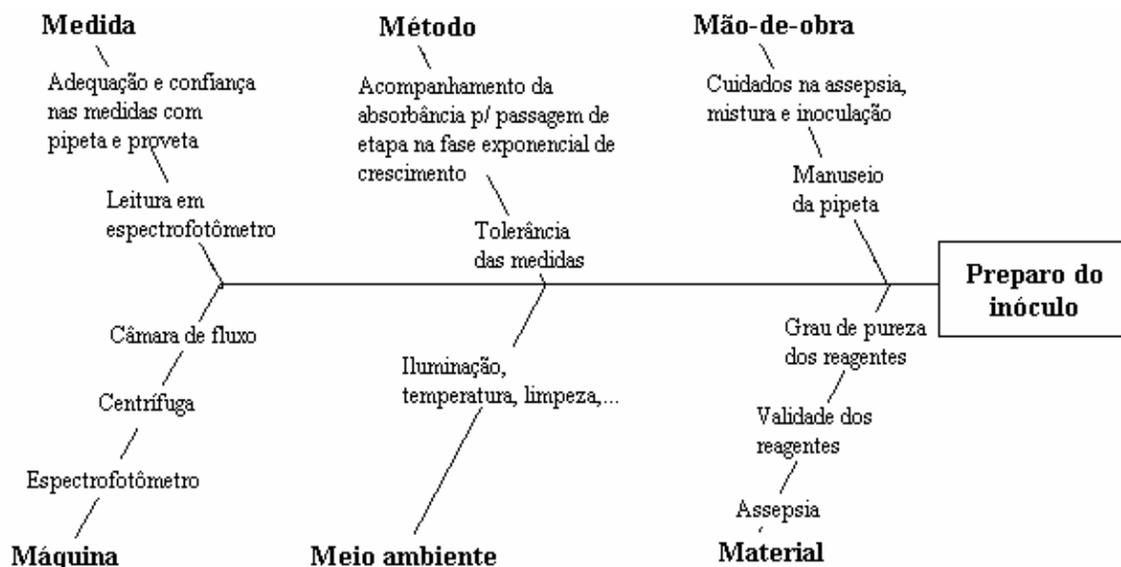


Figura 4.17 – Diagrama de causa e efeito para o processo de preparo de inóculo.

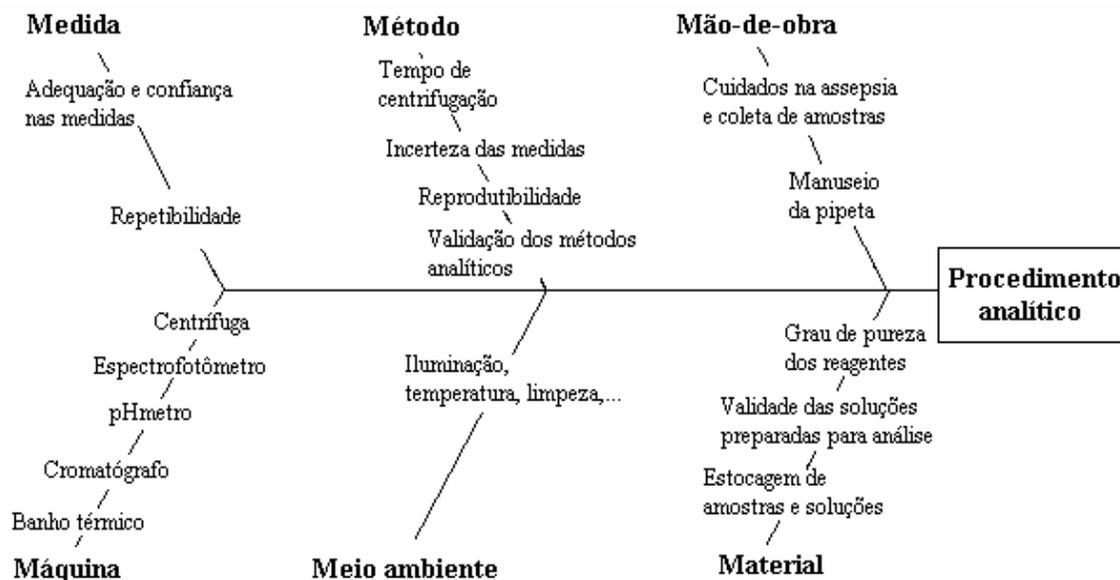


Figura 4.18 – Diagrama de causa e efeito para o procedimento analítico.

A partir das análises dos diagramas, chegou-se à conclusão de que as possíveis fontes de erro encontradas são:

- Instrumentos e materiais de análise, tornando-se necessária a análise das fontes de incerteza de cada equipamento e/ou material utilizado;

- O preparo do meio de cultivo, onde cada componente é esterilizado separadamente e misturado assepticamente em câmara de fluxo, gerando uma variabilidade no processo devido à transferência de volume;
- O preparo do inóculo, que necessita de uma padronização de cada etapa para que a transferência ocorra na fase exponencial de crescimento. Além disso, o volume de inóculo deve ser ajustado em função da massa para garantir a mesma concentração de células em todos os experimentos;
- A metodologia analítica, onde uma repetitividade das mesmas permitiria avaliar a média, desvio padrão, coeficiente de variação e intervalos de confiança de cada método;
- O tempo e a temperatura de armazenamento das amostras coletadas e das soluções utilizadas nas análises;
- Validade, pureza e condições corretas de manuseio e estocagem dos reagentes.

4.9 – Avaliação do Erro nos Instrumentos de Análise

Nesta etapa, tem-se como objetivo identificar as maiores fontes de incerteza associadas aos instrumentos de medição utilizados e compreender seus efeitos sobre o mensurando, adquirindo confiabilidade metrológica e, conseqüentemente, credibilidade das medições obtidas.

4.9.1 – Balança Analítica

Nas balanças analíticas, a calibração propriamente dita possui duas fontes de incerteza: a sensibilidade e a linearidade da balança. O certificado de calibração da balança fornece um erro de indicação equivalente a $\pm 0,2$ mg para a linearidade, valor da diferença máxima entre a carga real e a leitura da balança. Trata-se de uma declaração de incerteza sem informações relativas ao comportamento da variável dentro do intervalo especificado. Na avaliação de incerteza da balança, o fabricante recomenda a utilização de uma distribuição retangular para converter a contribuição de linearidade para uma incerteza padrão.

A variância estimada para a balança é, portanto:

$$\sigma^2 = \frac{a^2}{3} \quad (4.5)$$

$$\sigma = \frac{0,2}{\sqrt{3}} = 0,12 \text{ mg} \quad (4.6)$$

onde a é a amplitude para a linearidade e o valor 3 se refere à distribuição de probabilidade do tipo triangular.

Esta contribuição tem de ser contada duas vezes, uma vez para a tara e outra para o peso bruto, pois cada um deles é uma observação independente e os efeitos de linearidade não são correlacionados. Isto dá para a incerteza padrão da massa (u) um valor de 0,23 mg.

As Tabelas 4.7 e 4.8 mostram a variabilidade do resultado da medição nas duas balanças utilizadas no Laboratório de Bioprocessos, obtida através de 10 pesagens sucessivas de pesos padrão conhecidos. Os pesos padrão utilizados foram da marca TROEMNER Inc., classe 4, com variação de 1 mg a 100 g.

A amplitude (R) é definida como a diferença entre o maior e o menor valor obtido nas leituras. O %exatidão é a relação entre a média e o valor real. O coeficiente de variação, que exprime a precisão do processo, é a relação entre o desvio padrão da análise e a média.

$$R = X_{\text{máximo}} - X_{\text{mínimo}} \quad (4.7)$$

$$\% \text{ exatidão} = 100 \frac{\bar{X}}{X_{\text{real}}} \quad (4.8)$$

$$\% \text{ CV} = 100 \frac{\sigma}{\bar{X}} \quad (4.9)$$

A análise de variância é um teste estatístico amplamente difundido entre os analistas, e visa, fundamentalmente, verificar se existe uma diferença significativa entre as médias e se os fatores exercem influência em alguma variável dependente. Assim, em todos os instrumentos analisados também foi realizado o teste F para verificar se as

variâncias amostrais são equivalentes. O teste foi realizado com base nos menores e maiores valores dos desvios padrão da repetitividade das 10 medidas. Se o valor de F^* (F calculado) é menor que o valor de F tabelado no limite de confiança analisado, o resultado da análise não é significativo, ou seja, as diferenças entre as medidas são apenas aleatórias. Para 95% de confiança, sabe-se que:

$$F_{0,975} < F^* < F_{0,025} \quad (4.10)$$

$$F^* = \frac{\sigma_{\text{maior}}^2}{\sigma_{\text{menor}}^2} \quad (4.11)$$

Vale salientar que tais estudos admitem implicitamente que as medidas experimentais estão distribuídas de forma normal e que todas as medidas representam o mesmo fenômeno.

Tabela 4.7 - Avaliação da incerteza associada à massa na balança analítica Explorer OHAUS de 3 casas decimais.

	mg					g					
	5	10	20	50	100	500	2	10	20	50	100
1	5,0	11,0	20,0	50,0	101,0	500,0	2,000	10,000	20,000	50,000	100,001
2	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	501,0	2,000	10,000	20,000	50,000	100,001
3	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	500,0	2,000	10,001	20,000	50,000	100,001
4	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	500,0	2,000	10,000	20,001	50,001	100,000
5	5,0	11,0	20,0	50,0	100,0	500,0	2,000	10,000	20,001	50,001	100,000
6	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	500,0	1,999	10,000	20,000	50,000	100,001
7	5,0	10,0	20,0	49,0	100,0	500,0	2,000	10,000	20,000	50,000	100,001
8	5,0	10,0	20,0	50,0	100,0	500,0	2,000	10,000	19,999	50,001	100,001
9	4,0	10,0	19,0	50,0	99,0	499,0	2,000	9,999	19,999	50,000	100,002
10	5,0	10,0	20,0	51,0	100,0	501,0	2,001	10,000	20,000	50,001	100,000
média	4,9	10,2	19,9	50,0	100,0	500,1	2,000	10,000	20,000	50,000	100,001
amplitude	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0	2,0	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002
desvio padrão	0,32	0,42	0,32	0,47	0,47	0,57	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001
incerteza	0,25	0,27	0,25	0,27	0,27	0,29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
% exatidão	98,0	102,0	99,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
coef. variação (%)	6,45	4,13	1,59	0,94	0,47	0,11	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabela 4.8 - Avaliação da incerteza associada à massa na balança Mettler AE260 de 4 casas decimais.

	mg						g				
	2	5	10	50	100	500	2	10	20	50	100
1	2,1	5,0	9,8	50,0	100,0	500,0	2,0000	9,9999	20,0000	50,0000	100,0000
2	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0000	10,0000	20,0001	50,0000	100,0000
3	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	499,9	2,0001	10,0000	20,0000	50,0000	100,0000
4	1,9	4,9	10,0	50,1	100,0	500,0	2,0000	9,9999	20,0001	50,0000	100,0000
5	2,0	5,0	10,0	49,8	100,0	500,0	2,0000	10,0000	20,0000	50,0000	100,0000
6	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0000	9,9999	20,0001	50,0000	100,0000
7	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0001	10,0000	20,0001	50,0000	100,0000
8	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0000	10,0000	20,0000	49,9999	100,0000
9	2,0	5,0	10,0	50,0	99,9	500,0	2,0000	9,9999	20,0000	50,0000	100,0000
10	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0000	10,0000	20,0000	50,0000	100,0000
média	2,0	5,0	10,0	50,0	100,0	500,0	2,0000	10,0000	20,0000	50,0000	100,0000
amplitude	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000
desvio padrão	0,05	0,03	0,06	0,07	0,03	0,03	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000
incerteza	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
% exatidão	100,0	99,8	99,8	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
coef. variação (%)	2,36	0,63	0,63	0,15	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Os dados apresentados indicam que as balanças analíticas não apresentam variabilidade significativa para serem apontadas como fonte de erro em nosso processo. Na balança OHAUS, por se ter apenas 3 casas decimais, a incerteza da medição em mg está cerca de 10% acima da incerteza padrão definida pelo fabricante (0,12 mg). Todavia, isto não vem a desqualificar o instrumento, uma vez que se obteve % exatidão próximo a 100% e valores de coeficiente de variação inferiores a 15%.

Na Tabela 4.9, aplica-se o teste F entre o maior e o menor valor do desvio padrão da massa encontrada em cada balança e observa-se que, com 95% de confiança, as variâncias são consideradas equivalentes apenas para a balança OHAUS, pois os seus valores encontram-se dentro da faixa de confiança de $0,25 < F^* < 4,03$. Para a balança Mettler, o valor de F^* está acima do valor tabelado, mostrando que as variâncias são estatisticamente diferentes, mesmo apresentando a incerteza dentro da faixa estabelecida pelo fabricante e coeficiente de variação inferior a 15%, valor este definido para a precisão de uma medida analítica.

Tabela 4.9 – Análise do teste F para a balança analítica

	Balança OHAUS	Balança Mettler
Maior desvio	0,57	0,07
Menor desvio	0,32	0,03
F*	3,17	5,44
p (F < F*)	0,95	0,99

4.9.2 – Medidor de pH

Para o pHmetro, a calibração do mesmo é verificada diariamente pelo uso de duas soluções tampão, pH 7,0 e pH 4,0. O pHmetro utilizado, Mettler MP220, possui um indicativo de boa funcionabilidade (instalação e estabilidade) do aparelho e do eletrodo após o ajuste com as soluções tampão. Apesar disto, foram realizadas medidas nos tampões, na água destilada e no meio de cultivo, antes e após o ajuste do pHmetro com as soluções tampão. A Tabela 4.10 apresenta os dados obtidos a partir das leituras realizadas aleatoriamente, com temperaturas das amostras na faixa de 22°C <T<25°C. A precisão relativa do aparelho para a leitura do pH é $\pm 0,01$.

Tabela 4.10 - Avaliação da incerteza associada ao pHmetro Mettler MP220.

	Antes do ajuste				Após ajuste			
	7,0	4,0	Água	Meio	7,0	4,0	Água	Meio
1	7,00	4,02	5,66	6,22	7,00	4,00	5,19	6,30
2	7,00	4,01	5,62	6,27	7,00	4,01	5,18	6,30
3	6,99	4,01	5,53	6,32	7,00	4,00	5,10	6,30
4	6,99	4,01	5,59	6,18	7,00	4,02	5,06	6,28
5	6,99	4,01	5,51	6,23	6,99	4,02	5,13	6,29
6	6,99	4,00	5,59	6,32	7,00	4,01	5,20	6,27
7	6,99	4,01	5,51	6,26	7,00	4,00	5,12	6,27
8	7,00	4,02	5,57	6,24	7,00	4,01	5,13	6,29
9	6,99	4,01	5,52	6,25	7,00	4,00	5,11	6,30
10	6,98	4,00	5,60	6,24	6,99	4,00	5,18	6,27
média	6,99	4,01	5,57	6,25	7,00	4,01	5,14	6,29
amplitude	0,02	0,02	0,15	0,14	0,01	0,02	0,14	0,03
desvio padrão	0,01	0,01	0,05	0,04	0,00	0,01	0,05	0,01
precisão	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00
% exatidão	99,89	100,25			99,97	100,18		
coef. variação (%)	0,09	0,17	0,92	0,69	0,06	0,21	0,89	0,21

Os dados apresentados antes e após a calibração do aparelho indicam que as medidas estão dentro da precisão do aparelho, além de mostrar que mesmo sem a calibração diária o aparelho opera em boas condições.

Como observado na Tabela 4.10, pode-se concluir que a precisão do aparelho para todas as medidas está dentro da faixa estabelecida pelo fabricante, de 0,01. O teste F aplicado entre os desvios dos componentes, antes e depois do ajuste, mostra que os valores de F^* estão dentro da faixa de confiança de 95% ($0,25 < F^* < 4,03$), indicando que as variâncias podem ser consideradas equivalentes. Entretanto, levando-se em conta apenas as medições e tomando-se a relação entre o menor desvio e o maior desvio, tanto antes quanto depois do ajuste, as variâncias não podem ser consideradas equivalentes, uma vez que os valores de F^* calculados são inferiores ao valor tabelado para 95% de confiança. Isto indica a necessidade diária de ajuste do pHmetro não apenas para se avaliar as condições do eletrodo, mas também para se evitar possíveis erros sistemáticos na medida.

4.9.3 – Medição de volume com pipeta volumétrica

A verificação do desempenho da pipeta, na realidade, avalia o conjunto (pipeta + ponteira + operador). Nesta avaliação, todos os tipos de ponteiras ajustáveis a cada pipeta foram analisadas e não se leva em conta perdas por evaporação para volumes inferiores de 50 μ L. Também, na conversão para volume das massas obtidas na balança, não são feitas correções referentes à temperatura e pressão, da mesma forma que não foi realizado na avaliação das balanças.

Os testes foram realizados na balança OHAUS, que é a balança mais utilizada no laboratório para o preparo de soluções. Para cada faixa de volume da pipeta Eppendorf, faixas de conformidade para a exatidão e precisão são definidas pelo fabricante nos volumes mínimo, intermediário e médio de cada pipeta, conforme mostra a Tabela 4.11.

As Tabelas 4.12 a 4.15 apresentam os dados obtidos nas varreduras com diferentes ponteiras e pipetas, tendo a água destilada como parâmetro de pesagem, uma vez que é sabido que 1 μ L equivale a 1 mg.

Tabela 4.11 – Especificações técnicas das pipetas Eppendorf fornecidas pelo fabricante.

Faixa	Volume (μL)	Exatidão	Exatidão	Precisão
2 – 20 μL	2	$\pm 0,12 \mu\text{L}$	$\pm 5,0 \%$	$\leq 1,5\%$
	10	$\pm 0,12 \mu\text{L}$	$\pm 1,2 \%$	$\leq 0,6\%$
	20	$\pm 0,20 \mu\text{L}$	$\pm 1,0 \%$	$\leq 0,3\%$
20 – 200 μL	20	$\pm 0,50 \mu\text{L}$	$\pm 2,5 \%$	$\leq 0,7\%$
	100	$\pm 1,0 \mu\text{L}$	$\pm 1,0 \%$	$\leq 0,3\%$
	200	$\pm 1,2 \mu\text{L}$	$\pm 0,6 \%$	$\leq 0,2\%$
100 – 1000 μL	100	$\pm 3,0 \mu\text{L}$	$\pm 3,0 \%$	$\leq 0,6\%$
	500	$\pm 5,0 \mu\text{L}$	$\pm 1,0 \%$	$\leq 0,2\%$
	1000	$\pm 6,0 \mu\text{L}$	$\pm 0,6 \%$	$\leq 0,2\%$
500 – 5000 μL	500	$\pm 12 \mu\text{L}$	$\pm 2,4 \%$	$\leq 0,6\%$
	2500	$\pm 30 \mu\text{L}$	$\pm 1,2 \%$	$\leq 0,25\%$
	5000	$\pm 30 \mu\text{L}$	$\pm 0,6 \%$	$\leq 0,15\%$

Tabela 4.12 – Avaliação da conformidade da pipeta automática de 2 – 20 μL .

Pipeta 2 - 20 μL	ponteira branca Eppendorf			ponteira amarela Brand		
	2	10	20	2	10	20
1	2,0	9,0	19,0	2,0	10,0	20,0
2	2,0	10,0	19,0	2,0	10,0	19,0
3	2,0	8,0	19,0	1,0	10,0	20,0
4	1,0	11,0	20,0	2,0	10,0	20,0
5	2,0	9,0	20,0	2,0	9,0	19,0
6	1,0	10,0	19,0	2,0	10,0	19,0
7	2,0	9,0	21,0	2,0	10,0	20,0
8	1,0	10,0	19,0	1,0	10,0	20,0
9	2,0	9,0	20,0	1,0	10,0	19,0
10	2,0	10,0	20,0	2,0	10,0	19,0
média (μL)	1,70	9,50	19,60	1,70	9,90	19,50
amplitude (μL)	1,00	3,00	2,00	1,00	1,00	1,00
exatidão (μL)	-0,30	-0,50	-0,40	-0,30	-0,10	-0,50
exatidão (%)	15,0	5,0	2,0	15,0	1,0	2,5
desvio padrão (μL)	0,48	0,85	0,70	0,48	0,32	0,53
coef. variação (%)	28,41	8,95	3,57	28,41	3,19	2,70

Por existirem 2 pipetas automáticas na faixa de 20 – 200 μL , avaliou-se a precisão e exatidão em ambas. A diferença entre ambas está em uma marcação na própria pipeta.

Tabela 4.13 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 20 – 200 μL .

Pipeta 20 - 200 μL marcada 16/04/03	ponteira branca Eppendorf			ponteira amarela Brand		
	20	100	200	20	100	200
1	20,0	99,0	200,0	21,0	100,0	200,0
2	21,0	100,0	201,0	21,0	98,0	199,0
3	21,0	99,0	201,0	20,0	100,0	198,0
4	20,0	101,0	201,0	21,0	100,0	200,0
5	19,0	100,0	200,0	20,0	100,0	200,0
6	20,0	100,0	200,0	21,0	100,0	200,0
7	20,0	100,0	201,0	20,0	100,0	200,0
8	20,0	100,0	201,0	21,0	100,0	200,0
9	21,0	100,0	200,0	21,0	97,0	197,0
10	19,0	100,0	200,0	21,0	100,0	198,0
média (μL)	20,10	99,90	200,50	20,70	99,50	199,20
amplitude (μL)	2,00	2,00	1,00	1,00	3,00	3,00
exatidão (μL)	0,10	-0,10	0,50	0,70	-0,50	-0,80
exatidão (%)	0,5	0,1	0,3	3,5	0,5	0,4
desvio padrão (μL)	0,74	0,57	0,53	0,48	1,08	1,14
coef. variação (%)	3,67	0,57	0,26	2,33	1,09	0,57
Pipeta 20 - 200 μL sem marcação	ponteira branca Eppendorf			ponteira amarela Brand		
	20	100	200	20	100	200
1	20,0	100,0	201,0	20,0	101,0	201,0
2	21,0	101,0	202,0	21,0	101,0	201,0
3	21,0	101,0	202,0	21,0	101,0	201,0
4	21,0	101,0	202,0	20,0	101,0	201,0
5	21,0	101,0	202,0	21,0	99,0	201,0
6	21,0	99,0	202,0	19,0	102,0	201,0
7	21,0	101,0	201,0	20,0	101,0	201,0
8	21,0	101,0	202,0	21,0	99,0	201,0
9	20,0	101,0	202,0	20,0	101,0	201,0
10	21,0	99,0	202,0	21,0	101,0	201,0
média (μL)	20,80	100,50	201,80	20,40	100,70	201,00
amplitude (μL)	1,00	2,00	1,00	2,00	3,00	0,00
exatidão (μL)	0,80	0,50	1,80	0,40	0,70	1,00
exatidão (%)	4,0	0,5	0,9	2,0	0,7	0,5
desvio padrão (μL)	0,42	0,85	0,42	0,70	0,95	0,00
coef. variação (%)	2,03	0,85	0,21	3,43	0,94	0,00

Provavelmente devido à incerteza da balança, as maiores variações ficaram nos volumes inferiores a 100 μL . Os erros sistemáticos (exatidão) estiveram fora da faixa de especificação do fabricante para volumes inferiores a 100 μL e os erros aleatórios (precisão) para volumes inferiores a 500 μL , indicando a necessidade de procedimentos

padronizados de manuseio, limpeza e verificação periódica da performance das pipetas automáticas. O uso de ponteiros da marca Brand, que se ajustam bem às pipetas automáticas, mostrou resultados satisfatórios, com exatidão e precisão semelhantes às ponteiros Eppendorf.

Tabela 4.14 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 100 – 1000 μL .

Pipeta 100 - 1000 μL	ponteira branca Eppendorf			ponteira azul Brand		
	100	500	1000	100	500	1000
1	100,0	501,0	1000,0	105,0	501,0	1000,0
2	101,0	499,0	999,0	106,0	502,0	1001,0
3	100,0	502,0	1002,0	105,0	503,0	1000,0
4	101,0	499,0	1000,0	103,0	502,0	1002,0
5	99,0	499,0	999,0	103,0	501,0	999,0
6	101,0	502,0	1000,0	106,0	501,0	1000,0
7	101,0	502,0	1002,0	105,0	500,0	1001,0
8	102,0	500,0	999,0	107,0	502,0	1000,0
9	100,0	500,0	1001,0	106,0	504,0	1004,0
10	101,0	501,0	1000,0	106,0	500,0	1000,0
média (μL)	100,60	500,50	1000,20	105,20	501,60	1000,70
amplitude (μL)	3,00	3,00	3,00	4,00	4,00	5,00
exatidão (μL)	0,60	0,50	0,20	5,20	1,60	0,70
exatidão (%)	0,6	0,1	0,0	5,2	0,3	0,1
desvio padrão (μL)	0,84	1,27	1,14	1,32	1,26	1,42
coef. variação (%)	0,84	0,25	0,11	1,25	0,25	0,14

Tabela 4.15 – Avaliação da conformidade das duas pipetas automáticas de 500 – 5000 μL .

Pipeta 500 - 5000 μL	ponteira estrelada Eppendorf			ponteira lisa Brand		
	500	2500	5000	500	2500	5000
1	504,0	2504,0	5003,0	505,0	2491,0	5002,0
2	501,0	2499,0	5002,0	506,0	2510,0	4997,0
3	506,0	2506,0	5002,0	499,0	2507,0	4999,0
4	507,0	2493,0	5006,0	503,0	2509,0	5000,0
5	507,0	2503,0	4995,0	498,0	2501,0	4986,0
6	503,0	2504,0	4996,0	505,0	2502,0	4990,0
7	502,0	2500,0	5007,0	505,0	2507,0	5002,0
8	508,0	2502,0	4999,0	502,0	2500,0	4992,0
9	507,0	2502,0	5002,0	501,0	2507,0	4993,0
10	502,0	2501,0	5009,0	499,0	2496,0	4989,0
média (μL)	504,70	2501,40	5002,10	502,30	2503,00	4995,00
amplitude (μL)	7,00	13,00	14,00	8,00	19,00	16,00
exatidão (μL)	4,70	1,40	2,10	2,30	3,00	-5,00
exatidão (%)	0,9	0,1	0,0	0,5	0,1	0,1
desvio padrão (μL)	2,58	3,60	4,53	2,95	6,15	5,75
coef. variação (%)	0,51	0,14	0,09	0,59	0,25	0,12

Aplicando-se o teste F entre o maior e o menor valor de desvio padrão para cada tipo de pipeta e de ponteira, observa-se na Tabela 4.16 que com 95% de confiança as variâncias são consideradas equivalentes apenas para algumas pipetas e ponteiras, pois os seus valores encontram-se dentro da faixa de confiança de $0,25 < F^* < 4,03$. Na pipeta de 20 – 200 μL marcada, a análise estatística mostra que para a ponteira Brand as variâncias são diferentes, ao passo que para a pipeta sem marcação e de igual faixa de volume é a ponteira Eppendorf que não apresenta equivalência estatística. Na ponteira Brand da pipeta sem marcação, foram desprezados os resultados para a medida de 200 μL por apresentarem o mesmo valor em todas as medidas, gerando desvio padrão e variância nulos. Com isso, o resultado entre as variâncias se mostrou equivalente. Para a pipeta de 500 a 5000 μL , a ponteira Brand apresenta diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 4.16 – Análise do teste F para as pipetas automáticas.

	Tipo ponteira	Maior desvio	Menor desvio	F*
2 – 20 μL	Eppendorf	0,85	0,48	3,10
	Brand	0,53	0,32	2,78
20 – 200 μL marcada 16/04/03	Eppendorf	0,74	0,53	1,96
	Brand	1,14	0,48	5,52
20 – 200 μL sem marcação	Eppendorf	0,85	0,42	4,06
	Brand	0,95	0,70	1,84
100 – 1000 μL	Eppendorf	1,27	0,84	2,27
	Brand	1,42	1,26	1,26
500 – 5000 μL	Eppendorf	4,53	2,58	3,08
	Brand	6,15	2,95	4,35

4.9.4 - Espectrofotômetro

Para o espectrofotômetro foram realizadas medidas em 3 comprimentos de onda distintos, utilizados em algumas metodologias analíticas. Em cada comprimento de onda foi realizado um procedimento de medição diferente. Em 350 nm, as leituras foram realizadas rinsando a amostra e colocando uma réplica. Em 480 nm, efetuava-se a leitura com a

mesma amostra, fazendo-se apenas a correção do branco, caso necessário. No comprimento de onda de 600 nm a leitura foi feita com a mesma amostra e sem correção do branco. A Tabela 4.17 apresenta os resultados obtidos, tendo-se conhecimento que a precisão do espectrofotômetro Spectronic 20D+ é $\pm 2\%$ da transmitância.

Tabela 4.17 – Avaliação das medidas realizadas em espectrofotômetro Spectronic 20D⁺.

	350 nm	480 nm	600 nm
1	0,171	0,322	0,203
2	0,171	0,322	0,201
3	0,170	0,322	0,203
4	0,171	0,322	0,202
5	0,170	0,321	0,200
6	0,171	0,321	0,201
7	0,170	0,321	0,199
8	0,171	0,323	0,204
9	0,170	0,323	0,199
10	0,170	0,322	0,199
média	0,171	0,322	0,201
amplitude	0,001	0,002	0,005
desvio padrão	0,001	0,001	0,002
coef. variação (%)	0,31	0,23	0,92

Realizando-se o teste F, observa-se que as variâncias não são consideradas equivalentes ao se comparar os diferentes comprimentos de onda, uma vez que os valores de F* estão fora da faixa de confiança de 95% ($0,25 < F^* < 4,03$). Além disto, o coeficiente de variação da repetitividade (precisão) das leituras é inferior a 15%, o que confirma a boa funcionalidade do equipamento.

Paralelamente, foram analisados os dados obtidos de diferentes curvas de calibração de uma mesma solução de sulfato de amônia, com medições em 6 concentrações diferentes, uma vez que a curva de calibração, em geral, representa o principal fator de incerteza em um experimento. A finalidade de tal estudo foi a de verificar a influência de uma curva preparada no dia da análise e de uma curva padronizada a partir da média de todas as medições. A Tabela 4.18 apresenta as equações obtidas a partir das análises realizadas em cinco diferentes concentrações além do branco, bem como o coeficiente de correlação obtido em cada curva. Observa-se uma pequena variação entre as curvas, bem como um

bom coeficiente de correlação em todas as curvas analisadas. As cinco curvas analisadas estão ilustradas na Figura 4.19.

Com a finalidade de avaliar se os erros de predição são compatíveis com os erros experimentais, faz-se o cálculo do erro de predição do modelo proposto e o cálculo do erro experimental obtido a partir dos dados das curvas obtidas. A variância da absorbância considerada foi obtida das leituras da concentração de $0,6 \mu\text{molNH}_3$, cujo valor é $8,8 \cdot 10^{-6}$ e média amostral igual a 0,098.

$$\sigma_{\text{pred}}^2 = \frac{F}{NE - NP} \quad (4.12)$$

$$\frac{\sigma_y^2}{y^2} = \frac{\sigma_a^2}{a^2} + \frac{\sigma_{\text{abs}}^2}{\text{abs}^2} \quad (4.13)$$

onde F (*final loss*) é obtido a partir da análise no programa computacional Statistica[®], NE é o número de experimentos realizados e NP o número de parâmetros.

Tabela 4.18 – Avaliação da reprodutibilidade da curva de calibração de sulfato de amônia.

y = a . abs		
	a	R
	6,1907	0,9985
	5,8823	0,9983
	5,7367	0,9971
	5,4873	0,9973
	6,0024	0,9984
média	5,8599	
amplitude	0,7034	
desvio padrão	0,2666	
coef. variação (%)	4,55	

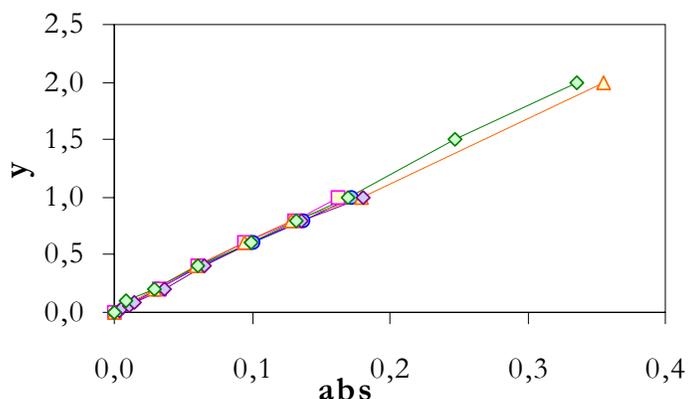


Figura 4.19 - Curvas de calibração de sulfato de amônia para avaliação de reprodutibilidade.

O valor de F obtido foi 0,57647, gerando um erro de predição igual a 0,0155, considerando-se 38 experimentos e apenas 1 parâmetro. O erro experimental obtido foi igual a 0,0010. Como este valor é muito menor que o valor da predição, considera-se que a determinação experimental de cada análise é melhor que uma avaliação conjunta dos dados, pois tal avaliação conjunta poderia conduzir a diferenças significativas.

4.9.5 – Cromatógrafo gasoso

No cromatógrafo gasoso, uma das formas de minimizar os erros envolvidos na injeção de amostras durante as análises de concentração de etanol é a leitura em triplicata de cada amostra. Além disso, a cada dia em que se é utilizado o cromatógrafo, uma nova curva de calibração a partir de seis amostras de diferentes concentrações é realizada. Assim, da mesma forma que realizado no espectrofotômetro, a Tabela 4.19 mostra que a precisão na reprodutibilidade da curva de calibração é muito boa, indicando que o equipamento não parece influenciar num erro de medição ao longo do processo. A Figura 4.20 ilustra os dados analisados em cada uma das curvas geradas.

A partir dos resultados das avaliações dos instrumentos e equipamentos, pode-se admitir que os mesmos não são a principal causa da incerteza e não reprodutibilidade dos ensaios.

Para a avaliação do erro experimental, a variância da área considerada foi obtida das leituras da concentração de etanol com 2,05 g/L, cujo valor é 55,072 e média amostral igual a 159,27.

Tabela 4.19 - Avaliação da reprodutibilidade da curva de calibração de etanol no cromatógrafo CG.

y = a . área		
	a	R
1	0,0121	0,9974
2	0,0129	0,9996
3	0,0120	0,9899
4	0,0128	0,9984
5	0,0118	0,9998
média	0,0123	
amplitude	0,0011	
desvio padrão	0,0005	
coef. variação (%)	4,03	

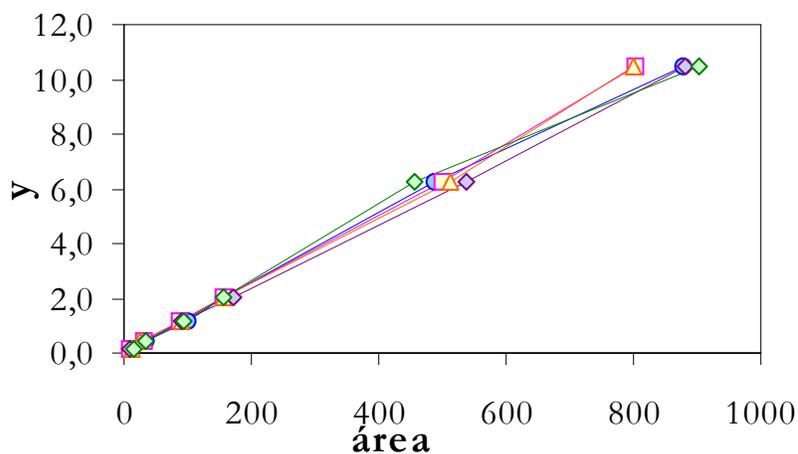


Figura 4.20 – Curvas de calibração para a determinação da concentração de etanol.

O valor de F obtido foi 2,2266, gerando um erro de predição igual a 0,0768, considerando-se 30 experimentos e apenas 1 parâmetro. O erro experimental obtido foi igual a 0,0146. Da mesma forma que o espectrofotômetro, considera-se que a determinação experimental de cada análise é melhor que uma avaliação conjunta dos dados.

4.10 – Avaliação da Repetitividade nas Metodologias Analíticas

Um cultivo com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina foi realizado, apresentando o comportamento ilustrado na Figura 4.21. Para avaliar a repetitividade dos procedimentos analíticos efetuados, em 3 instantes de cultivo (9h, 21h e 30h) foram retiradas 10 diferentes amostras, acondicionadas em frascos fechados e em banho de gelo até as análises serem efetuadas. As Figuras 4.22 a 4.24 apresentam a dispersão das amostras em cada metodologia avaliada no processo. As linhas tracejadas representam a média ± 2 vezes o desvio padrão.

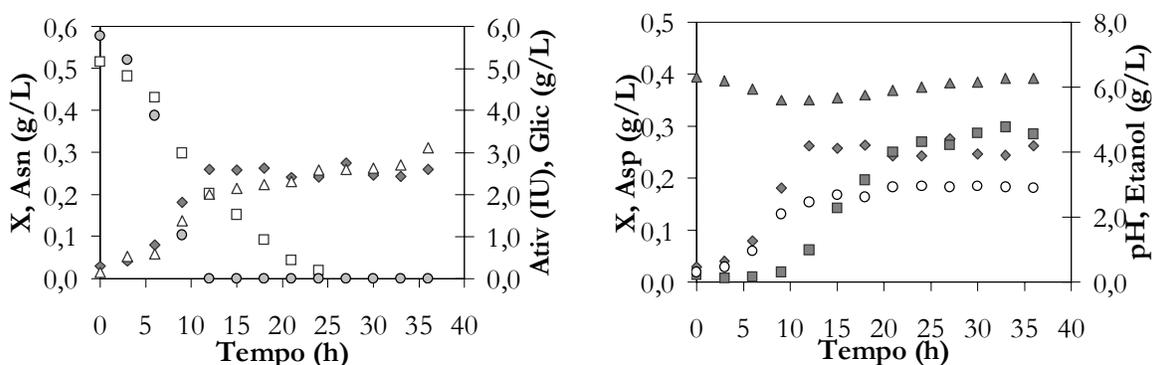


Figura 4.21 - Comportamento cinético de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina para análise de repetitividade (♦ células, □ asparagina, Δ atividade, ● glicose, ■ aspartato, ▲ pH e ○ etanol).

A Tabela 4.20 apresenta a amplitude, o desvio e o coeficiente de variação das análises ao longo do cultivo. A concentração de glicose foi exaurida após 12 horas de cultivo, enquanto a asparagina foi totalmente consumida após 27 horas de cultivo.

Pode ser observado na Figura 4.24 que em algumas amostras os dados obtidos da concentração de asparagina foram negativos, fato este devido ao ajuste de linearidade da equação para a determinação de asparagina e aspartato. O alto coeficiente de variação da análise de aspartato em 9 horas de cultivo se deve à baixa concentração do mesmo neste instante de cultivo.

A Tabela 4.20 sugere que, com exceção da asparagina e do aspartato, os erros diminuem com o tempo de cultivo. Isto pode ser devido ao fato de que em 9 horas de cultivo a bactéria se encontra na fase exponencial de crescimento, enquanto que tanto em

21 quanto em 30 horas de cultivo, a mesma se encontra na fase estacionária, onde o crescimento observado é quase nulo.

Tabela 4.20 – Características da repetitividade das análises ao longo do cultivo.

	Amplitude			Desvio			Coef. variação (%)		
	9 h	21 h	30 h	9 h	21 h	30 h	9 h	21 h	30 h
X	0,007	0,003	0,001	0,002	0,002	0,001	1,17	0,65	0,60
Asparagina	0,049	0,009	0,013	0,013	0,003	0,005	4,44	5,80	-
Aspartato	0,010	0,011	0,021	0,003	0,004	0,008	15,18	1,46	2,58
Atividade	0,42	0,31	0,28	0,117	0,107	0,099	9,90	4,42	3,49
Etanol	0,28	0,25	0,17	0,096	0,091	0,059	4,26	3,06	2,04
pH	0,07	0,07	0,05	0,025	0,024	0,019	0,44	0,40	0,31
Glicose	0,28	-	-	0,096	-	-	3,47	-	-

Para avaliar as condições de tempo e temperatura de armazenamento, as amostras centrifugadas foram acondicionadas em geladeira (4°C) e congelador (-4°C), permitindo que fosse realizado um estudo de repetitividade das análises de asparagina, aspartato e etanol após um período de 1 mês. As amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e todas elas se apresentavam límpidas.

As figuras 4.25 e 4.26, que tratam da repetitividade das amostras em 9 horas de cultivo acondicionadas em geladeira e congelador, respectivamente, mostram que, apesar de uma maior dispersão dos resultados, os dados estão dentro da faixa limite.

Comparando-se os dados de variância das amostras, antes e após o armazenamento em geladeira, utilizando o teste F, observa-se a partir da Tabela 4.21 que, com 95% de confiança, as variâncias são equivalentes em 9 horas de cultivo para etanol e asparagina. Em 21 horas de cultivo observa-se que apenas para o etanol as variâncias podem ser consideradas equivalentes, ao passo que em 30 horas de cultivo nenhuma das análises realizadas mostra variâncias equivalentes entre a medição efetuada no instante de coleta e após 1 mês de armazenamento em geladeira. Estes resultados mostram a existência de flutuações experimentais entre as medições após o armazenamento em geladeira em 21 e 30 horas de cultivo, instantes nos quais praticamente já não há mais crescimento celular.

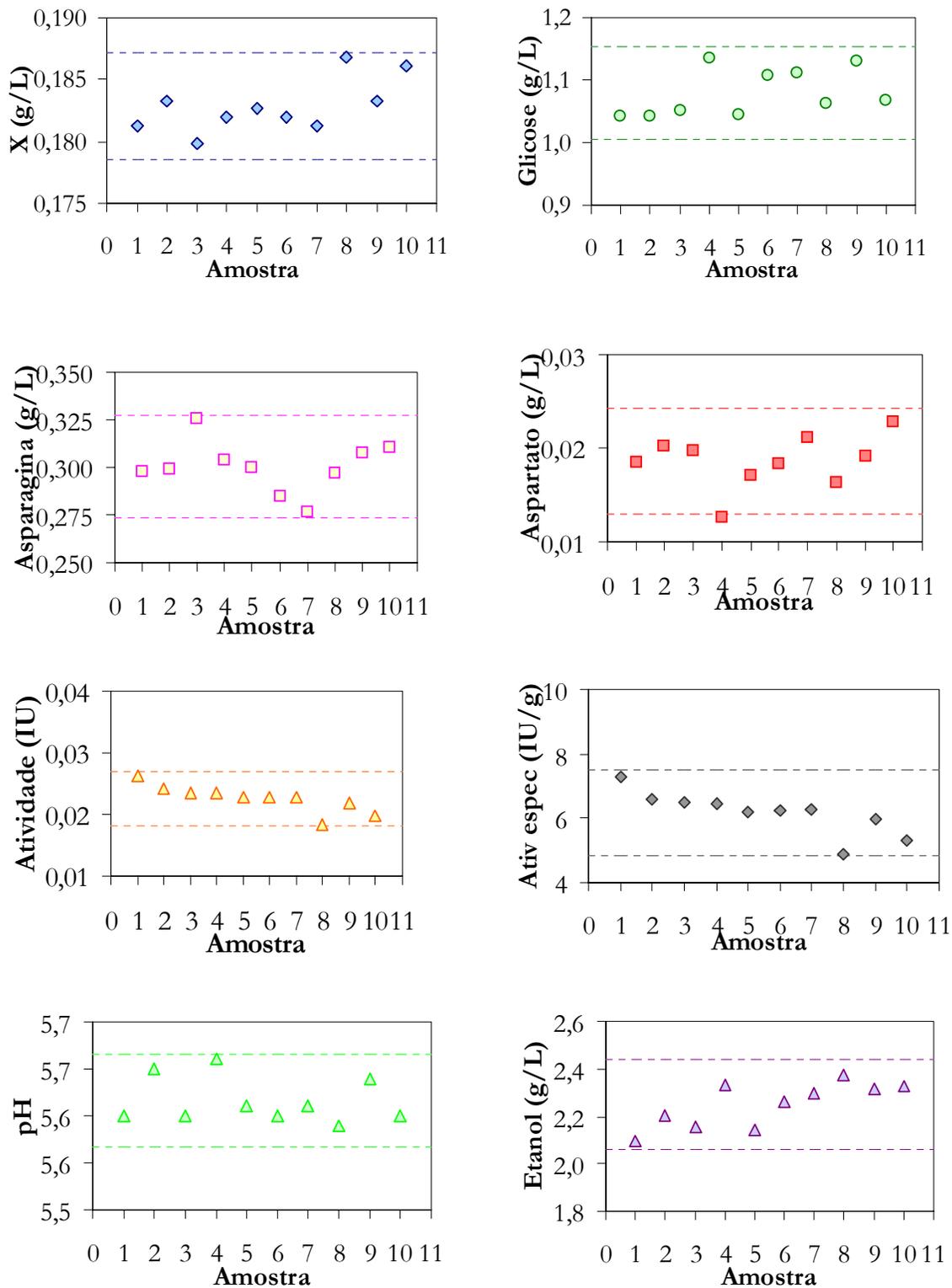


Figura 4.22 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.

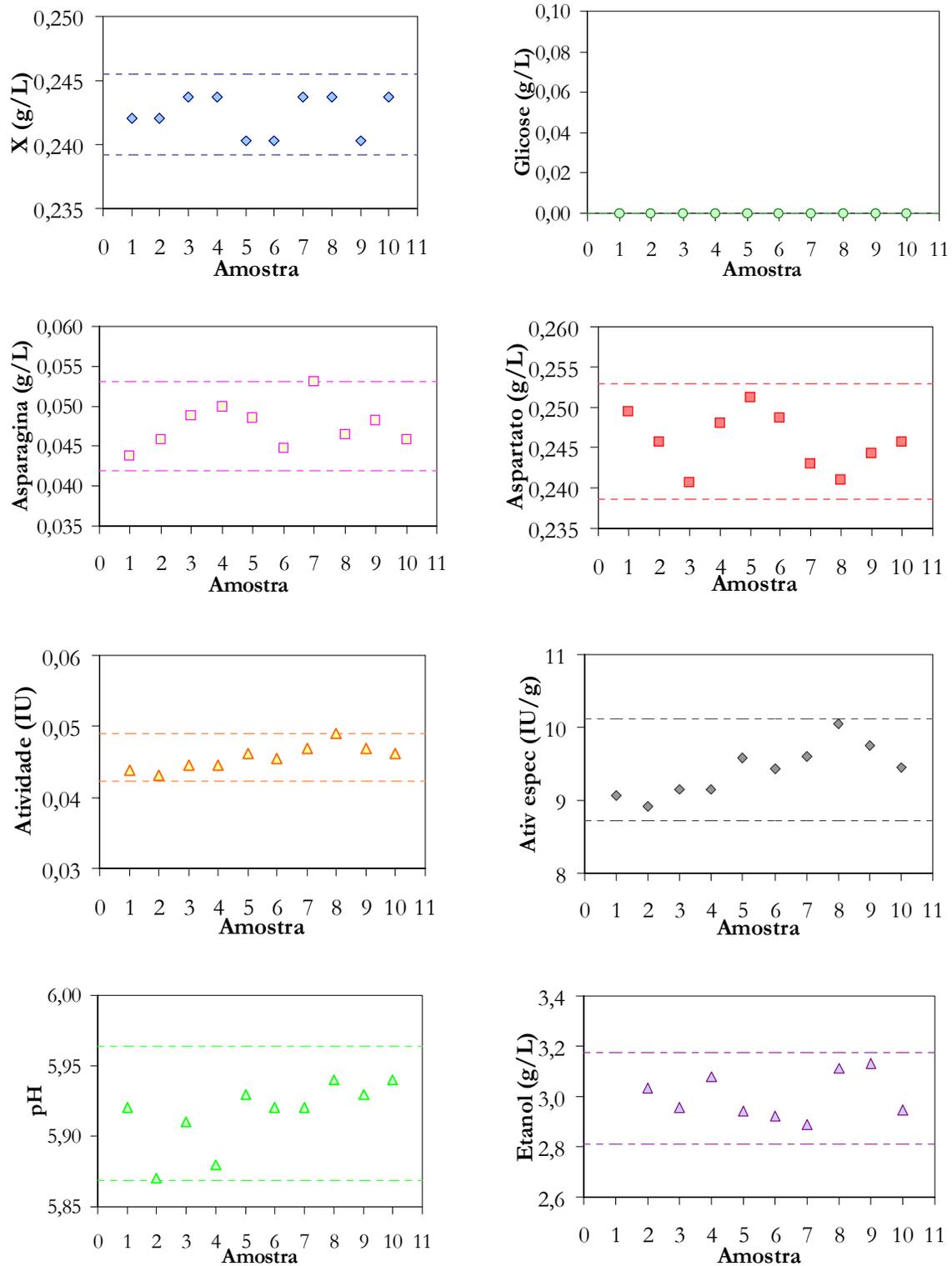


Figura 4.23 – Avaliação da repetitividade analítica em 21 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.

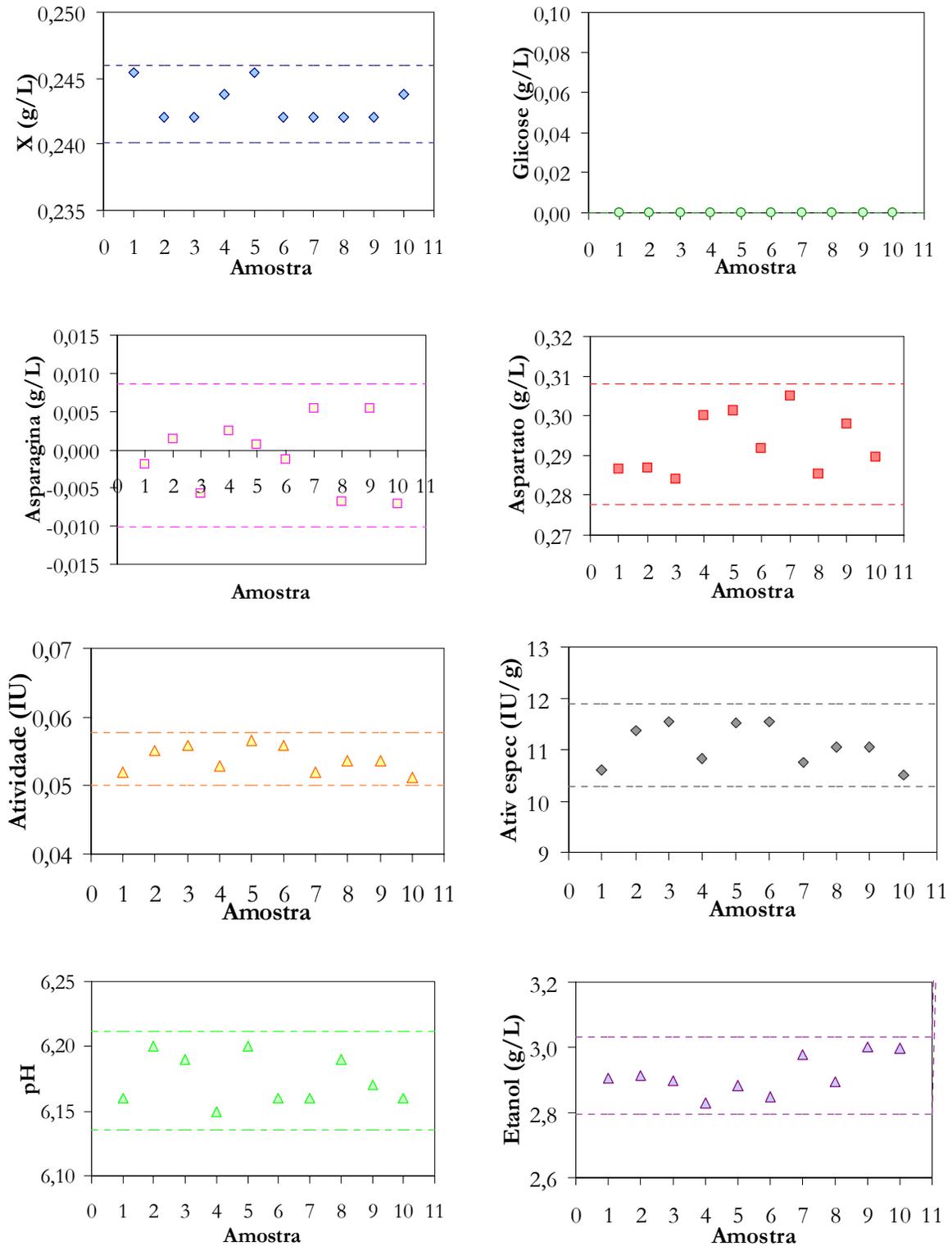


Figura 4.24 – Avaliação da repetitividade analítica em 30 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.

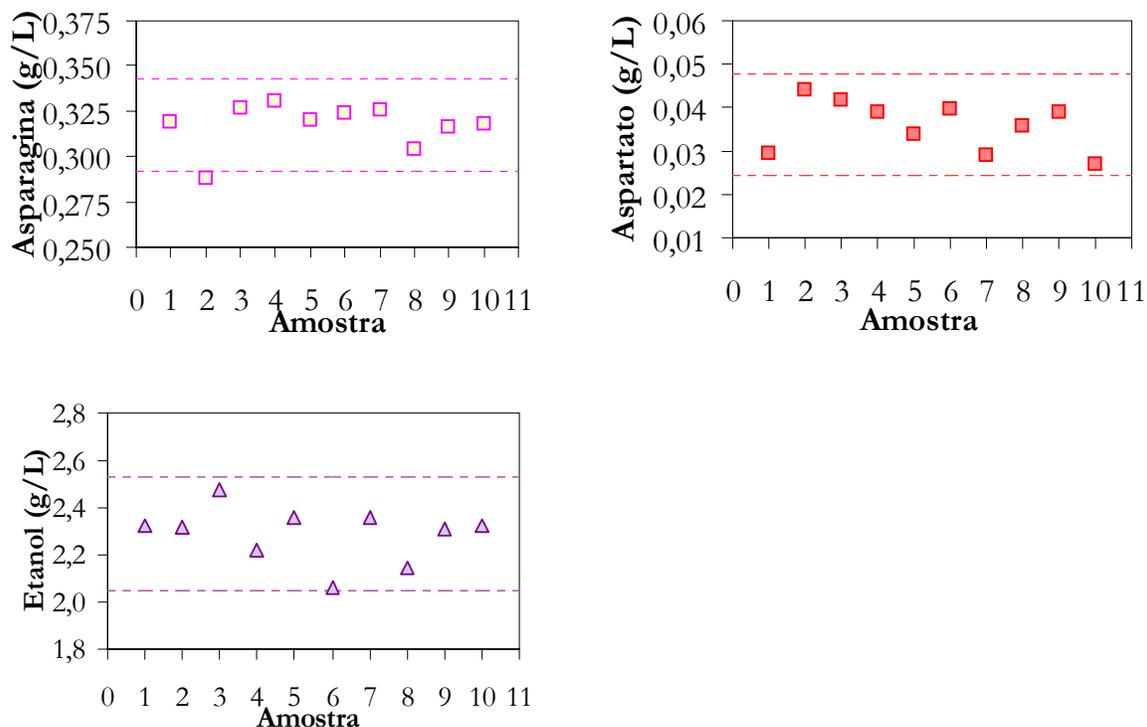


Figura 4.25 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e após 1 mês em geladeira.

Tabela 4.21 – Análise das variâncias após 1 mês em geladeira.

	Cultivo	$\sigma^2_{\text{tempo 0}}$	σ^2_{gel}	F*
Asparagina	9h	0,00018	0,00016	1,125
	21h	0,00001	0,00044	0,023
	30h	0,00002	0,00002	0,100
Aspartato	9h	0,00001	0,00003	0,333
	21h	0,00001	0,00377	0,003
	30h	0,00006	0,00419	0,014
Etanol	9h	0,0092	0,0142	0,648
	21h	0,0084	0,0267	0,315
	30h	0,0035	0,0339	0,103

O armazenamento em congelador das mesmas amostras apresenta variâncias não equivalentes em todas as análises e tempos de cultivo, como pode ser observado pela

Tabela 4.22, onde nem é preciso avaliar o F^* pela grande diferença existente entre as variâncias. Isto implica em um erro sistemático entre as medidas, ou seja, um erro que ocorre em função de um elemento específico no sistema de medida, seja ele o analista, o equipamento onde é realizada a análise, a metodologia analítica, tempo e condições de armazenamento ou uma combinação destes.

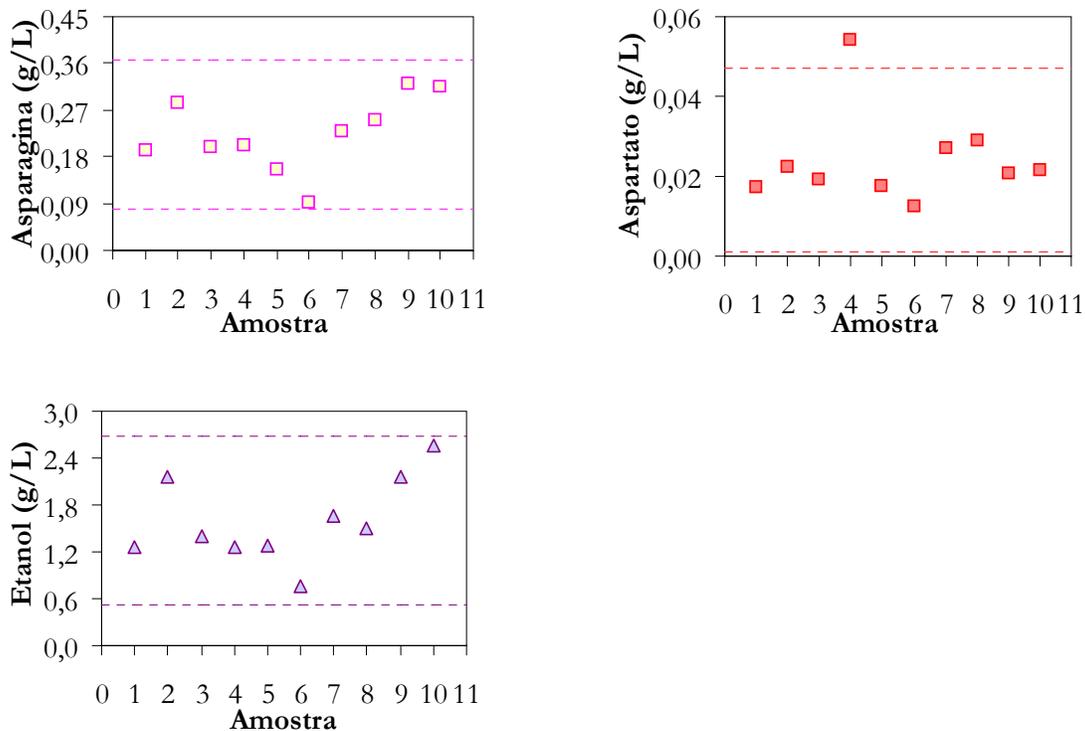


Figura 4.26 – Avaliação da repetitividade analítica em 9 horas de um cultivo de *Z. mobilis* com 5 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e após 1 mês em congelador.

Os dados apresentados nas Tabelas 4.21 e 4.22 mostram claramente a influência do tempo e da temperatura de armazenamento das amostras. Isto também pode ser observado a partir da Tabela 4.23, que apresenta a variação dos resultados após um mês de armazenamento, indicando uma alteração com o tempo das características da amostra mantidas tanto em geladeira quanto em congelador.

Tabela 4.25 – Coeficiente de variação das amostras ao longo do cultivo, no instante de coleta (0) e após 1 mês de armazenamento em geladeira (gel) e congelador (cong).

	9 horas			21 horas			30 horas		
	0	Gel	Cong	0	Gel	Cong	0	Gel	Cong
Asparagina	4,44	4,03	31,99	5,80	74,27	73,16	-	-	-
Aspartato	15,18	16,36	47,69	1,46	25,04	36,31	2,58	21,98	26,41
Etanol	4,26	5,21	33,74	3,06	5,89	47,01	2,04	6,73	38,79
Glicose	3,47	7,68	27,87	-	-	-	-	-	-

A Tabela 4.26 é uma avaliação do intervalo de medida para o conjunto de três experimentos (tempo 0, após 1 mês em geladeira e após 1 mês em congelador) nos três instantes de cultivo (9, 21 e 30h). Estatisticamente, este teste é denominado teste t, tendo-se o objetivo de avaliar a existência de um intervalo comum, às medições, gerando uma confiabilidade estatística para a média analítica. A Figura 4.27 ilustra melhor estes intervalos de medição, possibilitando a visualização do intervalo comum entre as mesmas.

Os resultados apresentados mostram que, com exceção das medidas para o aspartato em 9 horas de cultivo e das medidas para o etanol em 21 horas de cultivo, as demais análises concordam, com 95% de chance, que a média pode estar entre um valor semelhante para o tempo 0 e após um mês de acondicionamento em geladeira e congelador.

Para a análise do aspartato em 9 horas de cultivo, não se pode dizer que o tempo de armazenamento influencia a medida. Contudo, pode-se dizer com 95% de confiança que as diferenças entre as medições no tempo t_0 e após um mês de armazenamento em geladeira são estatisticamente significativas, não ocorrendo simplesmente uma variação aleatória. Em 21 horas de cultivo, a análise de etanol indica, com 95% de confiança, que as análises no tempo t_0 e após 1 mês de armazenamento em congelador possuem resultados estatisticamente diferentes.

Tabela 4.26 - Intervalo de medida para a amostra analisada no instante de coleta (μ_0) e após 1 mês de acondicionamento em geladeira (μ_{Gel}) e em congelador (μ_{Cong}).

	9 h	21 h	30 h
Asparagina	$0,282 < \mu_0 < 0,318$	$0,043 < \mu_0 < 0,051$	
	$0,299 < \mu_{Gel} < 0,335$	$0,000 < \mu_{Gel} < 0,057$	-
	$0,127 < \mu_{Cong} < 0,323$	$0,001 < \mu_{Cong} < 0,056$	
Aspartato	$0,015 < \mu_0 < 0,023$	$0,241 < \mu_0 < 0,251$	$0,282 < \mu_0 < 0,304$
	$0,028 < \mu_{Gel} < 0,044$	$0,162 < \mu_{Gel} < 0,328$	$0,207 < \mu_{Gel} < 0,383$
	$0,008 < \mu_{Cong} < 0,040$	$0,100 < \mu_{Cong} < 0,294$	$0,185 < \mu_{Cong} < 0,391$
Etanol	$2,119 < \mu_0 < 2,381$	$2,866 < \mu_0 < 3,114$	$2,830 < \mu_0 < 2,990$
	$2,128 < \mu_{Gel} < 2,452$	$2,557 < \mu_{Gel} < 3,003$	$2,480 < \mu_{Gel} < 2,980$
	$0,864 < \mu_{Cong} < 2,336$	$0,602 < \mu_{Cong} < 2,738$	$0,971 < \mu_{Cong} < 3,149$
Glicose	$1,030 < \mu_0 < 1,130$		
	$0,878 < \mu_{Gel} < 1,082$	-	-
	$0,485 < \mu_{Cong} < 1,075$		

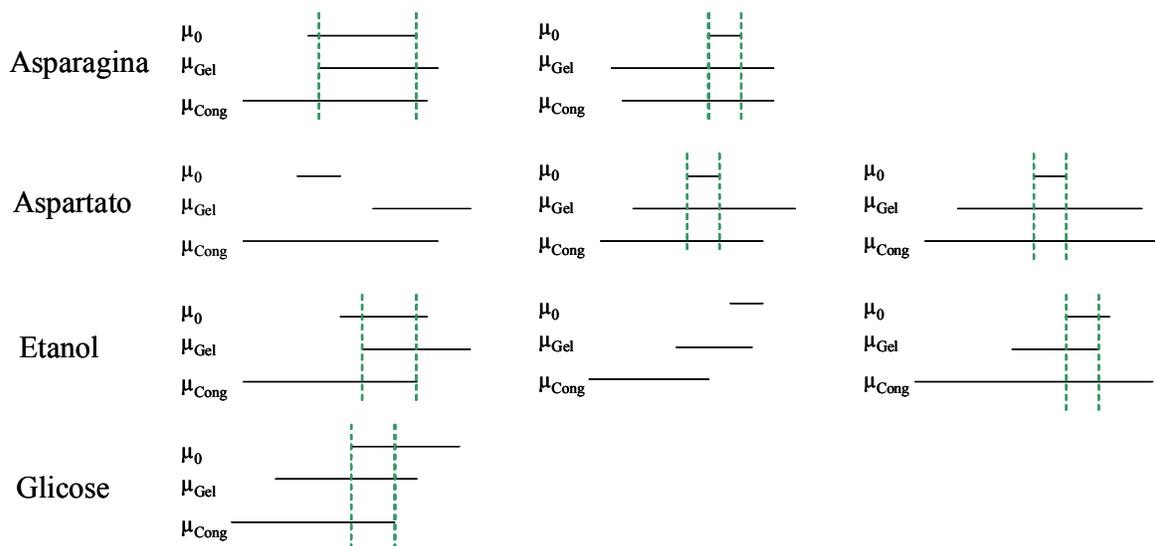


Figura 4.27 - Intervalo de medida para a amostra analisada no instante de coleta (μ_0) e após 1 mês de acondicionamento em geladeira (μ_{Gel}) e em congelador (μ_{Cong}).

A fim de se verificar a estabilidade da enzima asparaginase presente na bactéria *Z. mobilis*, foram conduzidos testes com as células centrifugadas e armazenadas em congelador em diferentes formas: apenas as células centrifugadas, as células centrifugadas e mantidas em presença de NaCl 0,85% pH 6,0 e as células centrifugadas e mantidas em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,6. As amostras foram mantidas congeladas durante 2,5 semanas e sua análise de atividade foi comparada com a amostra analisada no instante da coleta, bem como com as células centrifugadas e armazenadas em geladeira pelo mesmo período de 2,5 semanas. Os resultados são apresentados na Tabela 4.27 e sugerem que a enzima se mantém estável a baixa temperatura quando em presença de NaCl 0,85% ao longo de 2,5 semanas.

Tabela 4.27 – Influência do tempo e temperatura na atividade de asparaginase.

	Coleta	Células		Congelador	
		Geladeira	Células	NaCl	Tris-HCl
Atividade (IU)	2,20	2,14	2,05	2,18	1,95
Perda (%)	-	2,73	6,82	0,91	11,36

Os dados apresentados mostram que, mesmo em apenas 2,5 semanas, as células centrifugadas e armazenadas em geladeira possuem uma perda menor em relação ao seu armazenamento em congelador. Quando as células centrifugadas são colocadas em presença da solução tampão de análise de atividade (Tris-HCl 0,05M) e acondicionadas a baixa temperatura, observa-se uma perda considerável na atividade da enzima. Os resultados também mostram que a melhor forma de armazenamento das células em congelador é em presença de NaCl 0,85%, condição esta onde em 2,5 semanas houve menor perda de atividade em relação à análise realizada imediatamente após a coleta.

4.11 – Estudo sobre a variabilidade nas Etapas do Processo Fermentativo

Após avaliação dos erros nos instrumentos de análise e nas metodologias analíticas empregadas, que poderiam estar influenciando a reprodutibilidade e repetitividade do processo fermentativo da *Zymomonas mobilis*, analisam-se, etapa por etapa, as causas que conduzem a erros ao longo deste processo e que podem ser reduzidos e/ou eliminados.

4.11.1 – Análise do Preparo do Meio de Cultivo

Uma das primeiras etapas a se levar em conta é o procedimento de formulação do meio de cultivo. No processo em estudo, a mistura de todos os componentes do meio é feita assepticamente em câmara de fluxo, após sua esterilização, através de transferência de volume a partir de proveta graduada estéril, o que pode levar a dispersões nas concentrações iniciais de asparagina e glicose, por exemplo. O cuidado na transferência de amostra para a mistura de uma determinada quantidade de meio foi padronizada, concentrando-se os componentes do meio em 50 vezes. Isto permitiu que a transferência dos volumes para a formação do meio definido fosse realizada a partir de pipetas automáticas ao invés de provetas, evitando-se, assim, o erro de paralaxe na colocação do volume e/ou o resíduo de soluções na proveta. Além disto, devido ao fato de muitos dos componentes da solução de estoque possuírem uma concentração muito baixa, da ordem de mg/L, a concentração dos componentes também vem a favorecer a redução da dispersão das massas pesadas em balança analítica. Todos estes cuidados permitiram-nos observar que os erros existentes na concentrações iniciais dos substratos glicose e asparagina, definidas para o preparo do meio, foram reduzidos de 6,74% para 2,43% após a mistura de todos os componentes do meio de cultivo.

4.11.2 – Análise da Etapa de Inoculação

O procedimento de preparação do inóculo empregado nos cultivos é outra fonte de variabilidade do processo. O preparo de inóculo e a cinética de crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* foram padronizados conforme ilustrado na Figura 4.28. Da cultura de *Zymomonas mobilis* armazenada em geladeira, seja na forma líquida ou em ágar, é realizada uma reativação das células em meio rico. Ao se utilizar meio líquido, o volume a ser inoculado é 5%, enquanto em meio sólido a quantidade máxima são 3 colônias. Esta cultura é colocada em estufa bacteriana a 30°C por 24 horas. Após este tempo, a alíquota de 5% é transferida para um frasco com meio definido, onde é acompanhado o crescimento, em intervalos de tempo, a partir da medida de densidade ótica. Esta etapa é denominada pré-inoculação. Acompanhando por um gráfico do tipo tempo versus densidade ótica, observa-se o instante onde as células estão em fase exponencial de crescimento. Neste instante, uma alíquota de 5% desta cultura é transferida para um novo frasco, constituindo-

se a etapa de inoculação. Tal procedimento é repetido, realizando-se a fermentação propriamente dita.

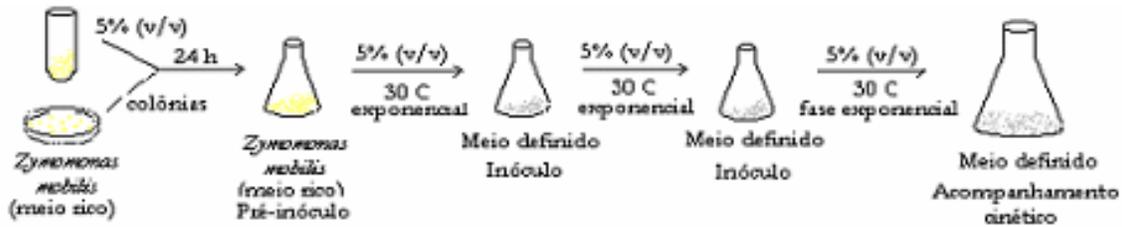


Figura 4.28 - Esquema de preparo de inóculo.

A natureza autocatalítica de um crescimento microbiano resulta em aumento exponencial da população em relação ao tempo, quando há um crescimento balanceado, ou seja:

$$\frac{dX}{dt} = \mu.X \quad \text{ou} \quad X = X_0 e^{\mu.t} \quad X(t=0) = X_0 \quad (4.14)$$

onde X é a concentração de células no tempo t , X_0 é a concentração inicial de células e μ é a taxa específica de crescimento celular.

Em cada etapa do preparo do inóculo as células são transferidas para um novo meio durante a fase exponencial de crescimento. Isto faz com que as variáveis x_0 e μ influenciem o valor final de x , fazendo com que este seja um fator que pode introduzir consideráveis diferenças na reprodutibilidade do bioprocessamento.

A condição do inóculo ilustra o nível de variabilidade resultante da passagem de uma etapa para outra do processo. A Tabela 4.28 mostra a absorbância de amostras de cada etapa do processo de preparo do inóculo nos experimentos de avaliação da reprodutibilidade analítica, realizado com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina. Apresenta-se também o valor de μ obtido em cada ensaio. Apesar da grande dispersão no valor de absorbância no instante da inoculação ser substancialmente melhorado com a introdução de um protocolo analítico padrão para acompanhamento da absorbância e

inoculação na fase exponencial de crescimento, a etapa de inoculação ainda continua sendo uma fonte de erro apreciável.

Tabela 4.28 – Histórico dos valores de absorbância em cada etapa de inóculo e da taxa específica de crescimento na fermentação.

Meio	Ensaio			
	1	2	3	4
Rico	0,702	sd	sd	0,830
Pré-Inóculo	0,536	1,000	0,982	0,880
Inóculo	1,005	1,070	0,735	1,050
μ	0,30	0,34	0,34	0,25

sd – sem determinação

Além disso, a forma como as células são inoculadas, utilizando a dispersão celular (ensaios 1, 2 e 3) ou a partir de células centrifugadas (ensaio 4), também parece induzir variabilidade na reprodutibilidade do ensaio com 10 g/L de glicose, gerando um consumo mais lento de asparagina, uma menor atividade e uma queda mais acentuada do pH no experimento com células centrifugadas. Em função desses resultados, pode-se dizer que a etapa de inoculação é uma fonte apreciável de erros para o processo fermentativo.

Como já pôde ser observado, os resultados mostram que os procedimentos analíticos e o preparo do meio de cultivo são rotinas bem estabelecidas, levando a concluir que o procedimento de preparo de inóculo é o que gera maior dispersão nos resultados. Além da fase exponencial de crescimento, deve-se levar em conta também o estado fisiológico da célula, inoculando-se no instante em que a cultura apresenta taxa específica de crescimento (μ) estabelecida (ou seja, crescimento balanceado) e com a mesma massa de células inoculadas nas etapas anteriores. Tal determinação é realizada a partir da medida de densidade ótica e do volume de meio a ser inoculado. As Figuras 4.29a e 4.29b ilustram o crescimento celular no pré-inóculo, inóculo e fermentação, sem e com o acompanhamento, respectivamente.

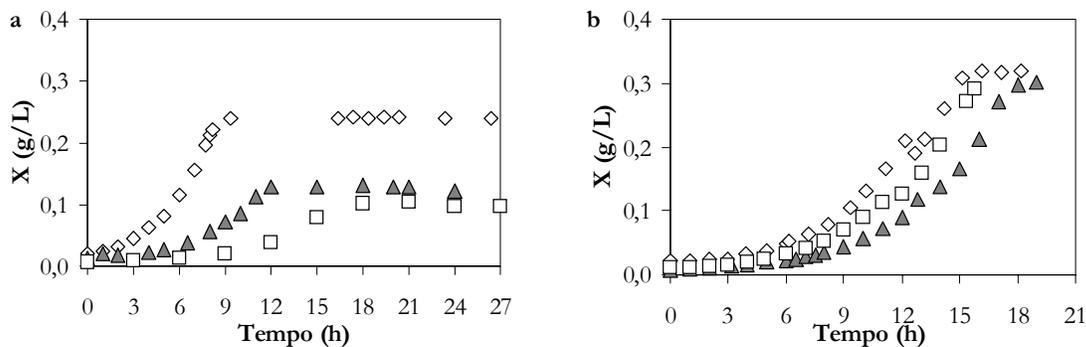


Figura 4.29 – Acompanhamento do crescimento celular em cultivo de *Zymomonas mobilis*, com inoculação de 5% (v/v) em cada etapa e sem (a) e com (b) acompanhamento da taxa de crescimento (◇ pré inóculo, □ inóculo e ▲ fermentação).

O acompanhamento do crescimento é realizado a partir das medidas de absorbância do meio de cultivo. A partir destas medidas e do tempo de cultivo, determina-se o valor de μ ao longo do tempo. No instante em que se atinge o maior valor de μ , ou seja, quando as células estão em sua máxima capacidade, efetua-se a transferência de inóculo. O volume a ser transferido é baseado na absorbância da amostra neste instante onde μ é máximo e na massa de células que se pretende ter após inocular um volume de meio específico.

Em todos os quatro ensaios células centrifugadas e lavadas foram utilizadas na etapa de pré-inoculação para que não houvesse nenhuma influência do meio complexo. Pôde-se observar que com estes acompanhamentos consegue-se ter uma menor dispersão no cultivo fermentativo. No cultivo sem o acompanhamento da concentração de células, as taxas específicas de crescimento máximas variaram de etapa para etapa, influenciando o crescimento da etapa posterior, enquanto no cultivo com acompanhamento do crescimento, a taxa de crescimento máxima ocorreu em torno de 5 horas de cultivo e ao longo de todo o crescimento exponencial.

Conclui-se, portanto, que o acompanhamento da taxa específica de crescimento e a determinação de um volume específico de meio de cultivo para a inoculação da etapa posterior, baseado na mesma quantidade de células das etapas anteriores, é um fator preponderante para um controle mais adequado de um processo fermentativo.

Para que se avaliem as causas da dispersão analítica da dosagem (medida) de atividade, é realizada uma análise detalhada de toda a metodologia de reação. Avalia-se o

efeito do tempo de reação a 37°C, a influência da agitação na reação, o volume de amostra centrifugada e a concentração da solução de asparagina empregada na reação.

4.11.3 – Análise da Medida de Atividade em Amostras

Para a determinação das condições ótimas da dosagem de atividade de asparaginase, foi realizado um planejamento experimental, tendo como variáveis estudadas o volume de meio de cultivo a ser centrifugado (5 a 55 mL), o tempo de reação a 37°C (10 a 50 min) e a forma de condução da reação a 37°C (agitação a 150 rpm ou em banho termostático, sem agitação). Os resultados são apresentados na Tabela 4.29. A concentração de células no instante da coleta do meio de cultivo foi 0,35 g/L.

Tabela 4.29 – Atividade e atividade específica da enzima asparaginase em diferentes condições de volume de meio centrifugado e tempo de reação a 37°C.

Condição		Atividade (IU)		Atividade específica (IU/g)	
Volume	Tempo	Banho	Agitação	Banho	Agitação
-1 (5 mL)	-1 (10 min)	0,018	0,015	10,03	8,78
-1 (5 mL)	+1 (50 min)	0,005	0,005	3,01	3,01
+1 (55 mL)	-1 (10 min)	0,169	0,184	8,78	9,58
+1 (55 mL)	+1 (50 min)	0,088	0,092	4,58	4,77
0 (30 mL)	0 (30 min)	0,049	0,048	4,67	4,60
0 (30 mL)	0 (30 min)	0,050	0,049	4,81	4,67
0 (30 mL)	0 (30 min)	0,053	0,046	5,02	4,39

Os resultados mostram que não há influência da agitação ao longo da reação a 37°C. Na avaliação estatística do modelo que melhor define o sistema em estudo, observou-se que em todas as condições estudadas (atividade e atividade específica), o modelo descrito na equação abaixo forneceu parâmetros significativos e um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,999 em todos os casos.

$$Y = a_1.X_1 + a_2.X_2 + a_3.X_1.X_1 + a_4.X_1.X_2 + a_5 \quad (4.15)$$

onde X_1 é o volume de meio de cultivo (mL), X_2 é o tempo de reação (mM) e a_1, a_2, a_3, a_4 e a_5 são parâmetros do modelo.

Os parâmetros obtidos para as determinações de atividade e seus erros paramétricos são apresentados nas equações 16 a 19, sendo Y_1 e Y_2 as determinações de atividade para o estudo em banho e com agitação, respectivamente, e Y_3 e Y_4 as determinações de atividade específica para o estudo em banho e com agitação, respectivamente.

$$Y_1 = 0,059 \pm 0,001.X_1 - 0,024 \pm 0,001.X_2 + 0,019 \pm 0,002.X_1.X_1 - 0,017 \pm 0,001.X_1.X_2 + 0,051 \pm 0,001 \quad (4.16)$$

$$Y_2 = 0,064 \pm 0,001.X_1 - 0,026 \pm 0,001.X_2 + 0,026 \pm 0,001.X_1.X_1 - 0,021 \pm 0,001.X_1.X_2 + 0,048 \pm 0,001 \quad (4.17)$$

$$Y_3 = -2,805 \pm 0,088.X_2 + 1,767 \pm 0,1352.X_1.X_1 + 0,705 \pm 0,0881.X_1.X_2 + 4,833 \pm 0,102 \quad (4.18)$$

$$Y_4 = 0,064 \pm 0,073.X_1 - 2,645 \pm 0,073.X_2 + 1,982 \pm 0,111.X_1.X_1 + 0,240 \pm 0,073.X_1.X_2 + 4,553 \pm 0,084 \quad (4.19)$$

Na análise dos modelos e seus parâmetros, observa-se que o parâmetro a_5 é significativamente diferente de zero, exercendo grande influência na reação para a determinação da atividade e atividade específica da enzima. Para a atividade específica, o modelo para a reação em banho a 37° C mostra que o volume de meio não possui uma influência significativa, contrastando com as demais condições.

A Figura 4.30 ilustra o comportamento da atividade e da atividade específica nas condições estudadas.

Observa-se que os maiores valores de atividade se encontram nos menores tempos de reação e nos maiores volumes de meio de cultivo utilizados. As maiores atividades específicas estão nos menores tempos de reação e volume de amostra utilizado.

Como o volume mínimo empregado neste estudo (5 mL) é muito pequeno, podendo conter erros devido tanto à transferência de volume quanto à quantidade de células para a reação da atividade, em função da bactéria *Z. mobilis* crescer pouco, novos estudos com diferentes volumes de amostra de meio de cultivo foram realizados.

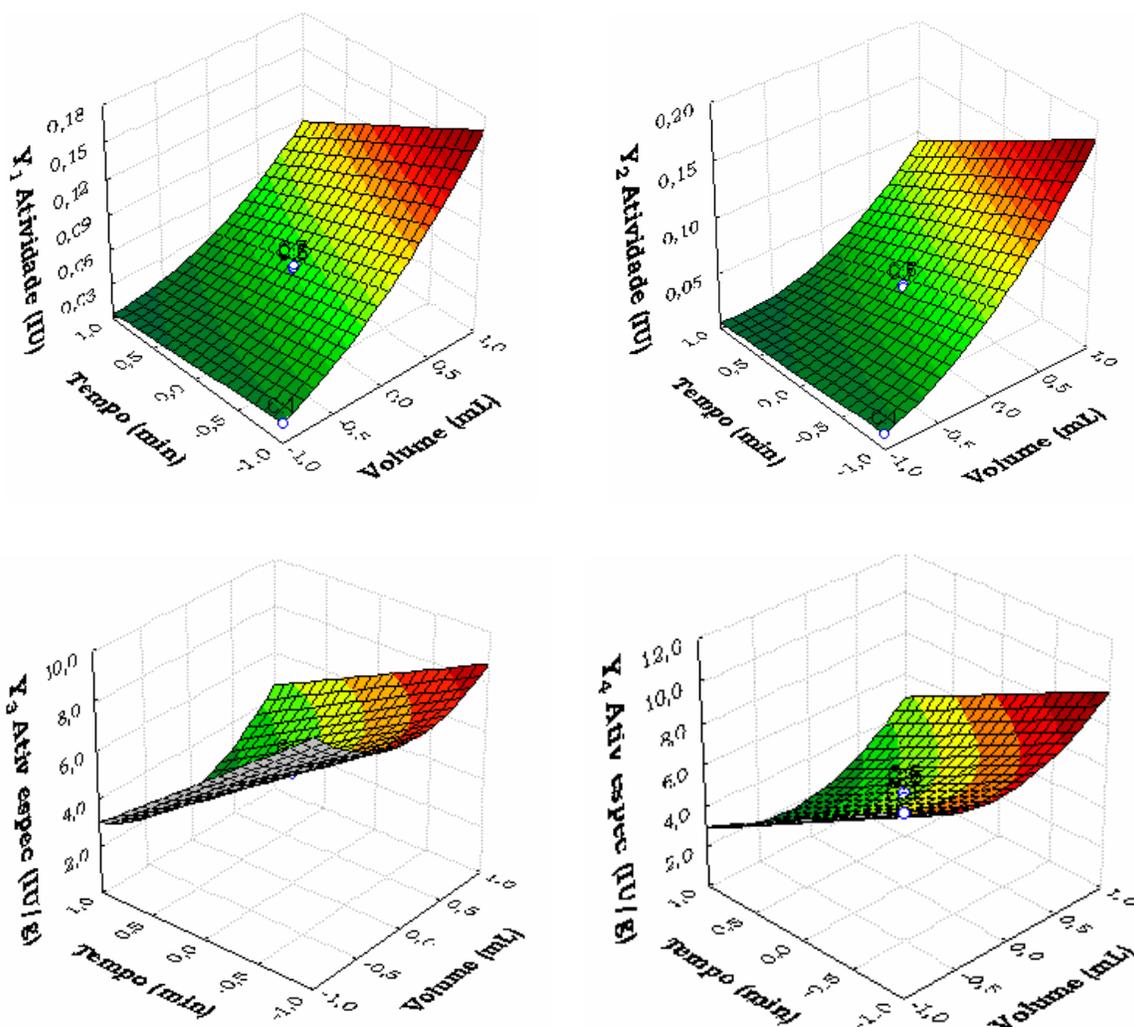


Figura 4.30 – Comportamento da atividade e atividade específica em diferentes condições de ensaio.

Para confirmar e a influência do volume sobre a variabilidade na determinação da atividade e atividade específica, foram realizadas 5 medições distintas em diferentes volumes de meio de cultivo, coletados num mesmo instante, quando a concentração de células era igual a 0,4 g/L. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.30, com média, desvio padrão e coeficiente de variação para as determinações de atividade e atividade específica.

Tabela 4.30 – Determinações sucessivas de atividade e atividade específica em diferentes volumes de meio de cultivo para a reação por 30 min a 37°C.

Volume (mL)	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Atividade (U)	média	desvio padrão	CV (%)	Atividade específica (IU/g)	média	desvio padrão	CV (%)
5	0,0050	0,010	0,010	0,001	7,92	5,00	5,14	0,41	7,92
	0,0050	0,010				5,00			
	0,0057	0,011				5,71			
	0,0046	0,009				4,64			
	0,0054	0,011				5,35			
10	0,0064	0,013	0,013	0,001	9,00	3,21	3,32	0,30	9,00
	0,0071	0,014				3,57			
	0,0057	0,011				2,86			
	0,0071	0,014				3,57			
	0,0068	0,014				3,39			
20	0,0164	0,033	0,032	0,002	5,07	4,11	4,05	0,21	5,07
	0,0154	0,031				3,84			
	0,0154	0,031				3,84			
	0,0168	0,034				4,19			
	0,0171	0,034				4,28			
40	0,0371	0,074	0,074	0,002	3,24	4,64	4,61	0,15	3,24
	0,0386	0,077				4,82			
	0,0357	0,071				4,46			
	0,0357	0,071				4,46			
	0,0371	0,074				4,64			
60	0,0510	0,102	0,101	0,002	1,69	4,25	4,20	0,07	1,69
	0,0514	0,103				4,28			
	0,0493	0,099				4,11			
	0,0500	0,100				4,16			
	0,0503	0,101				4,19			

A Figura 4.31, por sua vez, apresenta os comportamentos da atividade e atividade específica frente a esta variação volumétrica.

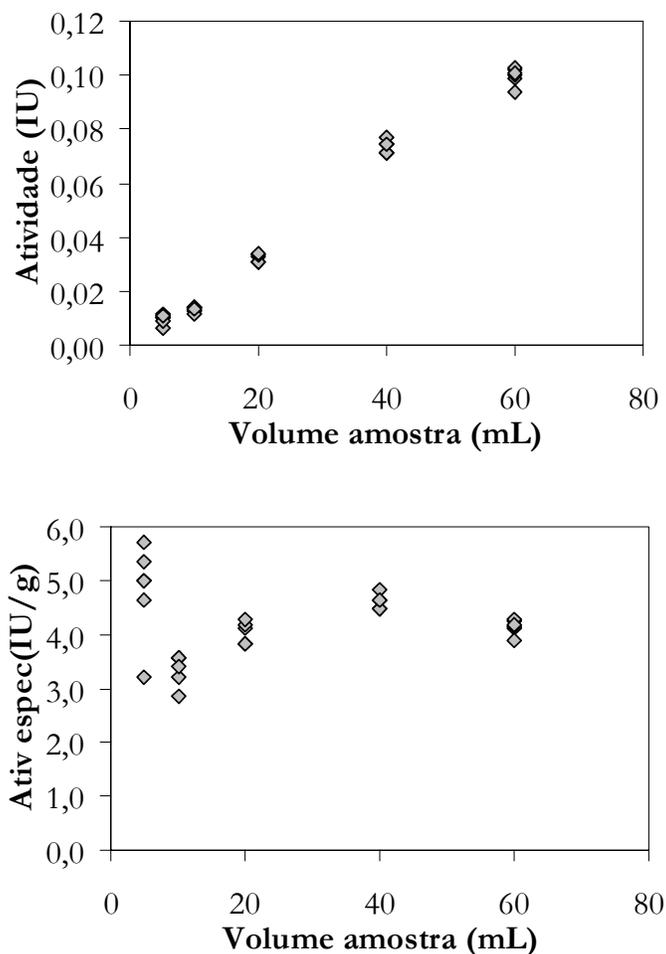


Figura 4.31 – Comportamento da atividade e atividade específica em diferentes volumes de meio de cultivo para a reação por 30 min a 37°C.

O que se observa a partir dos resultados obtidos é que há um aumento quase que linear na atividade com o volume de amostra acima de 10 mL. A atividade específica, contudo, mostra que em 5 mL de meio de cultivo utilizado para a reação ocorre uma grande dispersão na medida, ao mesmo tempo em que indica o volume de 40 mL como melhor condição para a análise. Conclui-se, com isto, que o volume de meio de cultivo a ser empregado para na análise de atividade é um parâmetro importante para a reação das células e conseqüente liberação de amônia, sendo a quantidade de 40 mL de meio considerada a melhor condição de análise.

Estudos sobre a dispersão da medida de atividade em diferentes tempos de cultivo, utilizando 40 mL de meio e reação a 37°C por 30 min já foram apresentados anteriormente,

na Tabela 4.19, na avaliação da repetitividade nas metodologias analíticas, resultando em coeficientes de variação inferiores a 10%. Experimentos com baixos tempos de reação e pequenas quantidades de amostra, de um cultivo com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina são apresentados na Tabela 4.31 e na Figura 4.32.

Tabela 4.31 - Determinações da atividade e atividade específica em pequenos tempos de reação e diferentes volumes de meio de cultivo.

Volume (mL)	Tempo de reação (min)	Δ Abs	$\mu\text{molNH}_3/\text{min}$	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
5	5	0,001	0,0022	0,004	2,74
10		0,004	0,0088	0,018	5,47
20		0,017	0,0373	0,075	11,62
40		0,024	0,527	0,105	8,21
60		0,034	0,746	0,149	7,75
5	10	0,004	0,0044	0,009	5,47
10		0,002	0,0022	0,004	1,37
20		0,017	0,0187	0,037	5,81
40		0,020	0,0219	0,044	3,42
60		0,042	0,0461	0,092	4,79
5	15	0,003	0,0022	0,004	2,74
10		0,002	0,0015	0,003	0,91
20		0,007	0,0051	0,010	1,60
40		0,031	0,0227	0,045	3,53

O que se pode notar a partir deste experimento é que a atividade tem uma tendência a aumentar com o aumento do meio de cultura centrifugado para utilização das células na reação, ao mesmo instante em que tende a decrescer com o aumento do tempo de reação. Para a atividade específica, entretanto, a análise dos dados nos leva a crer que a partir de um determinado volume de amostra seu resultado tende a permanecer praticamente constante, muito embora se observe a mesma tendência de redução da atividade específica com o tempo de reação. Nas duas determinações também se percebe que para o volume de 40 mL de cultura centrifugada, após 10 min de reação, o valor permanece praticamente constante.

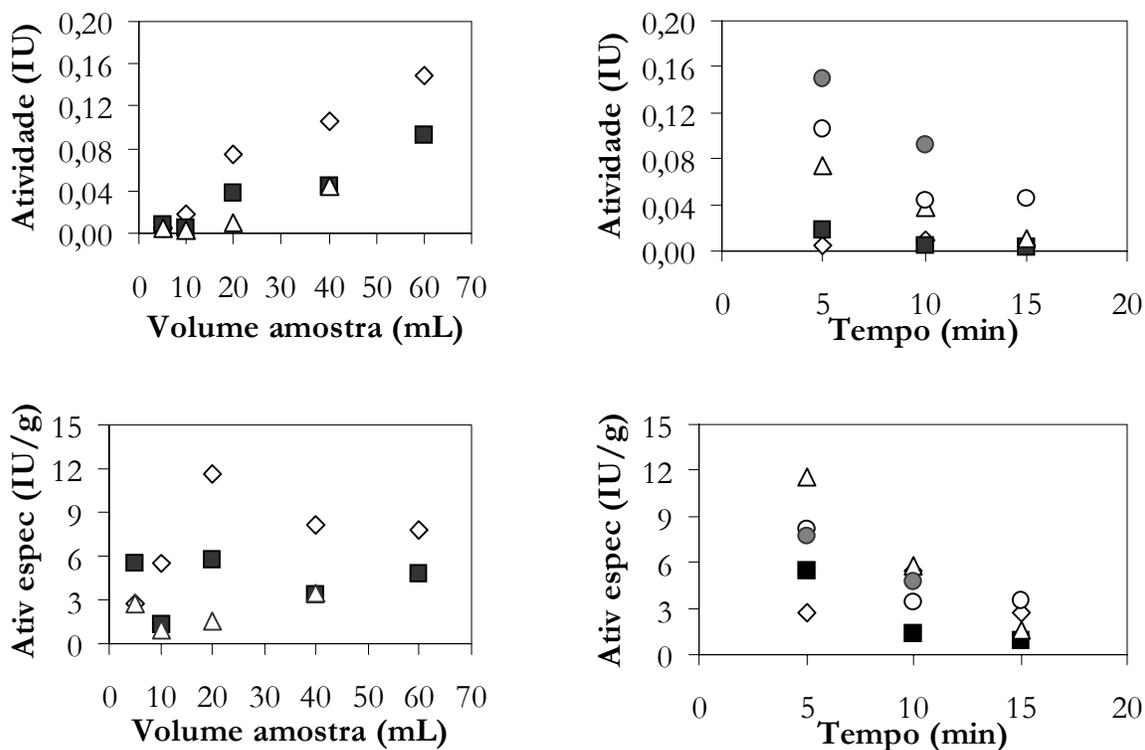


Figura 4.32 - Comportamento das atividades e atividade específicas frente a pequenos tempos de reação e diferentes volumes de amostra centrifugados (\diamond 5 min ou 5 mL, \blacksquare 10 min ou 10 mL, \triangle 15 min ou 20 mL, \circ 40 mL e \bullet 60 mL).

Apesar de se observar maiores taxas de reação em tempos menores, há uma probabilidade grande de erro em função da baixa atividade de asparaginase obtida, gerando diferenças não significativas na absorbância. Assim, um novo conjunto de ensaios é realizado, a partir de um experimento com 10 g/L e 0,5 g/L de asparagina, com amostras coletadas após 6 horas de cultivo, resultando em uma concentração de células de 0,093 g/L e a atividade e atividade específica de asparaginase com 40 mL de meio centrifugado e reação a 37°C por 30 min de 0,063 IU e 22,47 IU/g células, respectivamente. Os resultados estão dispostos na Tabela 4.32 e na Figura 4.33.

Estes resultados mostram que a atividade em 5 min de reação gera melhores resultados com 40 mL de amostra centrifugada e, em tempos maiores, a atividade reduz com o aumento do volume de meio centrifugado, como se faltasse substrato para reação. Outra característica verificada nestes ensaios é que a atividade específica em 20 minutos de

reação é praticamente a mesma, independente do volume de amostra utilizado nos experimentos.

Tabela 4.32 - Determinações da atividade e atividade específica em relação a diferentes tempos de reação e volumes de meio de cultivo empregados.

Volume (mL)	Tempo de reação (min)	Δ Abs	$\mu\text{molNH}_3/\text{min}$	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
5	5	0,001	0,0011	0,002	4,72
10		0,017	0,0187	0,037	40,12
40		0,078	0,0856	0,171	46,02
60		0,108	0,1185	0,237	42,48
5	10	0,016	0,0088	0,018	37,76
10		0,027	0,0148	0,030	31,86
40		0,100	0,0549	0,110	29,50
60		0,140	0,0768	0,154	27,53
5	20	0,020	0,0055	0,011	23,60
40		0,158	0,0433	0,087	23,31
60		0,213	0,0584	0,117	20,95

Ao se utilizar células centrifugadas a partir de 60 mL do caldo fermentativo, também se observa uma redução da atividade específica em relação ao volume de 40 mL, apesar de os valores de atividade serem mais elevados. Isto pode estar relacionado à quantidade de células na reação, onde um alto volume de células centrifugadas pode vir a resultar numa reação incompleta.

Ainda que os resultados com baixo tempo de reação sejam superiores, deve-se buscar a massa de células ideal para a reação de dosagem da atividade de asparaginase. Sendo assim, a próxima etapa de estudo é realizada com diferentes volumes de amostra centrifugada e em diferentes fases do crescimento da bactéria *Z. mobilis*.

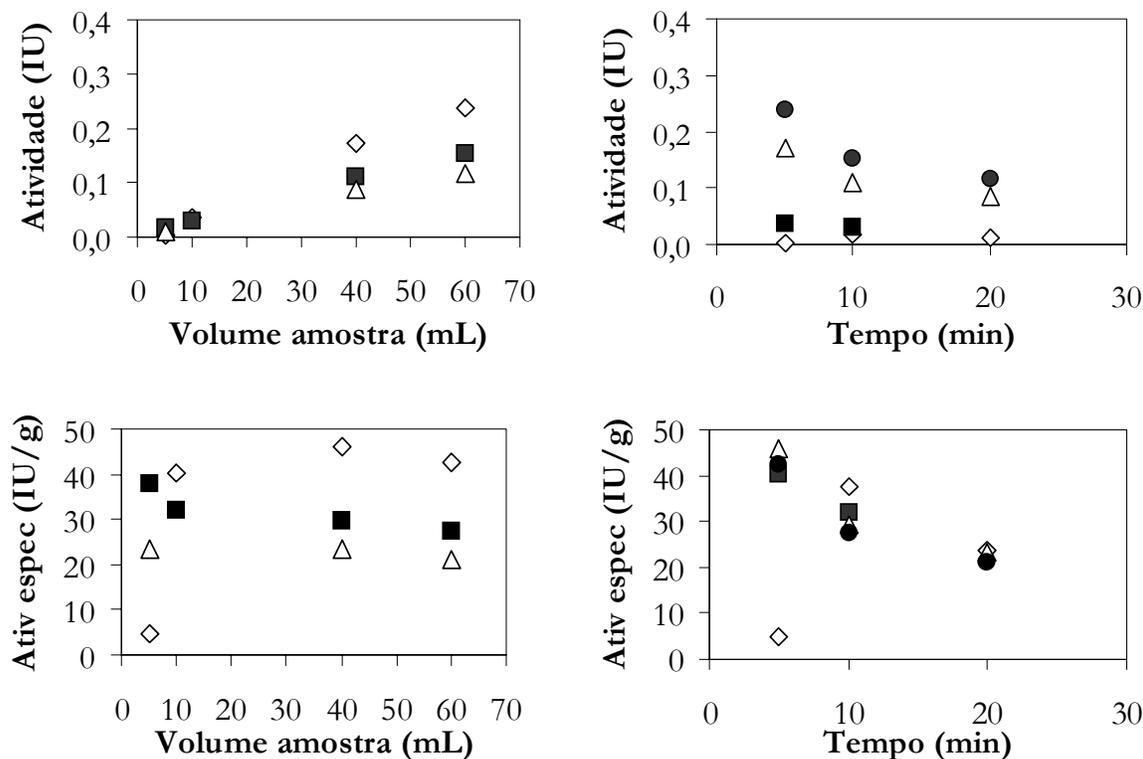


Figura 4.33 - Atividades e atividades específicas em função de pequenos tempos de reação e diferentes volumes de amostra centrifugados (◇ 5 min ou 5 mL, ■ 10 min ou 10 mL, △ 20 min ou 40 mL e ● 60 mL).

4.11.4 – Análise da Influência da Massa de Células sobre a Medida de Atividade

Para avaliar se é apenas a quantidade de células ou se o estado fisiológico no qual elas se encontram influencia a dosagem de atividade asparaginásica, duas diferentes cinéticas, uma em meio mínimo com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e outra em meio rico, são realizadas e os seus resultados estão colocados nas Tabelas 4.33 e 4.34 e Figuras 4.34 e 4.35, respectivamente. As reações são conduzidas por 30 min a 37°C.

A atividade de asparaginase ao longo do cultivo tende a permanecer constante a partir de um determinado volume de células. Isto pode ser visto claramente a partir da determinação da atividade específica, onde acima de 10 mL seu valor se torna, praticamente, constante.

Volumes pequenos de amostra centrifugada também tendem a gerar uma maior variabilidade nas determinações analíticas.

Tabela 4.33 – Determinação da atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio mínimo.

Tempo cultivo (h)	X (g/L)	Volume (mL)	Massa células (g)	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
5	0,043	5	0,0002	0,002	0,0007	0,001	6,82
		10	0,0004	0,015	0,0055	0,011	25,57
		20	0,0009	0,017	0,0062	0,012	14,49
		40	0,0017	0,024	0,0088	0,018	10,23
		80	0,0034	0,048	0,0176	0,035	10,23
8	0,144	5	0,0007	0,002	0,0007	0,001	2,04
		10	0,0014	0,015	0,0055	0,011	7,64
		20	0,0029	0,016	0,0059	0,012	4,07
		40	0,0058	0,023	0,0084	0,017	2,93
		80	0,0115	0,045	0,0165	0,033	2,86
10	0,286	5	0,0014	0,001	0,0004	0,001	0,51
		10	0,0029	0,006	0,0022	0,004	1,54
		20	0,0057	0,016	0,0059	0,012	2,05
		40	0,0114	0,023	0,0084	0,017	1,47

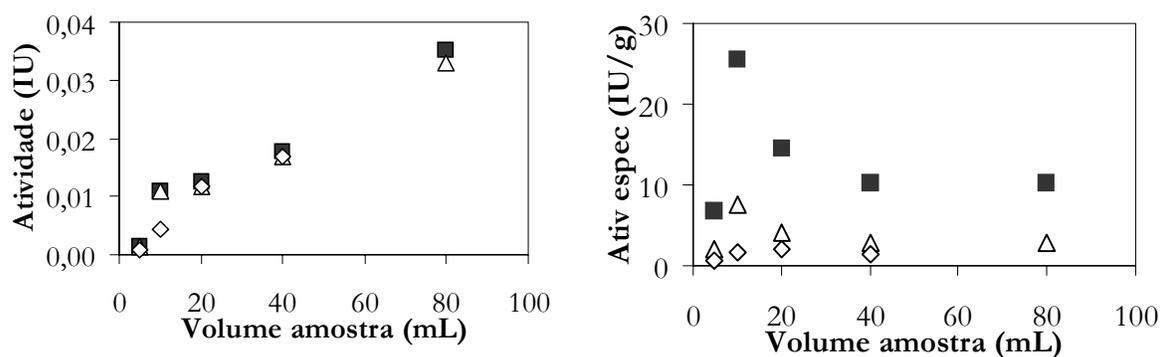


Figura 4.34 - Atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio mínimo (■ 5 horas, Δ 8 horas e ◇ 10 horas).

Apesar do aumento significativo da massa de células, a atividade permaneceu constante nas diferentes fases do processo fermentativo. Todavia, a atividade específica

tende a um valor constante a partir de 40 mL de caldo fermentado centrifugado. Isto nos leva a manter como condição estável do processo a centrifugação de 40 mL de amostra e 30 min o tempo de reação a 37°C.

Tabela 4.34 – Determinação da atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio rico.

Tempo cultivo (h)	X (g/L)	Volume (mL)	Massa células (g)	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
6	0,23	5	0,0012	0,000	0,0000	0,000	0,00
		10	0,0023	0,000	0,0000	0,000	0,00
		20	0,0046	0,010	0,0065	0,013	2,85
		40	0,0092	0,036	0,0229	0,046	4,97
		60	0,0138	0,031	0,0201	0,040	2,91
9	0,43	5	0,0022	0,001	0,0006	0,001	0,60
		10	0,0043	0,008	0,0048	0,010	2,24
		20	0,0086	0,020	0,0130	0,026	3,02
		40	0,0172	0,057	0,0366	0,073	4,25
		60	0,0258	0,071	0,0454	0,091	3,52
12	0,60	5	0,0030	0,005	0,0035	0,007	2,31
		10	0,0060	0,017	0,0112	0,022	3,72
		20	0,0120	0,033	0,0214	0,043	3,57
		40	0,0240	0,082	0,0526	0,105	4,39
		60	0,0360	0,098	0,0632	0,126	3,51
15	0,66	5	0,0033	0,011	0,0070	0,014	4,24
		10	0,0066	0,035	0,0227	0,045	6,87
		20	0,0132	0,074	0,0474	0,095	7,19
		40	0,0264	0,164	0,1051	0,210	7,97
		60	0,0396	0,219	0,1406	0,281	7,10

Para visualizar a formação de cor na análise de Nessler, resultado da quantidade amônia liberada, que indica a presença da enzima asparaginase, são apresentadas as Figuras 4.36 e 4.37 que ilustram, respectivamente, as amostras em diferentes tempos de cultivo (6 h, 9 h, 12 h e 15 h) ao se variar o volume de meio centrifugado para a reação e os diferentes

volumes de amostra centrifugada (5 mL, 10 mL, 20 mL, 40 mL e 60 mL) em 9 horas e 15 horas.

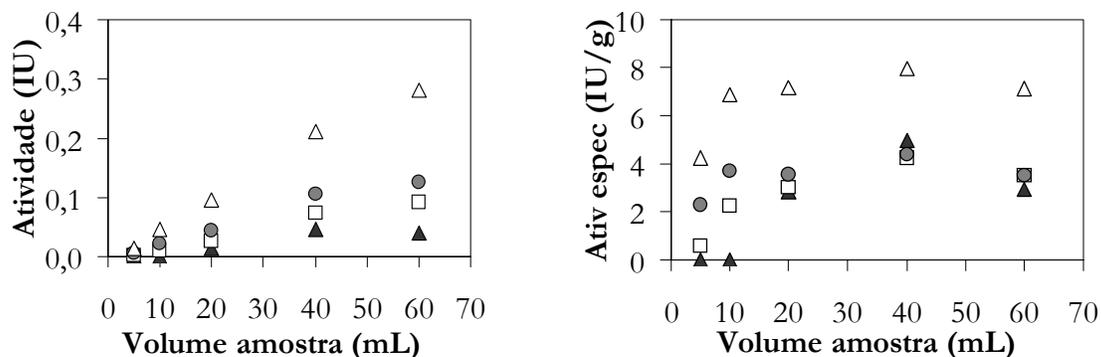


Figura 4.35 - Atividade e atividade específica em função de diferentes volumes de amostra centrifugados ao longo de um cultivo de *Z. mobilis* em meio rico (▲ 6 horas, □ 9 horas, ● 12 horas e △15 horas).

Com as Figuras, percebe-se claramente o acúmulo de enzima ao longo do tempo de cultivo. Pode-se observar, também, que as atividades de asparaginase se mostram crescentes com o aumento do volume de células centrifugadas a partir de 9 horas de cultivo, ou seja, já na fase exponencial de crescimento celular, iniciada após 6 horas de cultivo. Em todos os tempos de análise vê-se claramente que, apesar de um valor crescente da atividade, o volume de 60 mL de meio gera atividades específicas inferiores às amostragens realizadas com 40 mL de meio.

Com isto, considera-se que a quantidade de células que fornece uma medição mais estável, em todas as fases de crescimento abordadas, é resultante da centrifugação de 40 mL de meio de cultivo em reação de atividade a 37°C por 30 minutos.

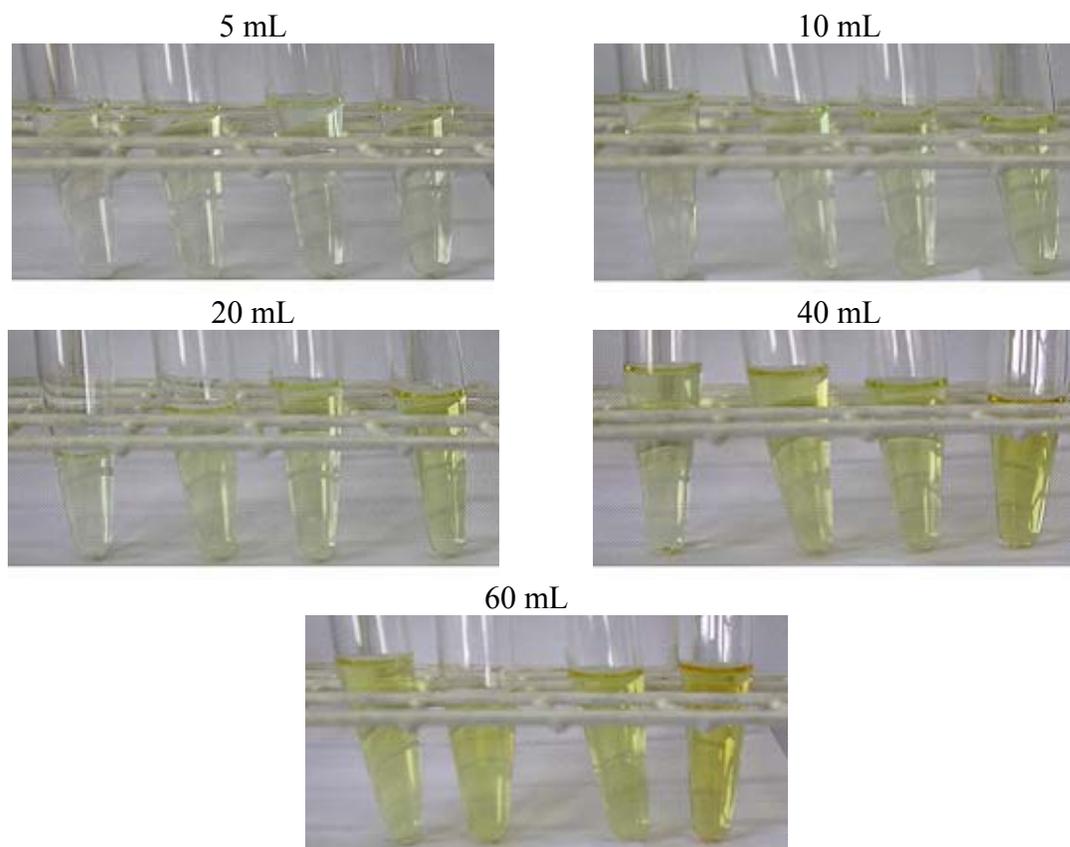


Figura 4.36 – Amostras de atividade em diferentes tempos de cultivo, variando-se o volume de cultura centrifugada para a reação.

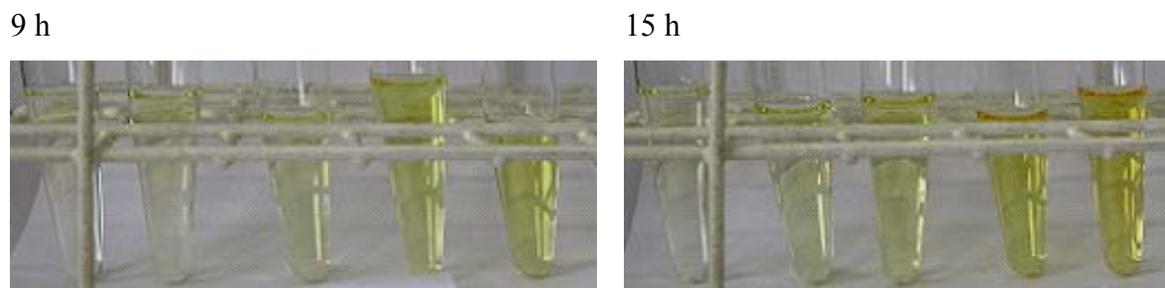


Figura 4.37 – Amostras de atividade em diferentes volumes de cultura centrifugada para a reação em 9 e em 15 horas de cultivo.

4.11.5 – Análise do Efeito da Concentração de Asparagina sobre a Atividade da Amostra

Por ainda não se conseguir obter uma condição ótima de ensaio e uma forma de reduzir a variabilidade nas medições de atividade, são realizados experimentos variando-se a concentração da solução de asparagina utilizada na reação.

Tomaram-se amostras de 3 cultivos distintos para avaliação da influência da concentração de asparagina utilizada na reação de atividade, juntamente com o tampão Tris-HCl. Além do procedimento usual da reação, que é a adição de 1 mL de tampão tris-HCl 0,05 M pH 8,6 a 1 mL de solução de asparagina 0,01M diluída no tampão tris, utilizou-se o procedimento de adição de apenas 2 mL de solução de asparagina nas concentrações 0,01M, 0,02 M, 0,04 M, 0,06 M e 0,08 M, uma vez que as amostras são diluídas em tampão tris-HCl 0,05 M e pH 8,6.

Os resultados são apresentados na Tabela 4.35. Em todos os experimentos realizados, utilizou-se 40 mL de amostra de meio de cultivo na centrifugação e o tempo de reação de 30 min.

A taxa específica de consumo de asparagina, descrita pela equação de Michaelis-Menten e responsável pela remoção de nitrogênio em forma de amônia mostra-se constante e máxima na faixa de estudo, indicando que a concentração de asparagina abordada neste estudo não inibe a reação de atividade.

Como não se observa uma grande variação na quantidade de amônia liberada na reação a partir de um aumento da concentração da solução de asparagina empregada, mantém-se o procedimento usual, padronizando a reação de atividade com 40 mL de amostra centrifugada de células e lavadas com NaCl 0,85% em contato com 1 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,6 e com 1 mL de solução de asparagina 0,01 M, num tempo de reação de 30 min a 37°C.

Tabela 4.35 – Influência da concentração de asparagina na reação de determinação da atividade de asparaginase.

Condição	Procedimento na reação		X (g/L)	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
Meio rico coleta após 24 horas de crescimento	usual		1,04	0,005	0,0031	0,0062	0,15
	2 mL	Asparagina 0,01 M		0,008	0,0053	0,0105	0,25
	2 mL	Asparagina 0,02 M		0,007	0,0044	0,0088	0,21
	2 mL	Asparagina 0,04 M		0,010	0,0063	0,0127	0,31
	2 mL	Asparagina 0,08 M		0,011	0,0072	0,0144	0,35
Meio rico coleta após 9 horas de crescimento	usual		0,144	0,038	0,0251	0,0501	1,21
	2 mL	Asparagina 0,01 M		0,041	0,0270	0,0540	1,30
	2 mL	Asparagina 0,02 M		0,044	0,0293	0,0585	1,41
	2 mL	Asparagina 0,04 M		0,029	0,0194	0,0389	0,94
	2 mL	Asparagina 0,06 M		0,036	0,0237	0,0475	1,15
	2 mL	Asparagina 0,08 M		0,031	0,0205	0,0410	0,099
Meio definido (73 g/L glicose 10 g/L peptona) coleta após 9 horas de crescimento	usual		0,286	0,404	0,2579	0,516	12,46
	2 mL	Asparagina 0,01 M		0,395	0,2526	0,505	12,20
	2 mL	Asparagina 0,02 M		0,391	0,2500	0,500	12,08
	2 mL	Asparagina 0,04 M		0,407	0,2604	0,521	12,58
	2 mL	Asparagina 0,06 M		0,488	0,3121	0,624	15,08
	2 mL	Asparagina 0,08 M		0,424	0,2711	0,542	13,10

4.12 – Influência da Agitação na Produção de Asparaginase por *Zymomonas mobilis*

Todas as cinéticas apresentadas neste trabalho são originadas de cultivos estáticos, em estufa a 30°C. Para avaliar a influência da agitação no processo de produção da enzima, foram realizados, simultaneamente, cultivos em estufa e em shaker a 200 rpm. Nestes experimentos, partiu-se de pré-inóculo e inóculo na mesma condição, ou seja, de cultura incubada em estufa a 30°C, resultando num mesmo inóculo de células centrifugadas e lavadas com NaCl estéril 0,85% para o processo fermentativo. Os ensaios foram realizados em duplicata e a Figura 4.38 apresenta o perfil do crescimento celular em ambas as condições e o desvio padrão em cada instante da medição.

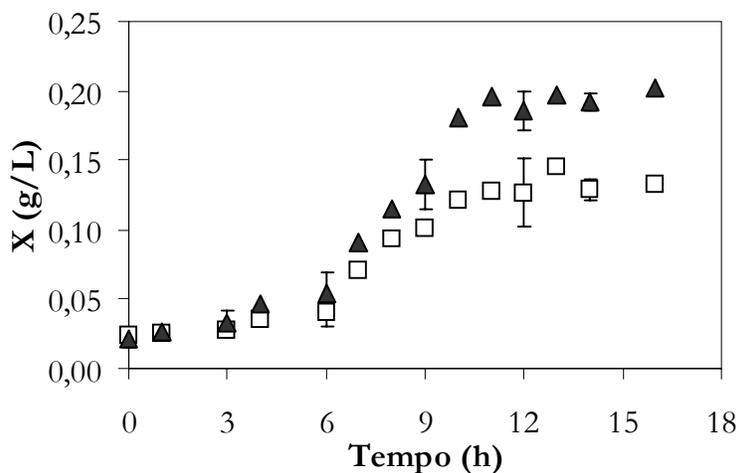


Figura 4.38 – Perfil de concentração de células em cultivos de *Zymomonas mobilis* (▲ cultivo sem agitação e □ cultivo com agitação a 200 rpm).

A partir de 3 horas de cultivo é possível se observar um crescimento mais lento para o experimento com agitação. Resultados semelhantes puderam ser observados na atividade e na atividade específica, como pode ser visualizado na Tabela 4.36 a seguir.

Tabela 4.36 – Atividade e atividade específica da asparaginase em cultivos de *Zymomonas* com e sem agitação.

Condição de ensaio	14 horas		34 horas	
	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
com agitação	0,0009 ± 0,0007	0,22 ± 0,13	0,0032 ± 0,0018	0,70 ± 0,22
sem agitação	0,0042 ± 0,0007	1,04 ± 0,18	0,0055 ± 0,0014	1,08 ± 0,20

Os resultados mostram que a atividade de asparaginase gerada por massa de células é cerca de 60 a 80% superior nos cultivos estáticos, mostrando que a agitação não é um fator preponderante nem para o crescimento em meio mínimo e nem para a produção da enzima.

4.13 – Investigação das melhores fontes de carbono e de nitrogênio na síntese da enzima asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis*

A bactéria *Zymomonas mobilis* utiliza glicose e frutose como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Para tentar compreender o mecanismo de síntese da asparaginase por esta bactéria, que utiliza a rota fermentativa de Entner-Doudoroff, resolveu-se avaliar fontes de carbono que entram nesta rota metabólica, como a sacarose e o ácido glicônico. A sacarose é assimilada através da ação das enzimas levanasacarase e sacarase presentes em *Z. mobilis*, transformando-se em glicose e frutose. Sob a ação destas enzimas, a sacarose é transformada em glicose e frutose, produzindo sorbitol e ácido glicônico. Algumas linhagens de *Zymomonas* apresentam bons resultados em elevadas concentrações de sacarose (Costa *et al.*, 2001). O ácido glicônico, por sua vez, é um produto oriundo da fermentação da glicose em função da presença da enzima glicose-frutose-oxidoreductase (GFOR).

Considerou-se como ensaio padrão o experimento com 10g/L de glicose, enquanto que para as demais fontes de carbono utilizou-se o mesmo número de moles de carbono do ensaio padrão. Em todos os experimentos, a concentração de asparagina foi igual a 0,5 g/L.

A cinética de crescimento celular é ilustrada na Figura 4.39 para diferentes fontes de carbono, apresentando também o erro gerado na reprodutibilidade a cada instante do ensaio. As principais variáveis cinéticas são apresentadas na Tabela 4.37. Como pode ser observado, sacarose e ácido glicônico mostraram-se más fontes de carbono e energia para a bactéria, gerando um baixo crescimento celular de *Zymomonas*, o que pode ser oriundo de algum carreamento de material das etapas anteriores de pré-inóculo e inóculo.

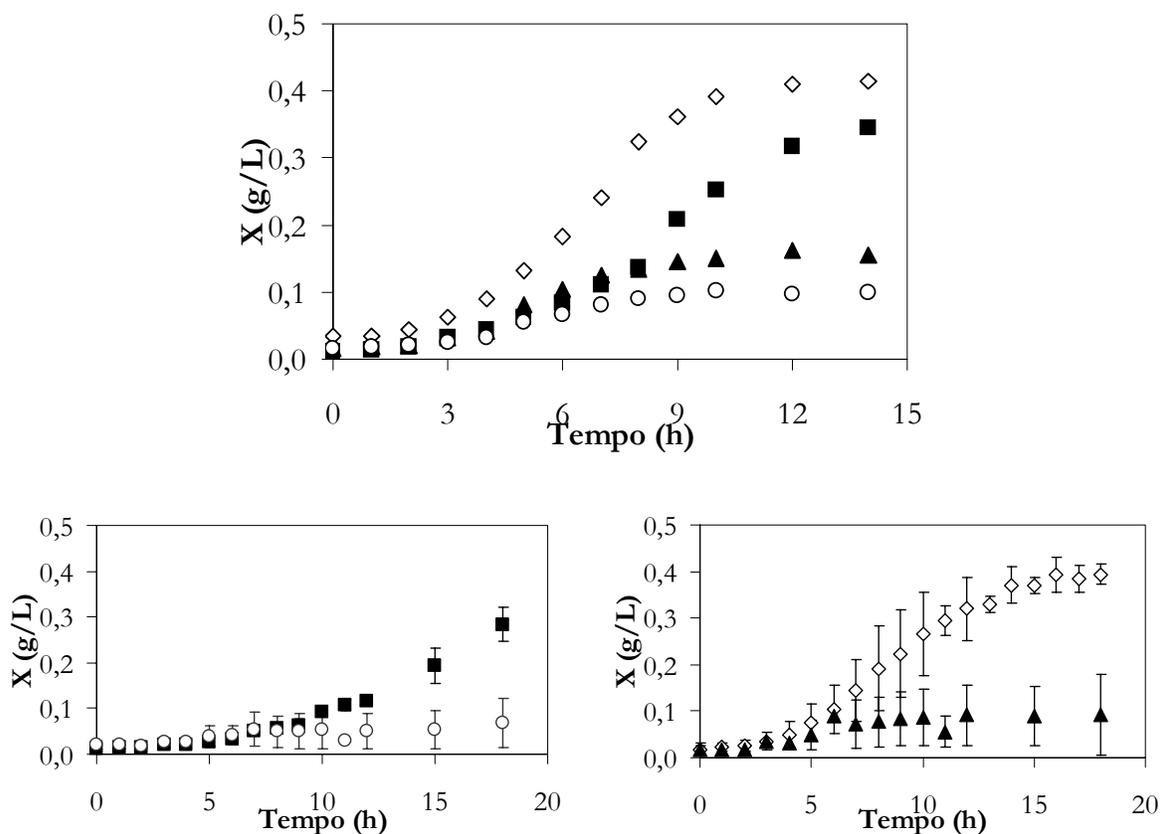


Figura 4.39 – Perfil de concentração celular da bactéria *Zymomonas mobilis* frente a diferentes fontes de carbono e os erros gerados a partir da reprodutibilidade dos experimentos (\diamond glicose, \blacktriangle ácido glicônico, \blacksquare frutose e \circ sacarose).

Tabela 4.37 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação das diferentes fontes de carbono na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*.

	Glicose	Frutose	Ác. Glicônico	Sacarose
Início exponencial (h)	2	2	3	3
Fase estacionária (h)	10	12	9	9
μ fase exponencial (h^{-1})	0,39	0,33	0,28	0,29
X final (g/L)	0,40	0,34	0,16	0,11
Atividade asparaginase final (IU)	0,012	0,008	0,000	0,000
Y_{XS} (g/g)	0,038	0,033	0,015	0,009
Atividade específica final (IU/g)	1,02	0,83	0,00	0,00
Y_{US} fonte C (IU/mol C)	0,003	0,002	0,000	0,000

Nas primeiras 5 horas de cultivo, sacarose, ácido glicônico e frutose apresentaram perfis de crescimento semelhantes, diferenciando-se ao longo da fase exponencial, quando a frutose apresentou uma maior capacidade de síntese pela bactéria, resultando numa maior produção de biomassa. O fator de conversão de substrato em células ao utilizar frutose como fonte de carbono foi praticamente semelhante ao encontrado na literatura e ao obtido com glicose.

A análise de atividade de asparaginase ao final da fase exponencial de crescimento foi superior para os experimentos com glicose, gerando uma produtividade de células em enzima cerca de 18% superior aos experimentos com frutose. No experimento com glicose, a quantidade de enzima convertida por mol de carbono foi cerca de 35% superior à quantidade de enzima convertida por mol de carbono da frutose. Para validar os dados experimentais, novos experimentos foram realizados com glicose e frutose, gerando os resultados expostos na Tabela 4.38 a seguir.

Tais experimentos confirmaram a maior síntese da enzima ao se utilizar glicose como fonte de carbono e energia, resultando em atividades enzimáticas acima de 65% superiores aos experimentos com frutose e atividade específicas acima de 70% para células geradas a partir da fermentação com glicose. A partir dos resultados obtidos, escolheu-se a glicose como melhor fonte de carbono e energia para a síntese da asparaginase.

Tabela 4.38 - Atividade e atividade específica frente a diferentes fontes de carbono.

Fonte de carbono	X (g/L)	Δ Abs	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
Glicose	0,62	0,172	0,0798	0,160	6,43
	0,56	0,137	0,0634	0,127	5,71
	0,60	0,076	0,0351	0,070	2,93
Frutose	0,58	0,024	0,0111	0,022	0,95
	0,52	0,003	0,0012	0,002	0,11
	0,55	0,027	0,0125	0,025	1,14

A partir da melhor fonte de carbono para o crescimento e produção da enzima, são realizados experimentos para avaliação da melhor fonte de nitrogênio na síntese da enzima. Sanchez e Demain (2002) citam que, nos processos fermentativos em geral, amônia,

glutamina e asparagina são boas fontes de nitrogênio, enquanto prolina e uréia são classificadas como más fontes de nitrogênio para as bactérias. Peptona e extrato de levedura, fontes orgânicas que contêm em sua composição todos os aminoácidos essenciais também são estudadas. Semelhante aos estudos com a fonte de carbono e energia, tem-se como experimento padrão a fermentação com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina. Excetuando-se os experimentos com peptona e com extrato de levedura, onde foi usada a concentração de 0,5 g/L, empregou-se nas demais fontes de nitrogênio o mesmo número de moles de nitrogênio da asparagina do meio mínimo convencional, isto é, $8,0 \times 10^{-4}$ moles. A concentração de glicose utilizada em todas as fermentações foi 10 g/L. Na Figura 4.40 é mostrado o perfil de crescimento da bactéria nas diferentes fontes estudadas.

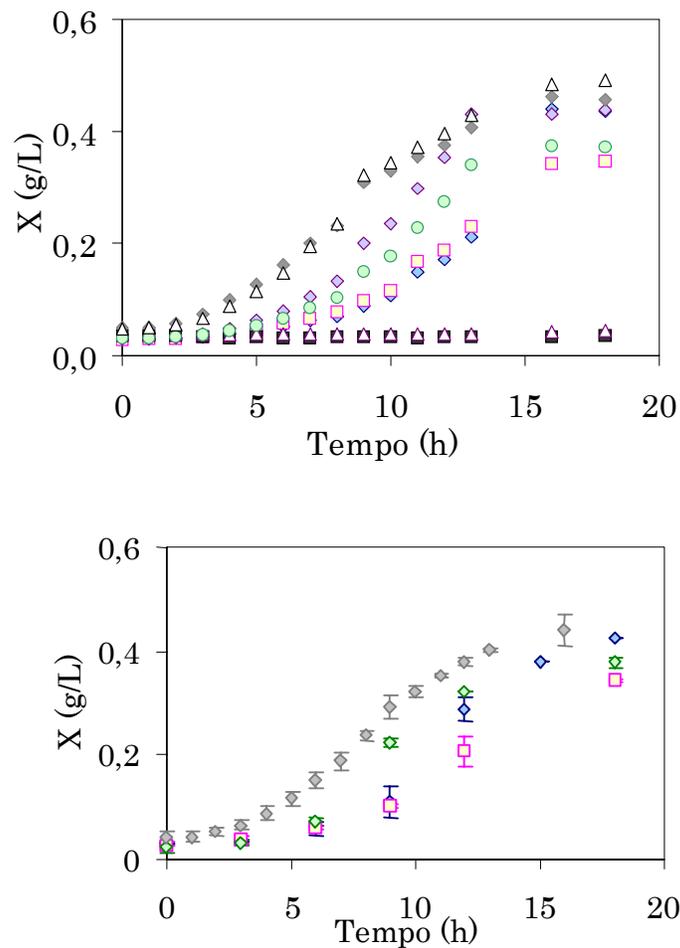


Figura 4.40 – Perfil do crescimento celular da bactéria *Zymomonas mobilis* frente a diferentes fontes de nitrogênio e as réplicas das principais fontes abordadas (\diamond peptona, \diamond asparagina).

glutamina, \diamond asparagina, \square aspartato, \circ sulfato de amônio, \blacksquare prolina, \triangle uréia, Δ peptona + extrato de levedura).

Observa-se que, apesar de um crescimento inicial mais lento, as fermentações conduzidas com asparagina, aspartato, sulfato de amônio e glutamina levam a níveis celulares praticamente semelhantes aos obtidos com peptona e peptona e extrato de levedura, as melhores fontes de nitrogênio para a síntese de asparaginase. Isto também pode ser visualizado na Tabela 4.39, onde são apresentadas as principais variáveis cinéticas obtidas neste estudo.

Ainda que as fermentações com peptona e peptona e extrato de levedura tenham mostrado um crescimento mais intenso ao longo da fase exponencial, as taxas específicas de crescimento (μ) obtidas nos cultivos com asparagina, aspartato, glutamina e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio se mostraram ligeiramente superiores. Mesmo apresentando perfis cinéticos de crescimento diferentes, ao final dos cultivos se observa que a conversão de substrato em células é praticamente semelhante.

Tabela 4.39 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação das diferentes fontes de nitrogênio na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*.

	Asparagina	Aspartato	Prolina	Glutamina	Uréia	Sulfato amônio	Peptona	Peptona + E. lêvedo
Início expoencional (h)	3	3	sc	3	sc	3	2	2
Fase estacionária (h)	18	18	sc	13	sc	14	13	13
μ fase exponencial (h^{-1})	0,33	0,37	sc	0,42	sc	0,37	0,29	0,29
X final (g/L)	0,44	0,35	0,03	0,44	0,04	0,37	0,46	0,49
Atividade na fase exponencial (IU)	0,005	0,014	0,000	0,025	0,00	0,024	0,040	0,044
Y_{XS} expon(g/g)	0,02	0,02	0,00	0,04	0,00	0,03	0,04	0,04
Atividade específica fase expon (IU/g)	1,73	4,19	0,00	4,11	0,00	5,30	5,75	5,91
Atividade final (IU)	0,071	0,050	0,000	0,047	0,00	0,064	0,080	0,084
Y_{XS} final (g/g)	0,04	0,03	0,00	0,04	0,00	0,03	0,04	0,04
Atividade específica final (IU/g)	6,43	5,73	0,00	4,39	0,00	6,41	6,96	6,98
Y_{US} glicose (IU/mol C)	0,018	0,013	-	0,012	-	0,016	0,020	0,021

sc- sem crescimento

Na fase exponencial de crescimento, a quantidade de asparaginase produzida pelo seu substrato específico, asparagina, foi inferior aos demais aminoácidos utilizados e fontes inorgânicas de nitrogênio.

A glutamina, apesar de propiciar um rápido crescimento e bom rendimento em biomassa e em enzima na fase exponencial, não foi capaz de manter semelhante desempenho na fase estacionária e continuar sintetizando uma grande quantidade de enzima.

Contudo, os maiores rendimentos em biomassa e em enzima foram gerados ao se utilizar peptona ou a mistura de peptona e extrato de levedura. Os experimentos com peptona também levaram a uma maior conversão do substrato glicose em enzima em comparação com os demais ensaios. Pelo fato de a produtividade de células em enzima e o rendimento em biomassa serem elevados no experimento com peptona, perdendo apenas para o experimento com a mistura de peptona e extrato de levedura que tem como fator negativo o uso de mais um substrato sem um incremento na produção da enzima, escolheu-se este nutriente como melhor fonte de nitrogênio para a síntese da enzima asparaginase.

Devido ao uso da peptona de carne obtida a partir da digestão enzimática (7% de aminoácidos livres), ao invés de uma peptona resultante da digestão pancreática de caseína (31% de aminoácidos livres), realizaram-se experimentos com peptona de carne, asparagina e a combinação destes. Isto foi feito para verificar a influência de uma fonte suplementar de aminoácido, em particular o substrato específico para a asparaginase, a asparagina, para a síntese da enzima. Tais experimentos foram conduzidos utilizando-se 10 g/L de glicose e 0,5 g/L da fonte de nitrogênio. As variáveis cinéticas mais importantes são dispostas na Tabela 4.40.

Um acompanhamento ao longo do cultivo da atividade e atividade específica frente às três fontes de nitrogênio estudadas é apresentado na Tabela 4.41.

Os resultados indicam que, ao final do crescimento, o incremento de um aminoácido à peptona no cultivo de *Zymomonas mobilis* não melhora significativamente a síntese da enzima por esta bactéria, ainda que na fase exponencial o cultivo com peptona e asparagina tenha resultado numa atividade superior à fermentação com apenas peptona como fonte de nitrogênio. Porém, a atividade específica apenas com peptona mostra-se cerca de 14% superior ao cultivo com peptona e asparagina.

Tabela 4.40 – Principais variáveis cinéticas usadas para avaliação da produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis*, quando asparaginase é adicionada à peptona.

	Asparagina	Peptona + Asparagina	Peptona
Início exponencial (h)	2	3	3
Fase estacionária (h)	15	15	15
μ fase exponencial (h^{-1})	0,31	0,33	0,32
X final (g/L)	0,53	0,58	0,52
Atividade na fase exponencial (IU)	0,017	0,063	0,062
Y_{XS} expon (g/g)	0,01	0,02	0,02
Atividade específica fase expon (IU/g)	2,22	5,03	6,50
Atividade final (IU)	0,042	0,054	0,040
Y_{XS} final (g/g)	0,04	0,04	0,04
Atividade específica final (IU/g)	3,93	5,20	6,01

Tabela 4.41 – Influência da concentração de asparagina na reação de determinação da atividade de asparaginase.

Fonte de nitrogênio	Tempo cultivo (h)	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	X (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
Asparagina	6	0,006	0,0028	0,09	0,006	2,09
	9	0,016	0,0069	0,13	0,014	3,56
	12	0,019	0,0086	0,31	0,017	2,22
	15	0,047	0,0208	0,53	0,042	3,93
Peptona + Asparagina	6	0,005	0,0021	0,11	0,004	1,25
	9	0,026	0,0118	0,26	0,024	3,02
	12	0,070	0,0314	0,50	0,063	5,03
	15	0,061	0,0271	0,58	0,054	5,20
Peptona	6	0,008	0,0037	0,14	0,007	1,75
	9	0,023	0,0104	0,27	0,021	2,57
	12	0,069	0,0309	0,38	0,062	6,50
	15	0,045	0,0202	0,42	0,040	6,01

Os resultados apresentados mostram a melhor produção da enzima ocorre ao se utilizar glicose como fonte de carbono e energia e peptona como fonte de nitrogênio.

4.14 – Estratégia de otimização da síntese de asparaginase pela bactéria *Zymomonas mobilis*

Após a escolha das melhores fontes de carbono e de nitrogênio para a formação da enzima asparaginase, busca-se otimizar as concentrações destas fontes para que sejam geradas altas atividade e atividades específicas. Para isto, realiza-se um planejamento fatorial a 2 níveis, com réplicas no ponto central, conforme descrito na Tabela 4.42. As concentrações mínimas e máximas foram definidas após um experimento prévio onde se avaliaram as condições de crescimento da bactéria.

Os resultados cinéticos de cada cultivo estão apresentados na Tabela 4.44. Para a avaliação estatística definiu-se tomar dois instantes de avaliação, que são na maior taxa específica de crescimento e em 9 horas de cultivo.

Tabela 4.42 – Condições do plano fatorial a 2 níveis para avaliação das melhores concentrações das fontes de carbono e nitrogênio.

Condições	-1 / -1	-1 / +1	0 / 0	+1 / -1	+1 / +1	0 / -1	-1 / 0	0 / +1	+1 / 0
Glicose (g/L)	1,0	1,0	50,5	100,0	100,0	50,5	1,0	50,5	100,0
Peptona (g/L)	0,5	10,0	5,25	0,5	10,0	0,5	5,25	10,0	5,25

Tabela 4.43 – Valores cinéticos do cultivo de *Z. mobilis* nas diferentes concentrações de glicose e de peptona estudadas.

Condição	Tempo (h)	μ (h ⁻¹)	X (g/L)	pH	Substrato (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
-1 / -1	0		0,05	6,24	0,97	0,002	0,86
	3	0,23	0,10	6,17	0,61	0,007	1,80
	6	0,25	0,21	6,05	0,24	0,006	0,67
	9	0,02	0,23	6,07	0,05	0,006	0,61
	12	0,01	0,23	6,09	0,00	0,004	0,48
	15	0,01	0,24	6,12	0,00	0,007	0,74
	18	0,00	0,24	6,13	0,00	0,008	0,87

Condição	Tempo (h)	μ (h^{-1})	X (g/L)	pH	Substrato (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)	
-1 / +1	0		0,06	6,36	0,78	0,001	0,28	
	3	0,22	0,12	6,28	0,56	0,002	0,31	
	6	0,25	0,26	6,17	0,01	0,002	0,18	
	9	0,02	0,27	6,20	0,01	0,001	0,09	
	12	0,00	0,27	6,23	0,01	0,001	0,10	
	15	0,00	0,27	6,25	0,01	0,002	0,18	
	18	0,00	0,27	6,26	0,00	0,003	0,31	
0 / 0	0		0,04	6,26	46,33	0,024	15,19	
	3	0,39	0,12	5,95	44,95	0,019	3,98	
	6	0,47	0,48	5,52	30,79	0,036	4,99	
	9	0,18	0,83	5,26	27,67	0,149	5,98	
	12	0,07	1,02	5,23	16,58	0,169	6,61	
	15	0,04	1,14	5,22	3,53	0,168	5,89	
	18	0,02	1,21	5,26	0,05	0,120	3,97	
0 / 0	0		0,03	6,13	48,05	0,029	27,83	
	3	0,22	0,06	6,01	45,80	0,025	10,47	
	6	0,49	0,25	5,69	42,90	0,039	3,93	
	9	0,28	0,58	5,39	29,72	0,155	6,66	
	12	0,15	0,92	5,24	15,96	0,164	4,45	
	15	0,06	1,09	5,19	3,25	0,160	3,66	
	18	0,06	1,29	5,28	0,02	0,190	3,68	
0 / 0	0		0,05	6,28	47,69	0,030	16,53	
	3	0,31	0,12	5,96	44,46	0,030	6,63	
	6	0,48	0,50	5,53	33,36	0,040	5,56	
	9	0,20	0,92	5,329	26,43	0,150	5,39	
	12	0,04	1,05	5,20	16,66	0,180	6,74	
	15	0,04	1,19	5,21	2,04	0,180	6,00	
	18	0,04	1,34	5,33	0,012	0,190	5,68	
+1 / -1	0		0,06	6,16	100,79	0,018	7,69	
	3	0,37	0,19	5,94	97,39	0,021	2,77	
	6		0,23	0,39	5,70	89,08	0,018	3,14
	9		0,23	0,78	5,47	85,11	0,045	1,91
	12		0,09	1,04	5,36	71,74	0,068	2,61
	15		0,05	1,22	5,25	62,90	0,055	1,79
	18		0,04	1,37	5,31	53,93	0,115	3,36

Condição	Tempo (h)	μ (h ⁻¹)	X (g/L)	pH	Substrato (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
+1 / +1	0		0,07	6,17	98,86	0,062	22,28
	3	0,17	0,12	5,91	94,48	0,021	4,47
	6	0,38	0,39	5,59	79,77	0,036	6,24
	9	0,33	1,05	5,29	75,31	0,153	4,85
	12	0,08	1,31	5,18	62,35	0,150	4,57
	15	0,01	1,36	5,23	32,63	0,145	4,28
	18	0,02	1,44	5,28	15,53	0,149	4,13
0 / -1	0		0,06	6,22	47,26	0,000	0,00
	3	0,34	0,16	6,05	45,75	0,000	0,00
	6	0,25	0,33	5,74	43,07	0,083	6,31
	9	0,26	0,73	5,49	40,11	0,160	5,50
	12	0,04	0,82	5,37	33,42	0,211	6,42
	15	0,05	0,95	5,4	25,27	0,214	5,64
	18	0,02	1,01	5,41	4,79	0,231	5,26
-1 / 0	0		0,08	6,36	0,96	0,000	0,00
	3	0,28	0,20	6,24	0,60	0,000	0,00
	6	0,18	0,33	6,16	0,23	0,001	0,09
	9	0,03	0,36	6,18	0,01	0,001	0,09
	12	0,01	0,36	6,19	0,00	0,004	0,26
	15	0,00	0,36	6,19	0,00	0,002	0,17
	18	0,00	0,36	6,23	0,00	0,000	0,00
0 / +1	0		0,06	6,14	52,88	0,000	0,00
	3	0,24	0,13	5,97	43,84	0,018	3,53
	6	0,50	0,58	5,57	43,62	0,108	4,65
	9	0,28	1,35	5,3	32,22	0,187	3,47
	12	0,02	1,45	5,2	16,11	0,225	3,89
	15	0,03	1,59	5,23	2,03	0,206	3,24
	18	0,01	1,66	5,33	0,00	0,186	2,80
+1 / 0	0		0,06	6,07	109,86	0,000	0,00
	3	0,23	0,12	5,93	106,03	0,004	0,77
	6	0,32	0,32	5,63	99,07	0,086	6,70
	9	0,39	1,03	5,33	88,77	0,176	4,28
	12	0,09	1,35	5,17	73,32	0,190	3,52
	15	0,08	1,74	5,13	56,33	0,192	2,76
	18	0,07	2,15	5,17	40,00	0,211	2,45

Na avaliação estatística do modelo que melhor define as concentrações ótimas das fontes de carbono e nitrogênio para as determinações de atividade e atividade específica, observou-se a influência da concentração de glicose e de uma variável não estudada na determinação da atividade e atividade específica da enzima. Em todas as condições estudadas, o modelo descrito na Equação 20 foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais, ainda que a atividade na taxa específica máxima de crescimento tenha gerado um coeficiente de correlação de 0,74, pois na atividade específica tal modelo gerou um coeficiente de correlação igual a 0,94. Em 9 horas de cultivo, por sua vez, o modelo se ajustou bem em ambas as condições, gerando um coeficiente de correlação acima de 0,95.

$$Y = a_1.X_1 + a_2.X_2 + a_3.X_1.X_2 + a_4.X_1.X_1 + a_5.X_2.X_2 + a_6 \quad (4.20)$$

onde X_1 é a concentração de glicose no meio de cultivo (g/L), X_2 é a concentração de peptona no meio de cultivo (g/L) e a_1, a_2, a_3, a_4 e a_5 são parâmetros do modelo.

Os parâmetros obtidos para as determinações de atividade e seus erros paramétricos são apresentados nas Equações 21 a 24, sendo Y_1 e Y_2 as atividade e atividade específica para o estudo na taxa específica máxima de crescimento, respectivamente, e Y_3 e Y_4 as atividade e atividade específica para o estudo em 9 horas de cultivo, respectivamente.

$$Y_1 = 0,022 \pm 0,014X_1 + 0,007 \pm 0,014X_2 + 0,005 \pm 0,017X_1.X_2 - 0,040 \pm 0,022X_1.X_1 + 0,012 \pm 0,022X_2.X_2 + 0,057 \pm 0,018 \quad (4.21)$$

$$Y_2 = 2,523 \pm 0,501X_1 + 0,158 \pm 0,501X_2 + 0,897 \pm 0,614X_1.X_2 - 2,216 \pm 0,771X_1.X_1 - 0,131 \pm 0,771X_2.X_2 + 5,141 \pm 0,630 \quad (4.22)$$

$$Y_3 = 0,061 \pm 0,012X_1 + 0,022 \pm 0,012X_2 + 0,028 \pm 0,015X_1.X_2 - 0,094 \pm 0,019X_1.X_1 - 0,009 \pm 0,019X_2.X_2 + 0,164 \pm 0,016 \quad (4.23)$$

$$Y_4 = 1,708 \pm 0,435X_1 + 0,065 \pm 0,435X_2 + 0,865 \pm 0,533X_1.X_2 - 3,191 \pm 0,669X_1.X_1 - 0,891 \pm 0,669X_2.X_2 + 5,756 \pm 0,546 \quad (4.24)$$

As Figuras 4.41 e 4.42 ilustram o comportamento da atividade e da atividade específica nas condições estudadas.

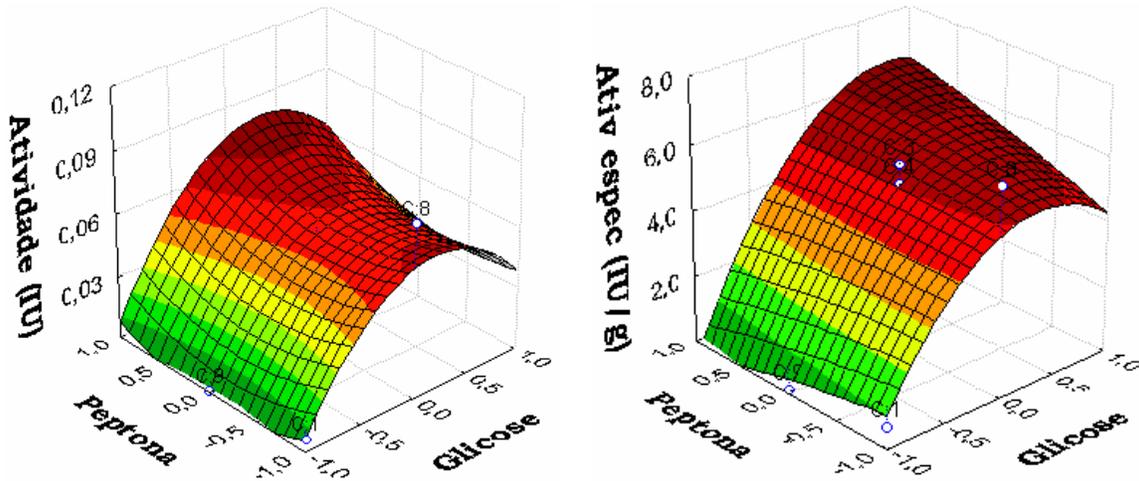


Figura 4.41 – Comportamento da atividade e da atividade específica no instante onde a taxa específica de crescimento é máxima .

Além de o ajuste ser melhor em 9 horas de cultivo, vê-se claramente os diferentes perfis de atividade e atividade específica destes em relação ao tratamento estatístico realizado no instante de maior taxa específica de crescimento de cada condição analisada. A partir dos parâmetros encontrados no modelo, um novo conjunto de experimentos é realizado com o valor ideal das variáveis X_1 (concentração de glicose) e X_2 (concentração de peptona), cujos resultados cinéticos estão apresentados na Tabela 4.44

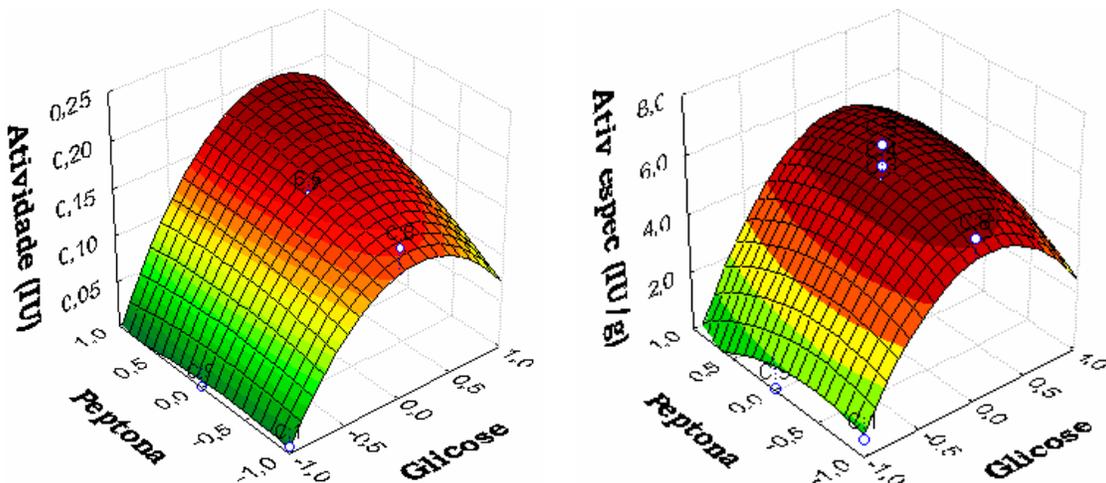


Figura 4.42 – Comportamento da atividade e da atividade específica em 9 horas de cultivo.

Tabela 4.44 – Valores cinéticos do cultivo de *Z. mobilis* na otimização do planejamento.

Condição	Tempo		X (g/L)	pH	Substrato (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
	(h)	μ (h^{-1})					
+0,46 / +1	0		0,04	6,08	85,09	0,000	0,00
	3	0,22	0,07	5,99	78,05	0,008	3,03
	6	0,34	0,20	5,75	76,02	0,054	6,71
	9	0,44	0,75	5,39	67,75	0,198	6,59
	12	0,13	1,09	5,2	61,46	0,240	5,50
	15	0,10	1,49	5,16	39,51	0,254	4,26
	18	0,00	1,51	5,13	17,91	0,263	4,35
-0,38 / -1	0		0,05	6,26	31,57	0,000	0,00
	3	0,27	0,11	6,16	28,38	0,001	0,32
	6	0,27	0,24	5,92	26,86	0,016	1,62
	9	0,20	0,45	5,61	25,04	0,095	5,25
	12	0,13	0,65	5,49	23,58	0,157	6,03
	15	0,03	0,72	5,44	19,51	0,198	6,86
	18	0,06	0,87	5,33	13,71	0,202	5,80

Adicionando os dados cinéticos obtidos na otimização ao modelo proposto e comparando-se o valor máximo da atividade e atividade específica previstas no modelo com o valor experimental na condição ótima, encontra-se o quadro disposto na Tabela 4.45.

Tabela 4.45 - Comparativo entre os valores máximos previstos pelo modelo e os valores experimentais da atividade e atividade específica em 9 horas de cultivo.

Condição	Tempo (h)	Atividade (IU)		Atividade específica (IU/g)	
		Valor predito	Valor experimental	Valor predito	Valor experimental
0,46 / +1	$\mu_{\text{máx}}$	0,117	0,054	6,26	6,71
	9	0,197	0,198	5,89	6,59
-0,38 / -1	$\mu_{\text{máx}}$	0,045	0,016	5,03	1,62
	9	0,103	0,095	5,87	5,25

Comparando-se o valor máximo da atividade predito com o valor experimental, verifica-se que o modelo escolhido para o tempo de 9 horas de cultivo foi o que melhor descreveu o processo. O mesmo foi observado para os valores da atividade específica. A Figura 4.43 ilustra o comportamento das atividades após a otimização.

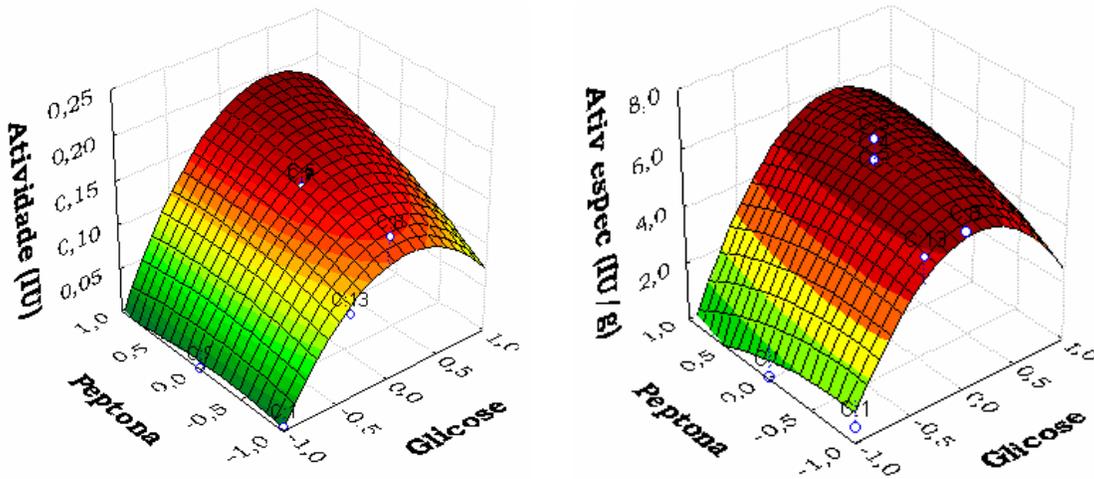


Figura 4.43 – Comportamento da atividade e da atividade específica em 9 horas de cultivo após a otimização do modelo.

O modelo otimizado em 9 horas de cultivo tornou significativo o parâmetro relacionado com a peptona na determinação da atividade, ao mesmo tempo em que o modelo para a atividade específica manteve as mesmas características de antes da otimização, como pode ser observado nas Equações 25 e 26, onde Y_1 e Y_2 são as determinações de atividade e atividade específica para o estudo na taxa específica máxima de crescimento, respectivamente.

$$Y_1 = 0,062 \pm 0,010X_1 + 0,023 \pm 0,009X_2 + 0,028 \pm 0,013X_1.X_2 - 0,092 \pm 0,025X_1.X_1 - 0,011 \pm 0,015X_2.X_2 + 0,163 \pm 0,013 \quad (4.35)$$

$$Y_2 = 1,715 \pm 0,411X_1 + 0,057 \pm 0,366X_2 + 1,018 \pm 0,500X_1.X_2 - 3,476 \pm 0,607X_1.X_1 - 0,570 \pm 0,596X_2.X_2 + 5,870 \pm 0,520 \quad (4.36)$$

Os dados otimizados satisfizeram o modelo proposto, como pode ser visto na Tabela 4.45, indicando que uma das condições ótimas para a produção da enzima é a concentração de 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona.

Comparando os resultados obtidos neste experimento com o ensaio realizado nas mesmas condições e apresentado na Tabela 4.35 observa-se uma redução significativa na atividade e atividade específica de asparaginase. Isto se deve à centrifugação do inóculo antes de se iniciar a etapa de fermentação para evitar o acúmulo de glicose no meio de uma etapa para outra, como o visto no experimento apresentado na Tabela 4.44.

4.15 – Avaliação da Estabilidade de Asparaginase nas Células de *Zymomonas mobilis*

Com as condições ótimas de produção da enzima determinadas, avalia-se a influência do tempo e da temperatura de armazenamento das células na atividade de asparaginase.

Neste experimento, as células a serem inoculadas para a etapa seguinte foram centrifugadas. Os resultados da cinética de fermentação estão dispostos na Tabela 4.46. A análise de estabilidade foi realizada coletando-se amostras em 9 horas de cultivo fermentativo, centrifugando e lavando as células com NaCl 0,85%, descartando o sobrenadante e adicionando 2 mL de NaCl 0,85%. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (± 27 °C), na geladeira (± 4 °C) e no freezer (- 4 °C). O tempo de armazenamento para análise de atividade, nas três condições, foi de 3 dias, 7 dias, 14 dias e 30 dias. Os resultados de atividade e atividade específica estão apresentados na Tabela 4.47 e ilustrados na Figura 4.44.

Tabela 4.46 – Cinética fermentativa do cultivo de *Zymomonas* em peptona e glicose.

Tempo (h)	μ (h ⁻¹)	X (g/L)	pH	Substrato (g/L)	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
0		0,05	6,05	77,35	0,019	9,84
3	0,34	0,14	5,90	72,65	0,036	6,65
6	0,37	0,41	5,55	70,87	0,112	6,78
9	0,30	1,00	5,33	65,59	0,542	13,50
12	0,10	1,36	5,25	50,94	0,535	9,86
15	0,10	1,83	5,28	26,12	0,500	6,85
18	0,08	2,30	5,19	0,02	0,501	5,45

Pôde-se observar que a cinética partindo de inóculo com células centrifugadas foi mais rápida do que os resultados anteriores obtidos com o inóculo partindo de uma cultura líquida. Também deve ser destacada a alta atividade de asparaginase neste cultivo em relação ao cultivo realizado na otimização das concentrações de glicose e peptona.

Tabela 4.47 – Atividade e atividade específica em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Tempo armazenamento	Temperatura armazenamento	Δ Abs	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
0	-	0,421	0,2709	0,542	13,50
3 dias	Ambiente	0,257	0,1797	0,359	8,96
	Geladeira	0,397	0,2775	0,555	13,83
	Freezer	0,272	0,1902	0,380	9,48
7 dias	Ambiente	0,279	0,1953	0,391	9,73
	Geladeira	0,382	0,2668	0,534	13,30
	Freezer	0,277	0,1934	0,387	9,64
14 dias	Ambiente	0,321	0,1920	0,384	9,57
	Geladeira	0,424	0,2529	0,506	12,61
	Freezer	0,297	0,1771	0,354	8,83
30 dias	Ambiente	0,305	0,1976	0,395	9,85
	Geladeira	0,381	0,2472	0,494	12,32
	Freezer	0,295	0,1911	0,382	9,52

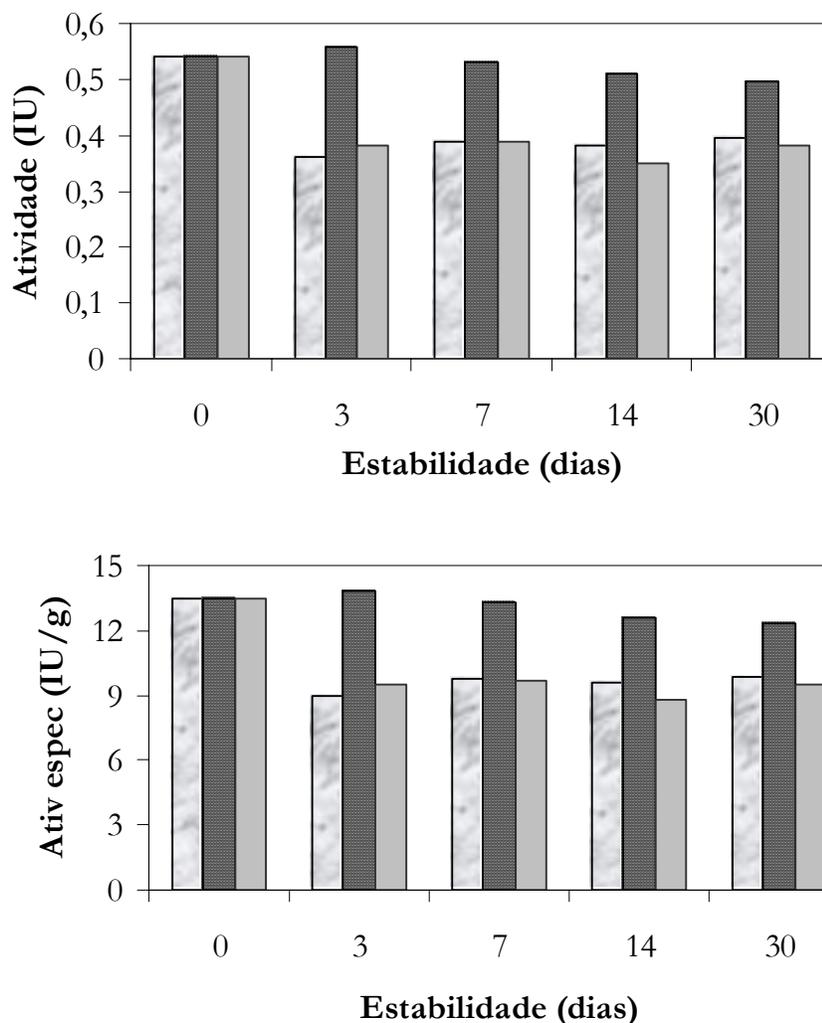


Figura 4.44 – Comportamento da atividade e atividade específica em função do tempo e da temperatura de armazenamento (\square 27°C, \boxtimes 4°C e \blacksquare -4°C).

Conclui-se com os dados que a geladeira é a melhor forma de estar armazenando as células, uma vez que a perda de atividade gerada após 30 dias geladeira foi inferior a 10%, enquanto que nas demais condições a perda chegou a 30%.

A inoculação para a fermentação propriamente dita com células centrifugadas gerou variações na análise de atividade e, por conseguinte, na atividade específica, como pode ser observado na Figura 4.45.

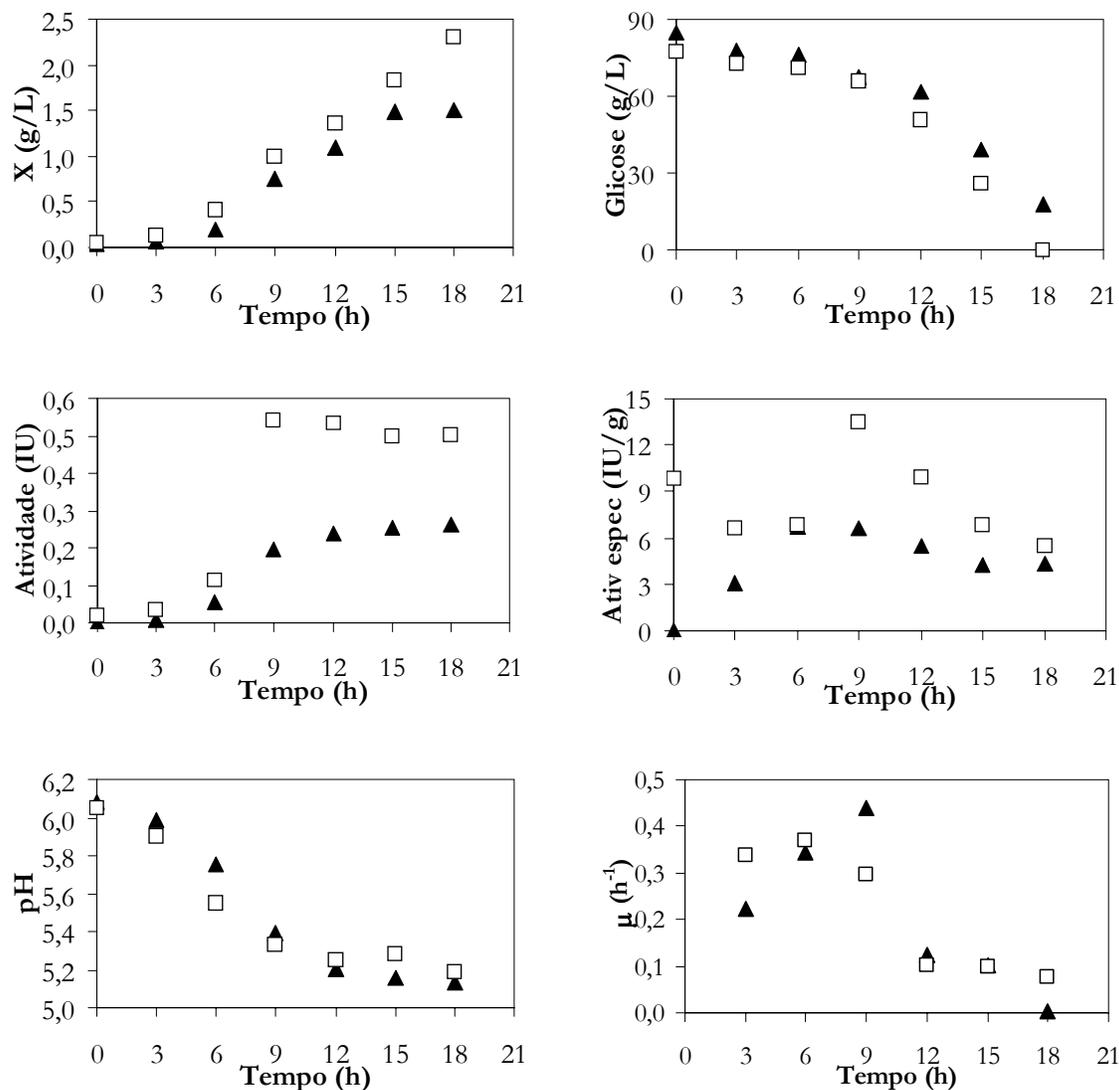


Figura 4.45 - Comportamento cinético das principais variáveis nas duas formas de inoculação realizadas para a fermentação com 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona (▲ cultura líquida e □ cultura com células centrifugadas).

Os resultados mostram que até a forma de inoculação gera dispersões analíticas, sendo, assim, necessário padronizar também a forma com a qual se transfere o inóculo. As células centrifugadas trazem a vantagem de não conduzir efeitos de carreamento da etapa anterior, uma vez que após a centrifugação do meio as células também são lavadas com NaCl 0,85% estéril. Na fermentação em questão, o residual de glicose da etapa de inóculo

ao se utilizar a cultura líquida fez com que, ao final da fermentação, ainda houvesse uma elevada quantidade de glicose no meio.

4.16 – Avaliação da Influência do pH na Atividade de Asparaginase

Como o pH do meio de cultivo não é controlado ao longo da fermentação, mostrando uma queda ao longo do consumo da fonte de carbono e energia e, após a sua exaustão, um novo aumento do pH, como mostram as Figuras 4.9 a 4.14 e 4.21, estudos foram realizados para verificar se o controle do pH vem a beneficiar a produção de atividade asparaginásica.

A primeira etapa deste estudo foi a de avaliar em que concentração de tampão fosfato há crescimento e se ocorre grande variabilidade do pH nestas condições. Para isto, padronizaram-se os tampões analisados em pH 6,0. Os acompanhamentos realizados foram a absorbância e o pH ao longo do cultivo. A condição onde o pH se manteve estável e com crescimento foi a concentração de 0,1 M de tampão fosfato de potássio. Os valores de pH analisados nesta concentração variaram de 6,0 a 9,0, tendo como controle um cultivo normal de 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de peptona, sem controle de pH. A atividade asparaginásica, determinada nas fases exponencial e estacionária e após 24 horas de cultivo, está apresentada na Tabela 4.48 e os perfis de crescimento, pH, atividade e atividade específica estão ilustrados na Figura 4.46.

Os dados mostram claramente que o pH 6 e o crescimento sem controle do pH apresentam perfis de crescimento próximos, sendo esta, então, a faixa ideal para o cultivo da bactéria. Além disto, o controle do pH mostrou o favorecimento na síntese da enzima, gerando rendimentos superiores a 35% quando esta variável está sendo controlada.

Tabela 4.48 – Atividade e atividade específica em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Tempo cultivo (h)	Condição	Δ Abs	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
9	padrão	0,016	0,0125	0,025	5,22
	pH 6	0,027	0,0210	0,042	9,55
	pH 7	0,014	0,0113	0,023	8,06
	pH 8	0,009	0,0067	0,013	8,42
	pH 9	0,005	0,0039	0,008	4,90
12	padrão	0,045	0,0354	0,071	8,05
	pH 6	0,082	0,0639	0,128	14,51
	pH 7	0,028	0,0220	0,044	8,47
	pH 8	0,021	0,0167	0,033	10,43
	pH 9	0,020	0,0159	0,032	13,28
24	padrão	0,092	0,0721	0,144	10,68
	pH 6	0,105	0,0824	0,165	13,73
	pH 7	0,052	0,0406	0,081	7,96
	pH 8	0,050	0,0390	0,078	8,13
	pH 9	0,060	0,0469	0,094	8,01

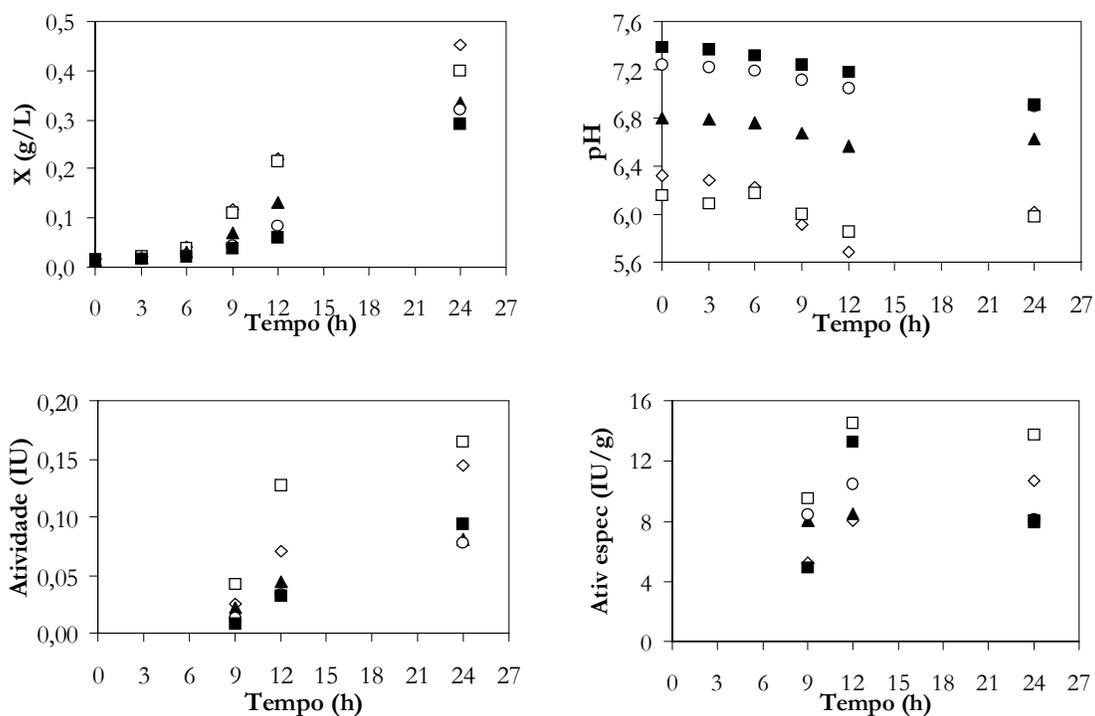


Figura 4.46 – Perfil cinético da bactéria *Zymomonas mobilis* em diferentes pH's (\diamond padrão, \square pH 6, \blacktriangle pH 7, \circ pH 8 e \blacksquare pH 9).

4.17 – Padronização das Etapas de Processo na Produção de Asparaginase por Células de *Zymomonas mobilis*

Dentre os objetivos deste trabalho destacam-se a manutenção de reprodutibilidade do processo fermentativo (minimização de variâncias) e a maximização da produção da enzima asparaginase. A Tabela 4.49 apresenta os resultados obtidos nos experimentos realizados, com a intenção de avaliar a atividade e a atividade específica durante a fase exponencial de crescimento, antes e depois de padronizar a metodologia de acompanhamento do bioprocessos.

Percebe-se claramente que a padronização das metodologias de análise de atividade e de inoculação gerou variações consideráveis na atividade e na atividade específica de asparaginase de *Zymomonas mobilis*.

Por exemplo, para a concentração de glicose de 10 g/L e 0,5 g/L de diferentes fontes de nitrogênio, as atividades específicas variaram de 6,11 a 10,93 IU/g células, antes da padronização, e de 2,93 a 5,30 IU/g células após a padronização. Essas variações não podem ser explicadas pelo erro experimental, como atestam as réplicas realizadas para 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (2,93 e 3,56 IU/g) e para 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de peptona (5,22 e 6,50 IU/g). No entanto, as medidas de atividade obtidas antes dos estudos de padronização podem ter sido influenciadas pelas diferenças nos volumes de meio de cultivo centrifugados para a reação de atividade asparaginásica, como foi mostrado na Tabela 4.33. Além disso, é possível que as características celulares tenham mudado ao longo dos ensaios experimentais.

A variabilidade observada nos dados motivou a repetição dos experimentos que, antes da padronização, resultaram na maior atividade específica da enzima. Dessa forma, procurou-se verificar a influência das padronizações realizadas, o que inclui a realização de experimentos com uma nova cultura da bactéria *Z. mobilis* CP4, fornecida pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, para avaliar a influência da condição e da viabilidade celular sobre os resultados. Observou-se o não crescimento da bactéria nos ensaios realizados com asparagina e aspartato, como fontes de carbono e nitrogênio, e baixo crescimento celular nos ensaios realizados com 1 g/L de glicose. Apesar disso, os ensaios conduzidos com 50 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona geraram resultados muito semelhantes aos

anteriores. As Figuras 4.47 a 4.51 mostram os perfis cinéticos obtidos nos experimentos conduzidos com 1 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina, 1 g/L de glicose e 0,5 g/L de aspartato, 0,5 g/L de aspartato e 0,5 g/L de asparagina, 50 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina e 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona, respectivamente.

Tabela 4.49 – Média da atividade e atividade específica na fase exponencial de cultivo.

Antes das etapas de cultivo e metodologias analíticas serem padronizadas			
Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
1 g/L glicose		0,10	20,26
5 g/L glicose		0,09	8,73
10 g/L glicose	0,5 g/L asparagina	0,14	9,09
30 g/L glicose		0,13	8,19
50 g/L glicose		0,17	13,79
1 g/L glicose	0,5 g/L aspartato	0,06	13,19
10 g/L glicose		0,09	10,93
10 g/L glicose	0,5 g/L sulfato	0,09	6,11
0,5 g/L aspartato	0,5 g/L asparagina	0,09	21,71
Depois das etapas de cultivo e metodologias analíticas serem padronizadas			
Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	Atividade (IU)	Atividade específica (IU/g)
10 g/L glicose	0,5 g/L asparagina	0,070	2,93
10 g/L frutose		0,025	1,14
	0,5 g/L asparagina	0,005	3,56
	0,5 g/L aspartato	0,014	4,19
10 g/L glicose	0,5 g/L glutamina	0,025	4,11
	0,5 g/L sulfato	0,024	5,30
	0,5 g/L peptona	0,040	6,50
1 g/L glicose	0,5 g/L peptona	0,006	0,61
100 g/L glicose	0,5 g/L peptona	0,045	1,91
	10 g/L peptona	0,153	4,85
1 g/L glicose	5,25 g/L peptona	0,001	0,09
100 g/L glicose	5,25 g/L peptona	0,176	4,28
73 g/L glicose	10 g/L peptona	0,198	13,50
32 g/L glicose	0,5 g/L peptona	0,095	5,25
10 g/L glicose	0,5 g/L peptona	0,025	5,22

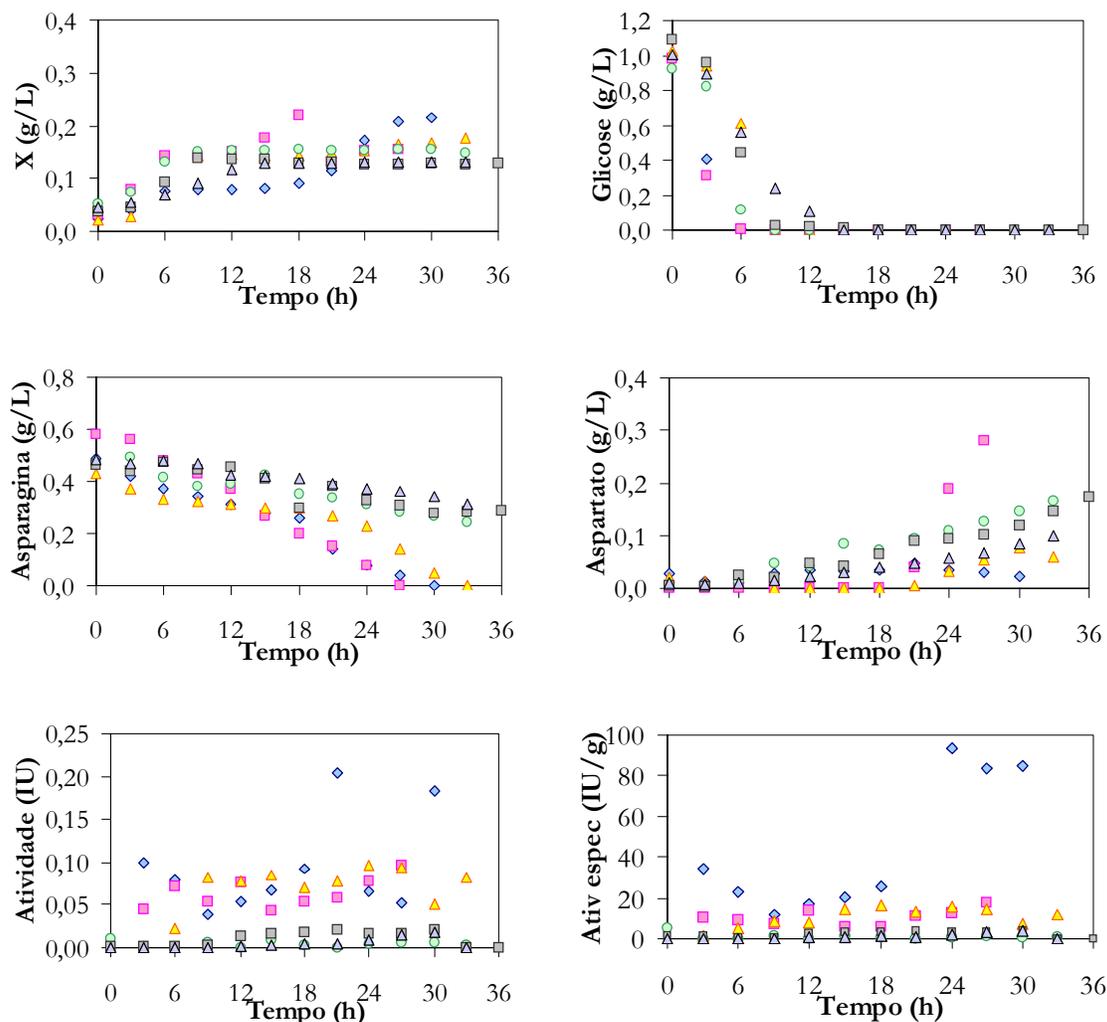


Figura 4.47 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 1,0 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (♦ ensaio realizado em 14/05/03, ■ ensaio realizado em 21/05/03, ▲ ensaio realizado em 27/05/03, ○ ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05, △ ensaio realizado em 11/10/05 com nova cultura de *Z. mobilis* CP4).

Nos experimentos executados com 1 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina ou de aspartato (Figuras 4.47 e 4.48), vê-se que o crescimento ocorre de forma semelhante em todos os experimentos enquanto há glicose no meio. Contudo, após a exaustão da glicose, nenhum crescimento é observado nos ensaios mais recentes, diferentemente dos ensaios realizados no início do projeto.

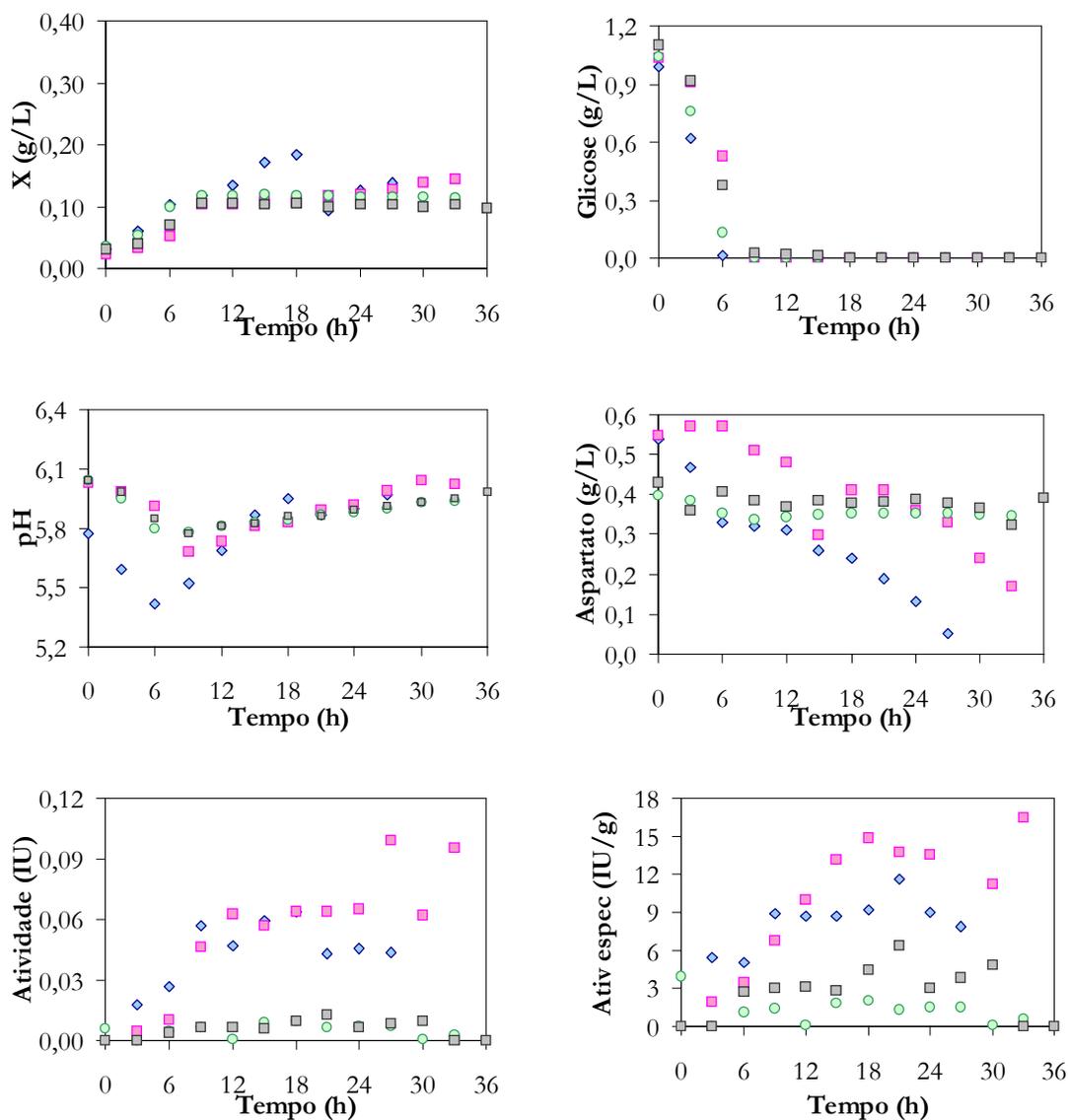


Figura 4.48 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 1,0 g/L de glicose e 0,5 g/L de aspartato (♦ ensaio realizado em 21/05/03, ■ ensaio realizado em 27/05/03, ● ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05).

Observa-se também que a fonte de nitrogênio não é consumida após a exaustão da glicose nos experimentos mais recentes. Conclui-se, portanto, que parece haver uma influência significativa das etapas de preparação do pré-inóculo e do inóculo sobre os resultados finais. Nos experimentos realizados sem padronização, cada uma das etapas teve a duração de cerca de 24 horas, enquanto que após a padronização estas etapas foram

conduzidas na taxa específica máxima de crescimento, que foi observada ao redor de 10 horas de cultivo. Esse é um ponto bastante relevante da análise aqui apresentada, que é pouco discutido na literatura.

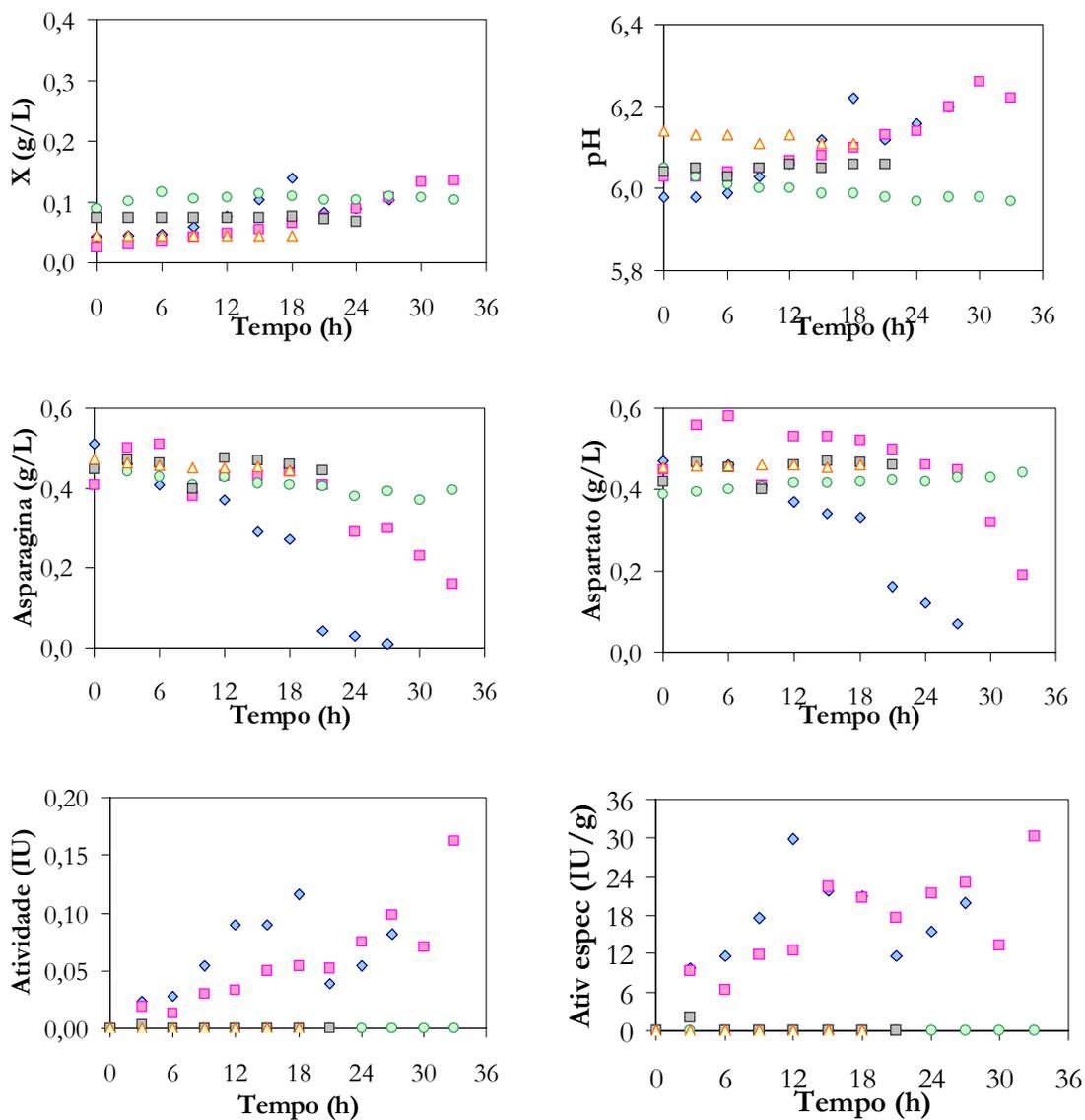


Figura 4.49 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 0,50 g/L de aspartato e 0,5 g/L de asparagina (♦ ensaio realizado em 21/05/03, ■ ensaio realizado em 27/05/03, ○ ensaio realizado em 16/06/05, □ ensaio realizado em 10/06/05, △ ensaio realizado em 11/10/05).

Nos experimentos realizados com asparagina e asparatato, diferentemente do observado nos ensaios com glicose, não houve crescimento celular, consumo das fontes de carbono e nitrogênio, formação da enzima e nem variação no pH do meio de cultivo.

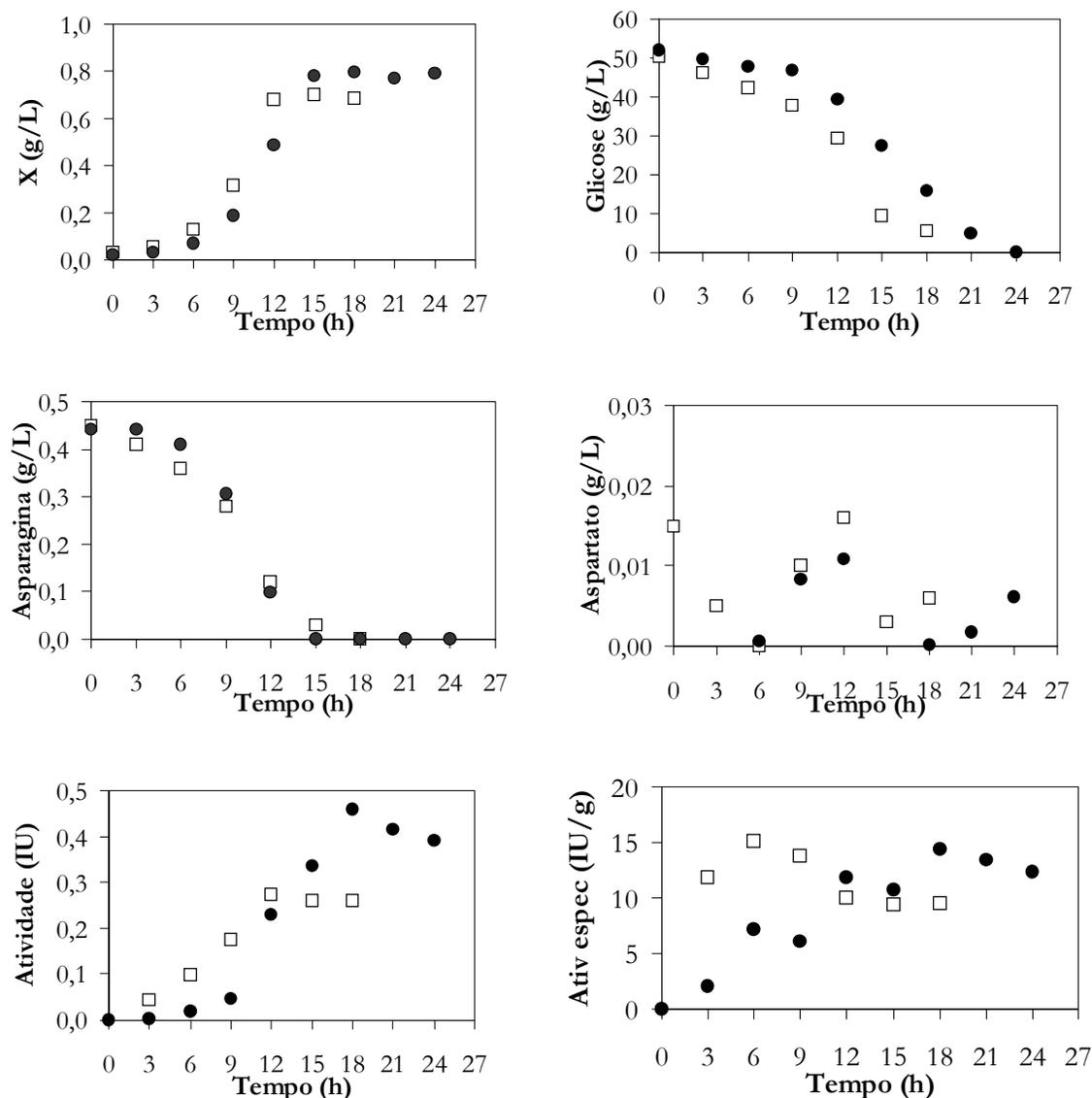


Figura 4.50 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 50 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina (□ ensaio realizado em 14/05/03 e ● ensaio realizado em 11/10/05).

No experimento conduzido com 50 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina, os perfis cinéticos observados para o crescimento celular, os consumos de glicose e de asparagina, a

atividade de asparaginase e a variação de pH do meio foram praticamente idênticos aos obtidos antes da padronização do bioprocesso. O que diferencia os ensaios é a atividade específica de asparaginase, provavelmente em função da variabilidade de volume de meio de cultivo centrifugado na análise de atividade na fermentação sem as metodologias padronizadas.

Como estes quatro experimentos adicionais, conduzidos nas melhores condições experimentais para a produção da enzima, foram realizados em paralelo, não parece razoável questionar a qualidade do inóculo nos cultivos com baixa concentração de glicose e com asparagina e aspartato. A possibilidade de que a perda de atividade observada possa estar sendo influenciada pelas células, já que a cultura foi repicada sucessivamente desde 2002 para a condução dos experimentos e para a manutenção (realizada a cada 3 meses), foi descartada após condução de experimentos com nova cultura de *Z. mobilis* CP4. Isto permite concluir que, em baixas concentrações, as etapas de pré-inóculo e inóculo em tempo elevado podem gerar algum metabólito que venha a favorecer o crescimento e, por conseguinte, a atividade de asparaginase. Esse ponto deve ser melhor investigado no futuro.

Nas concentrações consideradas como ideais para o crescimento da bactéria e produção da enzima também foi realizado um experimento com a nova cultura da bactéria. Observa-se na Figura 4.51 que, nas mesmas condições de experimento, ou seja, inoculação na taxa específica máxima de crescimento e com células centrifugadas, consegue-se uma boa reprodutibilidade analítica dos dados experimentais.

Os experimentos feitos com asparagina e peptona como fontes de nitrogênio, em alta concentração de glicose como fonte de carbono, levaram a rendimentos em enzima semelhantes. Contudo, as altas taxas de crescimento e a atividade estável após a exaustão da glicose, aliado ao fator custo, fazem com que a peptona possa ser considerada como a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento da enzima pela bactéria *Z. mobilis*.

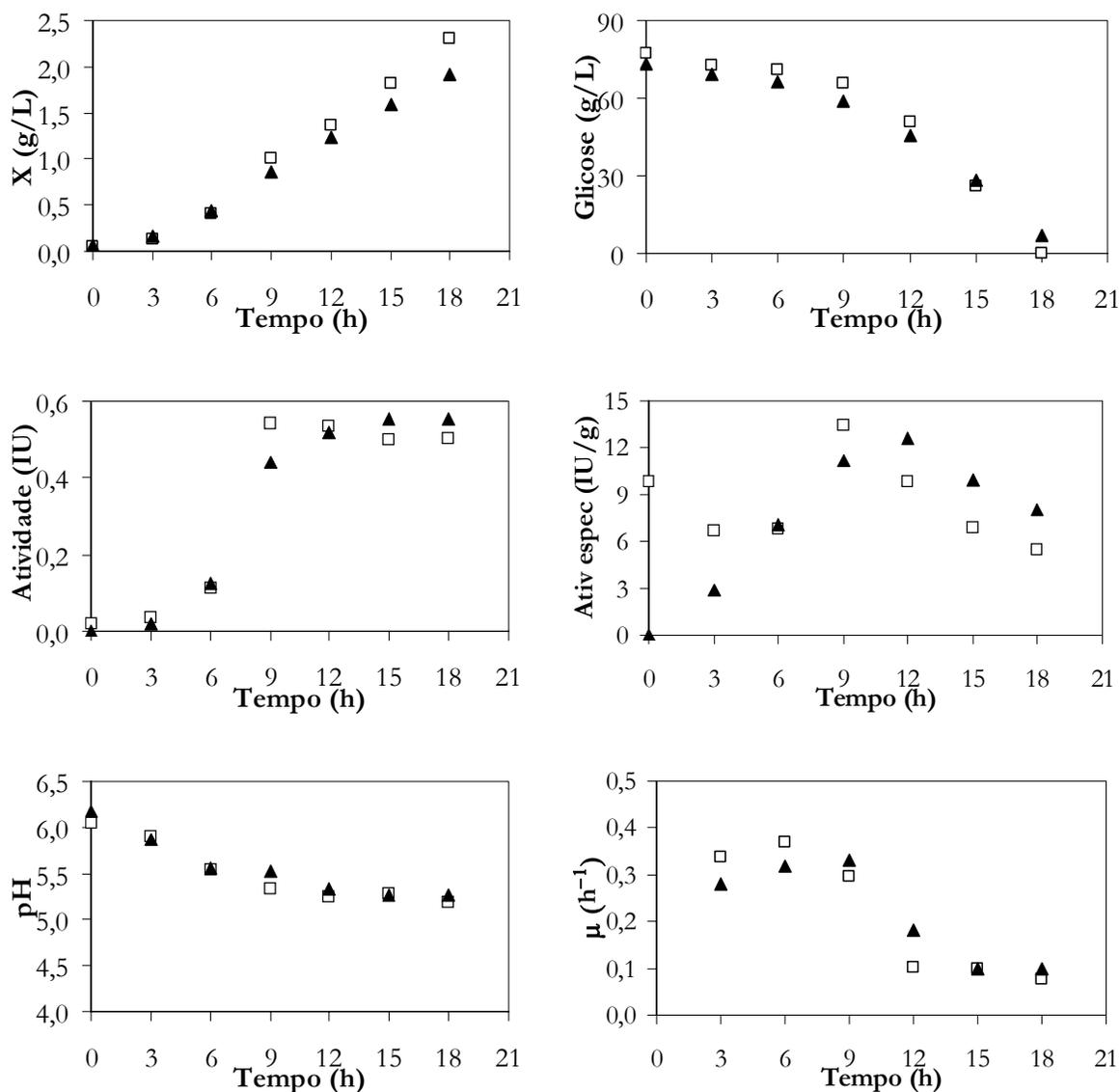


Figura 4.51 – Perfil cinético das principais variáveis nas repetições realizadas no cultivo de *Z. mobilis* com 73 g/L de aspartato e 10 g/L de peptona (□ ensaio realizado em 27/05/05, ▲ ensaio realizado em 11/10/05).

É apresentada na Figura 4.52 uma avaliação da precisão analítica da reprodutibilidade dos experimentos, antes e após todos os controles e cuidados serem efetuados. Os gráficos mostram uma significativa redução na dispersão entre as medições, corroborando a proposta que foi apresentada neste trabalho em se avaliar as causas de não reprodutibilidade de um processo fermentativo.

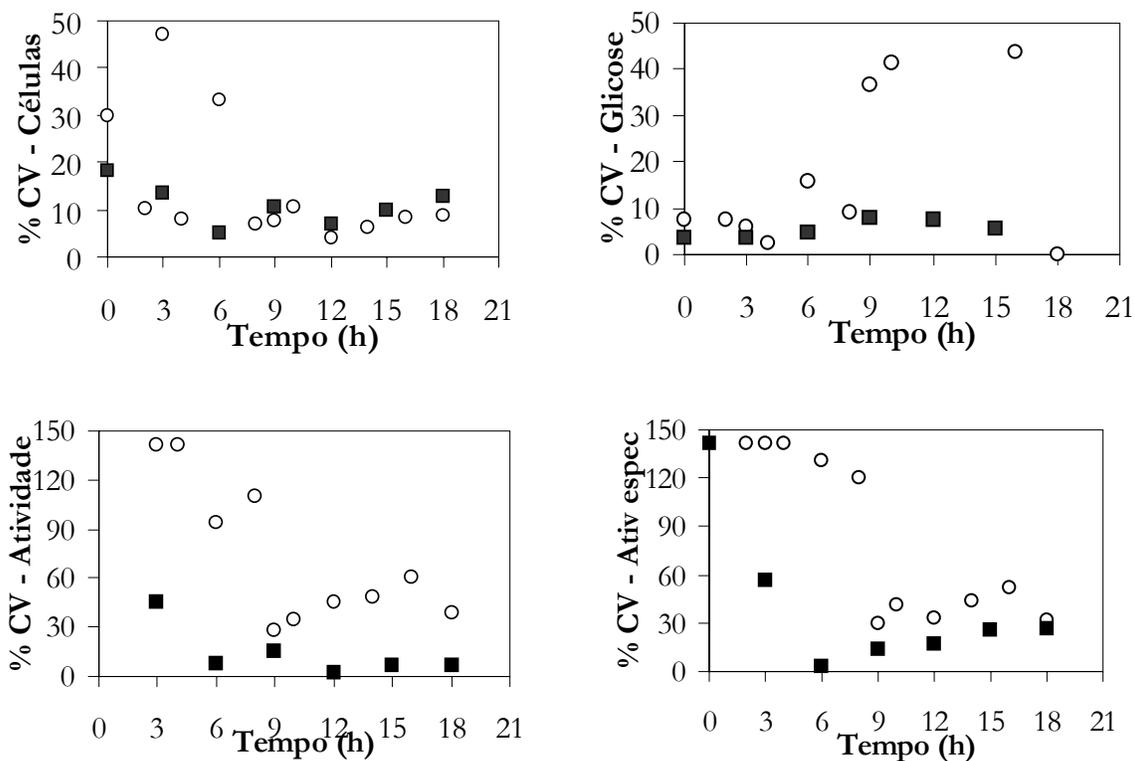


Figura 4.52 – Avaliação do coeficiente de variação da reprodutibilidade de um processo fermentativo (■ conjunto de experimentos com controle das etapas e ○ conjunto de experimentos onde não era realizado o controle das etapas).

Conclui-se, portanto, que para que se atinja uma boa reprodutibilidade em uma fermentação, a otimização e o controle de qualidade devem ser preocupações contínuas e constantes, uma vez que a resposta celular pode mudar e, com ela, as condições ótimas de operação.

4.18 – Modelagem do Comportamento Cinético de *Zymomonas mobilis*

Com a finalidade de se conhecer melhor o comportamento cinético de um microrganismo, pode-se também fazer uso da modelagem matemática, uma importante ferramenta para o planejamento ótimo e a caracterização de processos bioquímicos. O processo biotecnológico é um sistema complexo porque as reações biológicas são influenciadas pelo meio químico, nível de nutrientes e concentração do produto, assim como pelas condições físicas. O metabolismo e seus mecanismos de regulação ainda não

são completamente entendidos e as variações das condições físicas causadas pela dinâmica de fluidos e pela transferência de massa têm de ser olhadas de forma simplificada. Assim, a descrição matemática desses processos pode ser simplificada, mas ainda pode ser útil para descrever os efeitos que são de grande importância para o planejamento de processos, aumento de escala, otimização e controle automático.

Para representar o processo em estudo, um modelo cinético não-estruturado e não-segregado foi desenvolvido, utilizando o modelo de Monod como base para a montagem do modelo de taxa específica de crescimento celular. Vale salientar que não serão considerados os fenômenos de inibição por etanol e por glicose, uma vez que os experimentos foram desenvolvidos com baixas concentrações de glicose.

Com base nos resultados obtidos, o modelo cinético representativo para a taxa específica de crescimento (μ) é descrito pela equação tipo Monod, multiplicada por um termo adicional que torna a taxa específica nula quando a concentração de amônia é igual a zero.

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{k_s + S} \cdot \left(1 - \frac{1}{e^{k \cdot \text{NH}_3}}\right) \quad (4.27)$$

A taxa específica de consumo de glicose (q_s) é considerada acoplada ao crescimento celular, sendo representada pela equação a seguir:

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{XS}} \quad (4.28)$$

A taxa específica de consumo da fonte de nitrogênio (v) é considerada como sendo constituída pela equação tipo Michaelis-Menten, responsável pela remoção de nitrogênio em forma de amônia na molécula do composto nitrogenado (asparagina, peptona, sulfato de amônio, etc).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot N}{k_m + N} \quad (4.29)$$

A taxa específica de formação de amônia leva em conta sua liberação na forma de amônia do composto nitrogenado devido à ação enzimática e a sua assimilação pelas células.

$$q_{\text{NH}_3} = \alpha_1 \cdot v - \alpha_2 \cdot \mu \quad (4.30)$$

A partir dos dados dos ensaios de atividade enzimática definiu-se a taxa específica de formação de asparaginase como diretamente proporcional ao crescimento celular.

$$q_{\text{Ativ}} = Y_{\text{UX}} \cdot \mu \quad (4.31)$$

As equações de balanço de material para um sistema em batelada são descritas a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad X(0) = X_0 \quad (4.32)$$

$$\frac{dS}{dt} = -q_S \cdot X \quad S(0) = S_0 \quad (4.33)$$

$$\frac{dN}{dt} = -v \cdot X \quad \text{Aspn}(0) = \text{Aspn}_0 \quad (4.34)$$

$$\frac{d\text{Ativ}}{dt} = q_{\text{Ativ}} \cdot X \cdot V \quad \text{Ativ}(0) = \text{Ativ}_0 \quad (4.35)$$

$$\frac{d\text{NH}_3}{dt} = q_{\text{NH}_3} \cdot X \quad \text{NH}_3(0) = \text{NH}_3_0 \quad (4.36)$$

onde X é a concentração de células (g/L), S é a concentração da fonte de carbono (g/L), N é a concentração da fonte de nitrogênio (g/L), V é o volume de meio de cultivo centrifugado para análise de atividade (L), Ativ é a atividade de asparaginase (IU) e NH₃ é a

concentração de amônia formada (g/L), μ é a taxa específica de crescimento (h^{-1}), μ_{max} é a taxa específica máxima de crescimento (h^{-1}), v é a taxa específica de consumo de asparagina (h^{-1}), q_s é a taxa específica de consumo de glicose (g/g.h), q_{Ativ} é a taxa específica de formação de asparaginase (IU/g.h), q_{NH_3} é a taxa específica de formação de amônia (g/g.h), α_1 é a razão molar entre a quantidade de amônia formada e o composto nitrogenado de onde ela é consumida, α_2 é a razão molar entre amônia e as células de *Z. mobilis*, Y_{UX} é o coeficiente de rendimento de asparaginase em células (IU/g), k_m é a constante do modelo de Michaelis-Menten (g/L), k_S é a constante do modelo de Monod (g/L), k é uma constante e Y_{XS} é o coeficiente de rendimento celular em glicose (g/g)

O sistema de equações diferenciais foi integrado utilizando-se o código DASSL (Petzold, 1989). Os parâmetros cinéticos do modelo foram estimados por inspeção visual, ajustando-se os valores simulados aos dados experimentais mostrados na Figura 4.1 para o cultivo típico da bactéria *Zymomonas mobilis*. O conjunto de parâmetros mostrado na Tabela 4.50 ajustou bem à curva experimental apresentada, como pode ser observado nos perfis temporais das principais variáveis do processo ilustrados na Figura 4.53. As curvas simuladas pelo modelo (linhas) representam qualitativamente bem os dados experimentais obtidos (símbolos).

Tabela 4.50 – Valores dos parâmetros do modelo cinético para o crescimento de *Zymomonas mobilis* em meio sintético com 10 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina.

Parâmetro	Valor
μ_{max}	0,25
v_{max}	0,16
k_S	0,08
k_m	0,002
k	$1,0 \cdot 10^2$
Y_{XS}	0,036
Y_{UX}	8,4

Na Figura 4.53 observa-se a exaustão da glicose em torno de 11 horas de cultivo. Neste instante, ainda há no meio de cultivo uma pequena quantidade de asparagina, que continua sendo desaminada pela asparaginase, resultando em um acúmulo de amônia no meio, conforme mostra a simulação. A atividade enzimática apresenta um crescimento similar ao padrão apresentado pelas células. Contudo, na fase estacionária de crescimento,

os dados experimentais parecem indicar um ligeiro aumento da atividade enzimática, apesar da simulação realizada pelo modelo proposto indicar que após o término da asparagina a amônia liberada para o meio torna-se constante.

De um modo geral, o modelo matemático desenvolvido para representar a cinética da bactéria *Zymomonas mobilis* e a produção da enzima asparaginase, utilizando como fonte de nitrogênio a asparagina, representou bem os dados experimentais. Ao se variar a concentração de glicose, apenas os parâmetros Y_{XS} e Y_{US} necessitam ser ajustados para cada corrida experimental. A Tabela 4.51 mostra a variação destes parâmetros com o aumento da concentração de glicose. Após a padronização das etapas do processo, como mostrado anteriormente na Tabela 4.49, houve uma queda significativa na atividade e atividade específica de asparaginase, possível resultado das padronizações das etapas do processo e da quantidade de volume de meio a ser centrifugado para a análise de atividade. Na modelagem matemática, tal característica do processo também é observada a partir do parâmetro Y_{XS} .

Tabela 4.51 - Parâmetros cinéticos ajustados para o crescimento de *Zymomonas mobilis* frente a diferentes concentrações de glicose e asparagina como fonte de nitrogênio.

Parâmetro	Concentração de Glicose (g/L)			
	10	30	50	10 após padronização
Y_{XS} (g/g)	0,036	0,020	0,013	0,037
Y_{UX} (IU/g)	8,4	7,8	12,2	3,0

Uma vez que se padroniza o processo com peptona como fonte de nitrogênio, estudos de modelagem também são realizados nestas condições, tendo como parâmetros a serem ajustados para cada corrida experimental os rendimentos Y_{XS} e Y_{US} . A concentração da fonte de nitrogênio dos resultados apresentados na Tabela 4.52 é semelhante à concentração de asparagina analisada na Tabela 4.51.

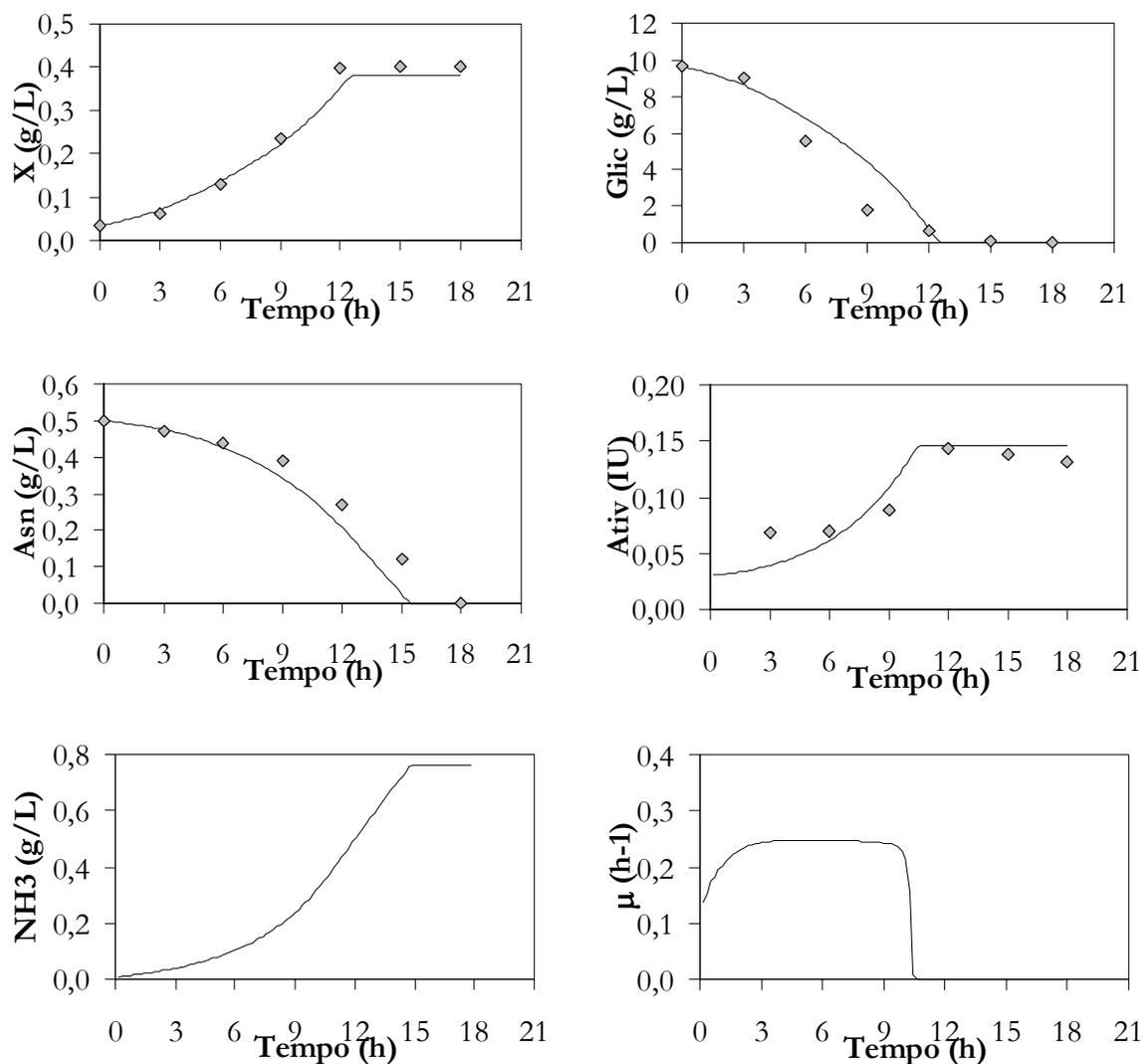


Figura 4.53 – Resultados da simulação da cultura de *Z. mobilis* utilizando 5% de inóculo em 10g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina. Os pontos se referem aos dados experimentais e a linha refere-se à simulação feita a partir do modelo proposto.

Tabela 4.52 - Parâmetros cinéticos ajustados para o crescimento de *Zymomonas mobilis* frente a diferentes concentrações de glicose e peptona como fonte de nitrogênio.

Parâmetro	Concentração de Glicose (g/L)	
	10	30
Y_{XS} (g/g)	0,040	0,028
Y_{UX} (IU/g)	4,5	6,5

Observa-se, a partir dos dados apresentados, que o modelo demonstra potencial para descrever as principais variáveis do sistema. A taxa específica de consumo de asparagina obtida a partir da cinética de Michaelis-Menten (k_m), considerada como sendo responsável pela remoção de nitrogênio em forma de amônia na molécula de asparagina, gerou um valor para esta enzima a partir dos experimentos realizados de $1,5 \cdot 10^{-5} M$, valor este próximo ao da L-asparaginase II de *Escherichia coli*, indicando que além de estar no periplasma da célula e ter afinidade pelo substrato L-asparagina, possui uma alta afinidade pelo substrato e pode ser ativa contra o crescimento do tumor.

Em função destes resultados estudos sobre diferentes técnicas de permeabilização da enzima são realizados.

4.19 – Testes de Permeabilização para Extração da Asparaginase da Bactéria *Zymomonas mobilis*

Os primeiros testes de permeabilização foram realizados em células de final de cultivo em meio definido (10 g/L de glicose e 0,5 g/L asparagina), onde a concentração de células esteve em torno de 0,4 g/L. Os testes foram realizados a partir de 40 mL de meio centrifugado, ressuspensos e lavados com NaCl 0,85%. Em cada tubo de amostra centrifugada adicionou-se CTAB, EDTA ou a mistura de ambos, suspensos em tampão fosfato de sódio. Utilizou-se 0,0017 g de CTAB e 0,0034 g de EDTA para 100 mL de tampão fosfato de sódio. A permeabilização foi realizada em banho a 37°C por 15 min, onde, em seguida, as amostras foram centrifugadas e as análises de proteína e de atividade foram efetuadas.

Além da medição da atividade nas células permeabilizadas, mediu-se também no sobrenadante. Nesta, ao invés de um volume de amostra centrifugada, já que não se tem células, utilizou-se 0,5 mL deste sobrenadante, fazendo-se com que o volume total da reação fosse 2,5 mL. A análise de proteína foi feita pelo método de Bradford. Também foi medida a atividade no meio de cultivo, sem permeabilização. Os dados estão expostos na Tabela 4.53.

Observa-se que a permeabilização das amostras, incubadas a 37°C por 15 min, não foi eficiente, não gerando atividade no sobrenadante. Apenas no sobrenadante da permeabilização com CTAB foi que se encontrou alguma atividade de asparaginase. Em

função dos resultados obtidos, novos ensaios sobre formas de extração da enzima são realizados, aumentando-se a quantidade de detergente. Também se aplicou nos novos ensaios a técnica de rompimento celular com lisozima, adicionando-se ao meio de fermentação 1 mL de uma solução 4 g/L de lisozima.

Tabela 4.53 – Testes iniciais de permeabilização em amostras de *Z. mobilis*.

Amostra	Células				Sobrenadante			Proteína (g/L)
	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Aespec (IU/g _{cel})	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	
Meio	0,180	0,066	0,132	7,82	0,000	0,000	0,000	0,07
CTAB	0,148	0,054	0,108	6,43	0,002	0,001	0,002	0,19
EDTA	0,191	0,070	0,140	8,29	0,000	0,000	0,000	0,08
CTAB + EDTA	0,138	0,051	0,101	5,99	0,000	0,000	0,000	0,07

Os resultados obtidos nas permeabilizações com células resultantes da fermentação em meio rico (10 g/L glicose e 5 g/L extrato de levedura) são mostrados na Tabela 4.54, onde se observa uma baixa atividade nos sobrenadantes de CTAB e lisozima, ainda que o sobrenadante da permeabilização com CTAB tenha extraído uma grande quantidade de proteínas.

Tabela 4.54 - Testes permeabilização com CTAB, lisozima e choque osmótico em amostras de *Z. mobilis*.

Amostra	Células				Sobrenadante				
	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Aespec (IU/g _{cel})	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Aespec (IU/g _{prot})	Proteína (g/L)
Meio	0,063	0,011	0,022	2,03	0,000	0,000	0,000	0,00	0,02
CTAB	0,067	0,012	0,024	1,62	0,002	0,004	0,001	0,01	1,61
Lisozima	0,017	0,003	0,006	0,37	0,014	0,025	0,005	0,29	0,18
Meio	0,178	0,032	0,064	3,99	0,000	0,000	0,000	0,00	
Choque osmótico	0,138	0,024	0,049	3,06	0,000	0,000	0,000	0,00	

Não se conseguiu determinar a proteína no sobrenadante do choque osmótico e a análise de atividade nas células permeabilizadas foi praticamente semelhante à das células intactas. Na permeabilização com lisozima, o que se pode notar é a atividade nas células e a no sobrenadante praticamente semelhante. Devido a baixa quantidade de proteínas no sobrenadante permeabilizado, obtém uma elevada atividade de asparaginase por grama de proteína.

Ainda que os resultados com a lisozima tenham se mostrado bastante satisfatórios, a eletroforese destas amostras não apresentou nenhuma banda próxima à amostra comercial de asparaginase, ou seja, o medicamento Elspar[®].

Novos experimentos com CTAB e lisozima foram realizados, adicionando-se com EDTA ao final da permeabilização com CTAB. Os dados de atividade e de concentração de proteína de células coletadas da fermentação em meio definido (10 g/L glicose e 0,5 g/L asparagina) estão na Tabela 4.55 e a eletroforese destas amostras se encontra na Figura 4.54. Para eletroforese destas amostras, utilizou-se 280µl de amostra e 20 µl de tampão para aplicação, injetando-se 5 µL de cada amostra.

Tabela 4.55 - Testes permeabilização com CTAB e lisozima em amostras de *Z. mobilis*.

Amostra	Células			Sobrenadante			Proteína (g/L)	
	Δ Abs	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Ativ (U)	Δ Abs	$\mu\text{mol NH}_3/\text{min}$	Ativ (U)		Aespec (IU/g _{prot})
Meio	0,301	0,1180	0,236	0,000	0,000	0,000	0,00	0,01
CTAB	0,278	0,1090	0,218	0,000	0,000	0,000	0,00	2,51
Lisozima	0,289	0,1133	0,227	0,000	0,000	0,000	0,00	0,48

Apesar dos novos experimentos possuírem atividade mais elevada, nenhuma atividade foi encontrada no sobrenadante permeabilizado.

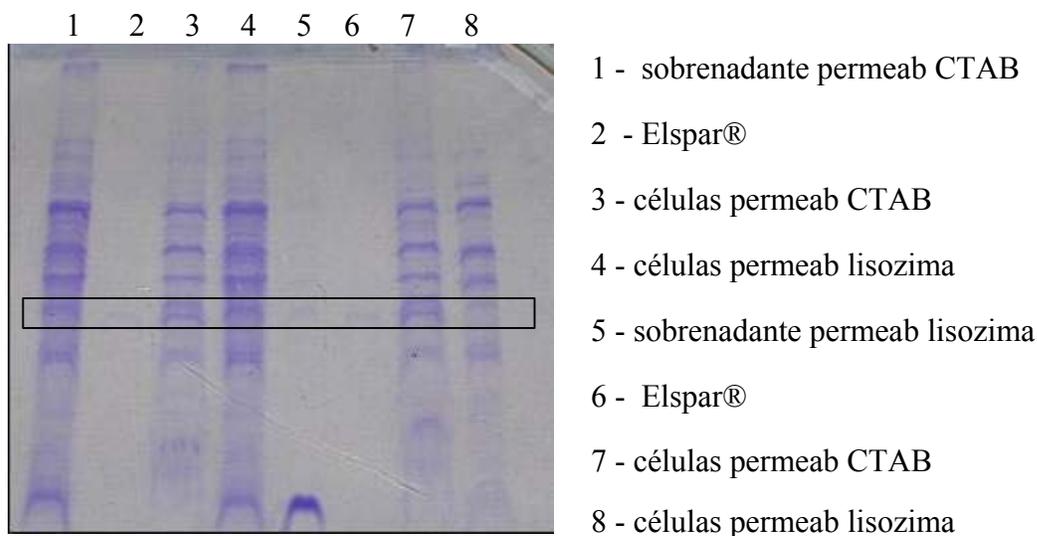


Figura 4.54 – Eletroforese de amostras de permeabilização com CTAB e liozima.

Para melhor visualização do padrão Elspar® na eletroforese, que saiu pouco nítido devido a baixa concentração de amostra, um quadro é marcado na Figura 4.54. Ainda que a atividades no sobrenante permeabilizado tenham sido nulas, observa-se que na permeabilização com CTAB tem-se uma banda na mesma linha da enzima comercial. As células permeabilizadas utilizadas na eletroforese foram colocadas em contato com o tampão de aplicação da eletroforese, centrifugadas e o seu sobrenadante injetado.

Buscou-se avaliar a influência do tampão na permeabilização com CTAB, utilizando CTAB diluído em tampão fosfato de sódio 0,1M e tampão tris-HCl, que é utilizado na análise de atividade. Em cada teste utilizou-se 0,053 g de células em 5 mL de tampão com 5% CTAB (0,47 g CTAB/g células). A atividade das células foi de 0,128 U (5,99 IU/g). Para os sobrenadantes permeabilizados, obteve-se no tampão tris atividade de 0,357 U e no tampão fosfato 0,178 U.

Para confirmar a eficiência do método de permeabilização com CTAB, novos testes com CTAB, liozima e choque osmótico foram realizados. Mediu-se atividade apenas nas células do meio de cultivo (1,4 IU/g). Entretanto, determinou-se as concentrações de proteína no sobrenadante permeabilizado (CTAB – 6,93 g/L, liozima – 2,54 g/L, choque osmético – 1,60 g/L). O valor da concentração de proteína em CTAB foi significativamente alto em todas as repetições e diluições realizadas. Apesar dos resultados para a concentração de proteínas não se repetirem, sendo muito superior aos obtidos

anteriormente, ainda se observa na Figura 4.55 que a permeabilização com CTAB é a mais eficiente.

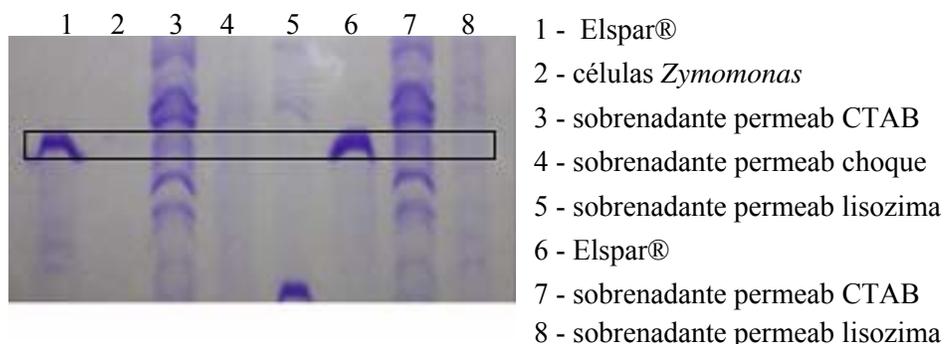


Figura 4.55 - Eletroforese de amostras de permeabilização com CTAB, choque osmótico e lisozima.

Os géis, com diferentes volumes de amostra injetados, 10 e 5 μ l, respectivamente, ainda mostram que a permeabilização com CTAB é a única que apresenta bandas próximas à do padrão Elspar®.

Com uma nova amostra do medicamento Elspar®, buscou-se padronizar a concentração de proteína a ser injetada em cada banda eletroforética. Cada frasco do medicamento contém 10000 IU asparaginase e 80 mg de manitol, com 225 U/mg de proteína. Assim, pôde-se padronizar a injeção de 5 μ l de amostra contendo de 3 a 4 μ g de proteína/banda (injeção).

Para as amostras de células permeabilizadas, fez-se a consideração de que uma amostra injetada contém 0,5 μ g de proteína e 20 bandas, chegando-se a 10 μ g de proteína total. A partir da concentração de proteína do sobrenadante, sabe-se o quanto de amostra deverá ser diluído no tampão de aplicação e aplicada.

Os novos testes de permeabilização foram aplicados em células obtidas das fermentações do planejamento experimental, com peptona e glicose, com o objetivo de avaliar a influência do pH do tampão fosfato de sódio 0,1M na permeabilização de células de *Z. mobilis* com CTAB. Para isto, utilizaram-se 2 g de células centrifugadas em 0,5% (m/v) de CTAB em tampão fosfato, perfazendo um total de 0,025 g CTAB/g células. Colocaram-se os frascos sob agitação durante 8 horas. A concentração de proteína no sobrenadante centrifugado de cada tampão foi determinada pelo método de Bradford (ph

5,0 – 2,29 g/L; pH 6,0 – 2,14 g/L; pH 7,0 – 5,86 g/L; pH 8,0 – 6,41 g/L), indicando que no pH 8,0 uma maior quantidade de proteína está sendo liberada para o meio. A eletroforese destas amostras, ilustrada na Figura 4.56, mostra claramente a melhora da permeabilização em soluções tampões com pH elevado.

Os resultados obtidos fizeram com que um novo estudo, numa faixa mais ampla de pH, fosse realizado. Neste novo experimento, as células utilizadas foram resultantes das fermentações para a otimização do planejamento experimental (73 g/L glicose com 10 g/L peptona e 32 g/L glicose com 0,5 g/L peptona). Além das permeabilizações com CTAB, um outro método foi empregado, que é a permeabilização com hexano (Geckil *et al.*, 2005). Os autores citam que o uso de compostos orgânicos, como solventes, detergentes e agentes quelantes para a liberação das enzimas periplásmicas podem ser vantajosos no que se refere ao custo do processo e causam permeabilização seletiva das barreiras da parede celular, permitindo preparação em larga escala das enzimas periplásmicas numa forma relativamente pura. No sistema em estudo, os autores descrevem o método como sendo rápido, econômico e eficiente para a liberação da asparaginase das bactérias gram-negativas *Enterobacter aerogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, conhecidas por acumular asparaginase anti-leucêmica no espaço periplasmático. No método descrito, utiliza-se um sistema de fase aquosa fosfato de potássio/hexano para a liberação seletiva da enzima. A concentração ótima do hexano, considerado o solvente mais eficiente por ser uma molécula pequena, o que faz penetrar mais eficientemente na membrana celular, resultando na desorganização suficiente da membrana para causar a liberação da asparaginase, foi de 1% (volume/volume).

Paralelamente aos testes de permeabilização efetuados, foram utilizados filtros de concentração e dessalinização de proteínas da Millipore, enriquecendo em até 80 vezes a amostra. O filtro utilizado foi o Centricon YM-30, que recupera acima de 85% amostras de diferentes pesos moleculares. O mesmo foi aplicado tanto na amostra com CTAB quanto na com hexano. Os resultados de atividade e atividade específica do sobrenadante permeabilizado, juntamente com a concentração de proteína, são apresentados na Tabela 4.56.

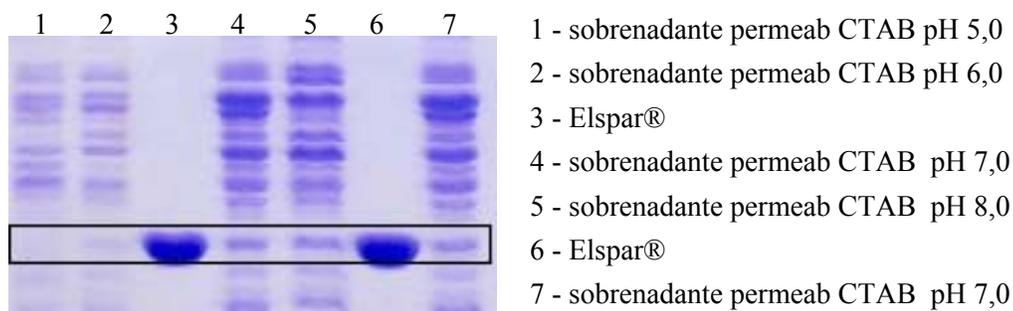


Figura 4.56 – Eletroforese da permeabilização com CTAB em diferentes faixas de pH da solução tampão.

De um modo geral, entre a utilização do método mecânico (sonicação), utilização da lizozima, de um detergente como o CTAB, de um agente quelante e do choque osmótico e de um solvente orgânico apolar, a permeabilização com CTAB ainda se mantém como a mais eficiente (atividade no sobrenadante), com grande quantidade de proteína liberada.

Tabela 4.56 – Valores de proteína, atividade e atividade específica no sobrenadante permeabilizado.

Amostra	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Proteína (g/L)	A espec (IU/g _{prot})
pH 5	0,068	0,011	0,011	3,46	0,32
pH 6	0,018	0,003	0,003	3,62	0,08
pH 7	0,097	0,016	0,016	4,10	0,39
pH 8	0,062	0,010	0,010	4,57	0,22
pH 8,6	0,063	0,010	0,010	5,28	0,19
pH 9	0,080	0,013	0,013	5,99	0,22
Hexano tampão fosfato pH 8,6	0,019	0,003	0,003	2,46	0,12
Hexano tampão tris-HCl pH 8,6	0,053	0,009	0,009	1,78	0,51
pH 9 YM-30	0,132	0,022	0,022	9,37	0,23
Hexano tampão fosfato pH 8,6 YM-30	0,040	0,007	0,007	3,48	0,20

Para avaliar se o tempo de permeabilização com CTAB em pH 9,0 é elevado, levando ao rompimento celular, novos experimentos são realizados, retirando alíquotas em 15 min, 1 hora, 3 horas, 6 horas, 9 horas e 24 horas. Em 6 horas, também se utilizou o o

filtro Centricon YM-30 para concentrar as proteínas do sobrenadante. Os resultados de atividade e de proteína estão dispostos na Tabela 4.57.

Tabela 4.57 - Valores da concentração de proteína, atividade e atividade específica no sobrenadante em diferentes tempos de permeabilização com CTAB em tampão fosfato a pH 9,0.

Amostra	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Proteína (g/L)	A espec (IU/g)
15 min	0,145	0,023	0,023	2,52	0,91
1 hora	0,007	0,001	0,001	3,24	0,03
3 horas	0,013	0,002	0,002	2,89	0,07
6 horas	0,000	0,000	0,000	2,32	0,00
6 horas YM-30	0,030	0,005	0,005	4,43	0,11
9 horas	0,000	0,000	0,000	2,86	0,00
24 horas	0,027	0,004	0,004	2,96	0,13

O que se observa é que para a liberação da enzima asparaginase são necessários apenas 15 minutos de contato com o detergente, uma vez que neste tempo são geradas uma atividade elevada e uma boa quantidade de proteínas.

Tabela 4.58 – Influência do tipo de tampão fosfato na permeabilização das células de *Z. mobilis*.

Tampão Fosfato	Amostra	Δ Abs	μ mol NH ₃ /min	Ativ (IU)	Proteína (g/L)	A espec (IU/g proteína)
Sódio	Células	0,004	0,0028	0,003	0,91	0,33
	Hexano	0,008	0,0056	0,006	1,62	0,37
	CTAB	0,018	0,0127	0,013	3,19	0,41
Potássio	Células	0,012	0,0085	0,008	1,14	0,70
	Hexano	0,014	0,0099	0,010	1,10	0,91
	CTAB	0,020	0,0141	0,014	1,94	0,72

Com este tempo de permeabilização definido, avaliou-se, entre os tampões fosfato de sódio e fosfato de potássio, qual tem maior influência na permeabilização com CTAB e

com hexano, além de se avaliar apenas o tampão em contato com as células. Os dados obtidos encontram-se na Tabela 4.58 e a eletroforese na Figura 4.57.

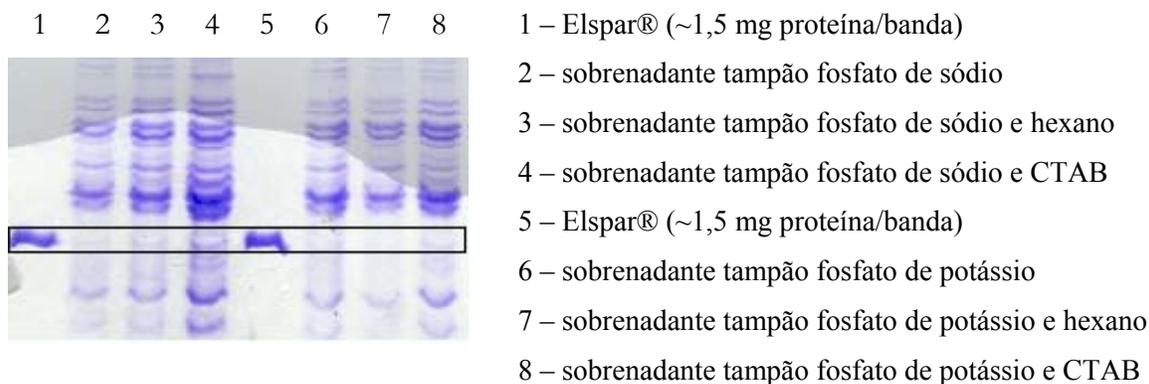


Figura 4.57 - Eletroforese da permeabilização com CTAB e hexano em tampão fosfato de sódio e fosfato de potássio 0,05M e pH 8 .

Os dados mostram atividade no tampão puro e, na eletroforese, a liberação de várias proteínas no hexano, divergindo do trabalho que menciona a liberação da asparaginase praticamente pura, além do fato de ter a vantagem de o solvente orgânico ser mais barato e poder ser eliminado por simples evaporação. O que se tem, apesar de atividade de asparaginase inferior à permeabilização com CTAB, é uma elevada atividade específica por massa de proteínas nas amostras com hexano, com o tampão fosfato de potássio sendo o melhor tampão para a liberação das proteínas.

Um outro fato a ser observado é que a permeabilização com CTAB mostra a banda da asparaginase um pouco mais evidente em tampão fosfato de sódio, ainda que os dados de atividade tenham sido mais elevados para a permeabilização em fosfato de potássio.

Por se ter obtido bandas mais nítidas no tampão fosfato de sódio, além de atividade apenas no contato do tampão com as células, um novo teste de permeabilização com CTAB foi realizado. Para este estudo, as células utilizadas foram obtidas da fermentação com 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona. Em um dos sistemas, fez-se a permeabilização com CTAB em tampão fosfato (CTAB). No outro, a permeabilização foi realizada em duas etapas, onde a primeira aconteceu apenas com tampão, centrifugando e armazenando o sobrenadante (tampão), e a segunda foi realizada adicionando-se às células centrifugadas

CTAB diluído em tampão fosfato (tampão/CTAB). O objetivo era o de verificar se num primeiro contato com tampão poderiam ser eliminadas outras proteínas, permitindo que na segunda etapa uma maior quantidade da enzima de interesse fosse liberada. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 4.59 e na Figura 4.58, em duas corridas do gel. Também foi realizada a concentração de proteínas do sobrenadante permeabilizado com CTAB, utilizando o Centricon YM-30.

Tabela 4.59 – Influência de uma etapa inicial de contato das células com tampão fosfato de sódio na permeabilização com CTAB.

Amostra	ΔAbs	μmol NH₃/min	Ativ (IU)	Proteína (g/L)	A espec (U/mg proteína)
Tampão	0,002	0,0010	0,001	0,20	0,052
CTAB	0,008	0,0050	0,005	3,62	0,014
Tampão/CTAB	0,014	0,0087	0,009	4,22	0,021
CTAB YM-30	0,012	0,0074	0,007	4,38	0,017
Tampão/CTAB YM-30	0,025	0,0148	0,015	5,86	0,025

O processo de permeabilização em duas etapas mostrou ser mais eficiente, resultando numa maior atividade e atividade específica cerca de 30% superior.

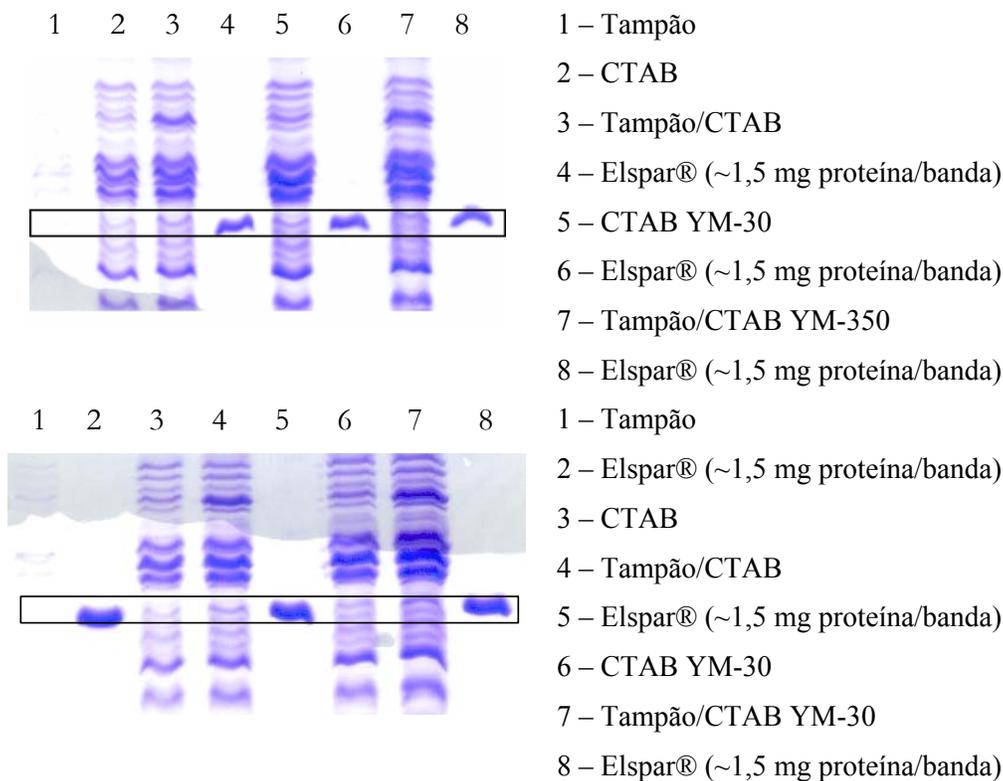


Figura 4.58 - Eletroforese da permeabilização com CTAB em tampão fosfato de sódio.

As eletroforeses em gel SDS-PAGE confirmam os resultados obtidos. As técnicas de empregadas ainda não possibilitam a separação e caracterização da enzima asparaginase, uma vez que muitas outras proteínas também se encontram no periplasma da célula, necessitando, com isso, o emprego de técnicas cromatográficas. Contudo, uma etapa anterior de lavagem mostra o favorecimento na liberação da enzima asparaginase, indicando que otimizações desta técnica, aliada a uma técnica cromatográfica, como a troca iônica, permitam a separação e purificação desta enzima.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este trabalho tem como principal objetivo estabelecer um protocolo de qualidade que possa ser aplicado a Bioprocessos, através da investigação da influência das condições de operação sobre as principais variáveis do processo biotecnológico e sobre os erros. Foi empregado como processo modelo a produção da enzima asparaginase pela bactéria *Z. mobilis*. Buscou-se, simultaneamente, a maximização da produção da enzima, avaliando-se as melhores fontes de carbono e nitrogênio durante o cultivo fermentativo, e a identificação da melhor técnica para liberação da enzima asparaginase, que está localizada no periplasma da célula.

Os estudos realizados mostraram que a enzima é constitutiva, sendo produzida tanto em meio rico quanto em meio mínimo, contendo como fonte de nitrogênio aminoácidos ou sais inorgânicos nitrogenados. Os experimentos iniciais realizados com 1 g/L de glicose e 0,5 g/L de asparagina, sem controle dos tempos de preparação do pré-inóculo e do inóculo, mostraram que, após o término da glicose, a bactéria é capaz de utilizar o aspartato e a asparagina residual como fonte de carbono e nitrogênio, continuando a gerar a enzima asparaginase. Nessa mesma condição, os ensaios realizados somente com asparagina e aspartato mostraram que, apesar de um crescimento mais lento em relação aos experimentos conduzidos com glicose, o rendimento de células em enzima e a conversão de substrato em enzima são muito superiores.

Os cultivos com agitação em incubador rotativo a 200 rpm mostraram que a agitação não é importante nem para o crescimento nem para a síntese da enzima asparaginase.

Os experimentos visando o entendimento do mecanismo de síntese da enzima, a partir da investigação sobre as melhores fontes de carbono e nitrogênio, mostraram que a glicose é a melhor fonte de carbono para a bactéria e, como fonte de nitrogênio, a peptona permite uma produção de enzima superior ao uso de aminoácidos como fonte de nitrogênio. O incremento de L-asparagina à peptona não levou a um aumento significativo de produção da enzima.

Os estudos de otimização das concentrações de glicose e peptona para incrementar a síntese da enzima, conduzindo a uma produtividade de asparaginase elevada, indicaram 73 g/L de glicose e 10 g/L de peptona como a melhor condição para execução dos ensaios.

Este trabalho apresenta um estudo sistemático que visa determinar as condições que levam a uma não repetitividade analítica e que podem tornar um bioprocessamento não reprodutível. Avaliaram-se os desvios e a precisão de equipamentos e instrumentos de análise, a repetitividade das análises ao longo de um cultivo e a reprodutibilidade do processo fermentativo. Esse tipo de estudo é importante para avaliar a confiabilidade das técnicas analíticas empregadas e levantar as causas de dispersão no processo fermentativo.

Nos experimentos conduzidos com baixas concentrações de glicose e asparagina ou aspartato como fonte de nitrogênio, a padronização das etapas de inoculação na taxa específica máxima de crescimento, geraram resultados diferentes dos obtidos nos estudos iniciais, realizados sem padronização. Em altas concentrações de glicose, contudo, pôde-se obter a reprodutibilidade de experimentos tanto com asparagina quanto com peptona como fonte de nitrogênio. Os resultados indicam que as diferenças não podem ser creditadas a mudanças celulares e devem-se, provavelmente, ao preparo do pré-inóculo e do inóculo.

Os cuidados com a otimização do inóculo, produzidos com a mesma massa de células e na taxa específica máxima de crescimento, possibilitaram obter perfis de crescimento, consumo de substrato e formação da enzima bastante reprodutíveis. Todavia, cuidados com a manutenção do microrganismo, quanto a sua condição e viabilidade celular devem ser constantes, havendo sempre o estoque da célula matriz (célula-mãe) e repique da mesma, como uma forma de manutenção celular e controle de mutações que porventura possam ocorrer com o microrganismo em estudo.

O modelo proposto conseguiu reproduzir as condições experimentais e o baixo valor da constante cinética de Michaelis-Menten obtido indica que a bactéria *Z. mobilis* produz a enzima asparaginase do tipo II, com alta afinidade pelo substrato asparagina.

Os experimentos de permeabilização e eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE mostraram que a enzima está localizada no periplasma da célula. Contudo,

muitas outras proteínas são liberadas, juntamente com a asparaginase. Além disso, a asparaginase está presente em pequenas quantidades. Desta forma, sugere-se estudar a melhor forma de permeabilização da enzima e os aspectos relacionados à comprovação de ação antilinfoma. Cita-se, por exemplo:

- Investigar a melhor condição de permeabilização da enzima, visando a otimização das técnicas de extração e separação da enzima para a obtenção da L-asparaginase pura;
- Realizar testes de ação antilinfoma da enzima purificada, avaliando sua atividade, toxicidade, estabilidade e imunogenicidade de uso;
- Caracterização da cinética enzimática da L-asparaginase de *Z. mobilis*;
- Aplicar técnicas de biologia molecular visando um aumento da expressão da enzima L-asparaginase.

A elaboração de um protocolo de qualidade, proposto neste trabalho, permite uma abordagem simplificada das Ferramentas da Qualidade, visando a implantação de uma gestão voltada para a qualidade dentro de um laboratório de ensaios químicos, enfocando características como higiene e segurança no laboratório, a limpeza, ajuste, manutenção e instruções de uso dos equipamentos, preparo de soluções, manutenção e identificação dos microrganismos, cuidados ao longo de um processo de fermentação para que se atinja a repetitividade e reprodutibilidade (qualidade e confiabilidade), armazenamento, registro de dados (controle e monitoramento) e controle estatístico, sem que seja necessária a certificação do mesmo. Com isso, sugere-se tornar o Protocolo de Qualidade um modelo a ser seguido em um Laboratório como um todo para a garantia e confiabilidade dos resultados.

CAPÍTULO 6 – PROTOCOLO DE QUALIDADE

A preocupação com a qualidade na atividade produtiva é um aspecto inerente ao ser humano, que busca aperfeiçoar, desenvolver e superar limites a fim de atender às necessidades implícitas e explícitas. Ao mesmo tempo, a globalização da economia e a conseqüente formação de blocos econômicos têm gerado barreiras técnicas e comerciais para a aceitação de produtos estrangeiros. O Brasil tem se esforçado para vencer estas barreiras a partir da certificação pelas normas da série ISO 9000 e dos resultados emitidos por laboratórios credenciados, o mais alto reconhecimento oficial de competência de um laboratório em executar calibrações ou ensaios específicos (INMETRO, 2000), uma vez que a confiabilidade dos resultados é um pré-requisito de qualidade. Dentro deste contexto, as atividades de ensaios químicos desempenham um papel muito importante na garantia da qualidade destes produtos, beneficiando empresas e usuários que operam nesses mercados, eliminando, por exemplo, barreiras técnicas ao comércio, reduzindo custos e eliminando a necessidade de duplicar ensaios em produtos por importadores e exportadores (Linhares, 2000).

O controle de qualidade foi inicialmente exercido na forma de inspeção de produtos finais. Os gráficos de controle e amostragem estatística surgiram nas décadas de 30 e 40, conforme os estudos de Dodge e Roming. Na década de 60 foi construído o conceito de Controle Total de Qualidade onde, a partir de ações regulatórias denominadas Boas Práticas de Fabricação, ficou explícito que a qualidade de um produto deve ser construída durante todo o processo de fabricação e não apenas na sua inspeção final. Além disso, houve a introdução de ferramentas auxiliares de análise ao longo dos tempos, como os 5S e o diagrama de Ishikawa ou de causa-efeito, em que aspectos de motivação, gerenciamento, materiais, métodos, máquinas e *manpower* (instrução, habilidade, treinamento, disponibilidade) são exaustivamente investigados no sentido da solução de problemas (Pinto *et al.*, 2000). O diagrama de Pareto e o ciclo do PDCA são outras ferramentas interessantes no sentido de promover a melhoria contínua da Qualidade.

Na década de 70 surgiu a filosofia de trabalho denominada Garantia da Qualidade, que consiste na atividade de prover, em toda a amplitude, a evidência necessária para estabelecer confiabilidade de que a função qualidade está sendo adequadamente efetuada. Em 1987 surgiu na Suíça o sistema ISO 9000 (International

Standard Organization), respaldado em normas internacionais e com influência extremamente forte sobre bens e serviços devido ao impacto econômico, seja no mercado interno ou mais intensamente no de exportações, bem como pela tendência universal de formação de mercados fechados que as empregam como mecanismo protecionista.

Implantar um processo de qualidade significa mudar a forma de atuação das pessoas. A Política da Qualidade expressa o comprometimento da organização com o processo de qualidade. Esse movimento tem feito com que muitos laboratórios travem uma verdadeira corrida em busca do credenciamento em gestão da qualidade (Sistema da Qualidade). Contudo, isto não se deve apenas à aplicação das normas ISO 9000, por constituir procedimentos padronizados, mas a uma visão geral de princípios que permitam uma gestão da qualidade, formando uma base sólida para o crescimento e desenvolvimento do laboratório. Dentro deste modelo, pode-se fazer uso dos Ciclos PDCA (plan [planejar] - do [fazer] - check [checar] - act [agir]) e SDCA (standard [padronizar] - do [fazer/treinar] - check [checar] - act [agir]) como ferramentas valiosas, ajudando no planejamento para a melhoria contínua e gestão dos procedimentos estabelecidos. O Programa “5S” vem sendo usado como o início da implantação de Sistemas da Qualidade, com o intuito de evitar o desperdício, racionalizar e organizar as atividades produtivas, tornando o ambiente propício à mudança.

De acordo com Dias (1995), todo laboratório, como uma unidade produtiva para crescer, trazer benefícios para a sociedade, oferecer serviços de qualidade e satisfazer seus clientes, deve focar sua atenção numa gestão que atenda a princípios fundamentais de qualidade. Isso significa apresentar qualidade no atendimento, qualidade no serviço e qualidade na entrega dos resultados. O credenciamento na norma ISO/IEC 17025 fornece requisitos para o gerenciamento da qualidade e também requisitos técnicos para a adequada operação do laboratório.

De um modo geral, os pilares para o desenvolvimento e implantação do sistema da qualidade são mostrados na Figura 6.1. Uma das primeiras importantes atividades é a definição clara da estrutura da organização e do laboratório, que inclui tipos de ensaios e calibrações, ambientes, equipamentos, pessoal, métodos e técnicas utilizadas, possibilitando estabelecer as características principais do laboratório.

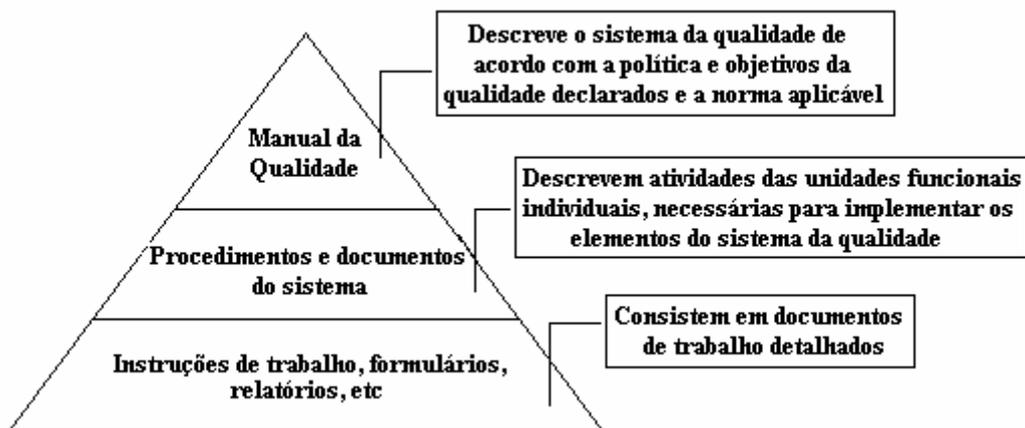


Figura 6.1 – Hierarquia de documentos do sistema da qualidade

Assim sendo, um sistema da qualidade que acompanha o ciclo da qualidade de um processo bioquímico deve referendar os seguintes elementos;

- política e organização do sistema da qualidade
- qualidade em recursos humanos e administração
- qualidade no preparo
- qualidade no processo
- qualidade no tratamento de dados/resultados

O objetivo deste protocolo é reunir, num só texto, para divulgação aos profissionais com interesse no assunto, uma abordagem simplificada das Ferramentas da Qualidade, visando a implantação de uma gestão voltada para a qualidade dentro de um laboratório de ensaios químicos, sem que seja necessária a certificação do mesmo. Muitas das informações aqui reunidas podem ser encontradas na literatura, dispersas em várias publicações, muitas das quais num jargão pouco familiar.

Ter-se-á como exemplo a estrutura do laboratório de Bioprocessos do Programa de Engenharia Química da COPPE, enfocando características como higiene e segurança no laboratório, a limpeza, ajuste, manutenção e instruções de uso dos equipamentos, preparo de soluções, manutenção e identificação dos microrganismos, cuidados ao longo de um processo fermentativo para que se atinja a repetitividade e reprodutibilidade (qualidade e confiabilidade), armazenamento, registro de dados (controle e monitoramento) e controle estatístico.

Marques e Cabral (2000) dizem que desperdício é todo e qualquer recurso que se gasta na execução de um produto ou serviço além do estritamente necessário (matéria-prima, materiais, tempo, dinheiro, energia, etc.). Com o intuito de evitar o desperdício,

racionalizar e organizar as atividades produtivas, o Programa “5S” vem sendo aplicado como o início da implantação de programas de qualidade, visando tornar o ambiente propício à mudança, ou seja, é o que poderia ser chamado de uma “faxina geral”.

Dentro de um laboratório químico esse tipo de programa funciona muito bem e é fácil de ser aplicado, porque a necessidade de organização geralmente já é um fator inerente à atividade. Dentre os diversos resultados obtidos com a sua implantação, citam-se: melhoria da qualidade e produtividade; melhoria da moral no ambiente de trabalho e redução do índice de acidentes.

O programa 5S consolidou-se no Japão a partir da década de 50, e no Brasil o programa foi lançado formalmente em 1991. Seu nome provém de palavras, que em japonês começam com “S”: seiri, seiton, seisou, seiketsu e shitsuke.

Os 5S no Brasil foram interpretados como sentidos não por manter o nome original do programa, mas porque refletem melhor a idéia da mudança de comportamento. Na Tabela 6.1 podemos encontrar os termos em japonês e sua respectiva interpretação para o português.

Tabela 6.1 – Interpretação em português para os “5S”

	Japonês	Português
1 ^o	Seiri	senso de utilização
2 ^o	Seiton	senso de organização
3 ^o	Seisou	senso de limpeza
4 ^o	Seiketsu	senso de conservação
5 ^o	Shitsuke	senso de autodisciplina

Ter senso de utilização é identificar materiais, equipamentos, ferramentas, utensílios, informações e dados necessários e desnecessários, descartando ou dando devido destino àquilo considerado desnecessário ao exercício das atividades do laboratório. Além disto, este senso pressupõe que, além de identificar os excessos e/ou desperdícios, estejamos também preocupados em identificar o porquê dos desperdícios, de modo que medidas preventivas possam ser adotadas para evitar que o acúmulo destes excessos volte a ocorrer.

Ter senso de organização é definir local apropriado e critérios para estocar, guardar ou dispor materiais, equipamentos, ferramentas, utensílios, informações e dados, de modo a facilitar o seu uso e manuseio, facilitar a procura, a localização e a guarda de qualquer item.

Ter senso de limpeza refere-se à limpeza que as pessoas devem dispensar a sua própria área de trabalho e, sobretudo, à conscientização de mantê-la limpa e de tentar não sujar. Um fator importante deste senso é que, ao procurar manter limpo um equipamento, estamos cuidando também de sua manutenção.

Senso de conservação refere-se à preocupação com sua própria saúde nos níveis físico, mental, e emocional, garantindo um ambiente não agressivo e livre de agentes poluentes, boas condições sanitárias nas áreas comuns (lavatórios, banheiros, cozinha, restaurante, etc.) e cuidados para que as informações e comunicados sejam claros, de fácil leitura e compreensão. Além de se praticar os três primeiros sentidos como forma de melhorar o ambiente físico de trabalho e, conseqüentemente, mantê-lo saudável, a pessoa deverá se preocupar com outros fatores que possam afetar sua saúde como o stress, por exemplo.

Ter senso de autodisciplina é desenvolver o hábito de observar e seguir normas, regras, procedimentos, atender especificações, sejam elas escritas ou informais. Este hábito é o resultado do exercício da força mental, moral e física. O contínuo desenvolvimento da autodisciplina promove o crescimento do ser humano em iniciativa, criatividade e respeito.

Os cinco sentidos constituem um sistema, não podendo ser discutido isoladamente. Com o 5S prepara-se um ambiente propício à implantação de um programa de qualidade e produtividade. Sua prática tem produzido conseqüências visíveis no aumento da auto-estima, no respeito ao semelhante, no respeito ao meio ambiente e no crescimento pessoal.

Outra importante filosofia utilizada em Qualidade são as Boas Práticas de Laboratório (BPL), onde estão os cuidados com o fluxo de reagentes e soluções, como o acondicionamento e validade das mesmas, utilizadas ao longo do processo, de forma a minimizar a probabilidade de erros na formulação de um experimento, contaminação cruzada ou mesmo inversão de componentes. Todos os procedimentos – limpeza, técnicas de amostragem, critérios para armazenamento, calibração e ajuste de equipamentos e materiais, métodos analíticos, instruções de uso de equipamentos – devem ser escritos a fim de seus procedimentos serem facilmente seguidos por um analista. As BPL têm por objetivo promover a qualidade e a validação dos dados dos ensaios.

A amostragem, processo de retirada de uma quantidade apropriada de uma população ou porção adequada de material, tem a finalidade de determinar as

características do material a ser analisado. Atinge seu objetivo quando certos cuidados forem intrínsecos à própria técnica.

As medições, por sua vez, são importantes para se tomar decisões com base em fatos. Para isto, todo o laboratório precisa ter confiabilidade metrológica, ou seja, equipamentos adequados e aferidos e conhecimento prévio da margem de erro dos resultados informados (desvio padrão). Com isto, cada analista no laboratório consegue assegurar medições eficazes e eficientes, coletando e validando os dados. A principal idéia é a de que há muitas fontes de incerteza para uma medida (erro da amostragem, influência do método, variabilidade de tempo, aproximações e suposições incorporadas ao método e ao procedimento de medição) e que todos os componentes da incerteza contribuem para a dispersão da distribuição da incerteza, ou seja, a distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à concentração verdadeira de um analito.

A metodologia analítica aplicada num processo também é responsável pela qualidade do produto. Os mesmos devem ser sensíveis e específicos, a fim de atender às exigências de precisão e exatidão.

O ponto de partida para a medida da variação é a média aritmética dos dados. De uma forma geral, pode ser definida como o total das observações dividido pelo número das observações. A média de uma população é indicada por μ , enquanto a média de uma amostra é indicada por \bar{X} . Em química, o número de 10 determinações é bem aceito e fornece uma boa visão estatística.

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (6.1)$$

onde o símbolo \sum tem n sobre si e $i = 1$ para indicar que todos os números como X_i devem ser somados, começando com $i = 1$ e terminando com $i = n$. O símbolo X_i simboliza o valor amostral i -ésimo, onde i é qualquer inteiro de 1 a n (Leite, 1996).

A intenção em se medir o desvio é buscar uma quantidade que meça a amplitude de variação em torno da média de um conjunto de medidas. A amplitude é a diferença matemática entre o maior e o menor valor de um grupo de dados. O desvio padrão é a raiz positiva da variância. Para uma população é representado por σ , enquanto o desvio padrão amostral é representado por S .

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (6.2)$$

O desvio padrão deve ser utilizado para:

- cálculo do erro envolvido em métodos de análise
- comparação de métodos analíticos
- estabelecimento de especificações
- cálculo do erro envolvido num processo
- comparação de processos

O coeficiente de variação (CV), também chamado de desvio padrão relativo, é uma medida estimativa da precisão do método, expressando a relação percentual do desvio padrão com a média dos valores obtidos.

$$CV(\%) = \frac{100.S}{\bar{X}} \quad (6.3)$$

Para ter um significado quantitativo ao tamanho do desvio padrão, considera-se que o intervalo:

$X \pm S$	engloba cerca de 68% da população
$X \pm 2.S$	engloba cerca de 95% da população
$X \pm 3.S$	engloba cerca de 99,75% da população

A monitoração da qualidade deve ser realizada a partir da aplicação de métodos estatísticos em todos os estágios do processo. Métodos estatísticos de investigação baseados na teoria da probabilidade podem ser usados na estimativa de parâmetros, para fazer testes de significância, determinar o relacionamento entre fatores e tomar decisões objetivas com base na evidência experimental. Todavia, a seleção de um método apropriado depende essencialmente do tipo de medida, da técnica de amostragem e do planejamento do experimento. Os procedimentos aplicados no controle estatístico têm o objetivo de definir se a fonte da maior variação observada é devido à variação aleatória, que é inevitável durante o processo de fabricação, ou a causas identificáveis, que podem usualmente ser detectadas e corrigidas por métodos apropriados.

A repetitividade do método analítico é a concordância entre resultados de medições repetidas, dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. É verificada por, no mínimo, 10 determinações. A reprodutibilidade é a concordância entre resultados obtidos em condições modificadas ou diferentes.

Os gráficos de controle podem ser utilizados como instrumento auxiliar no controle e análise de parâmetros físicos, químicos ou biológicos de um produto. Qualquer medida que possa formar a base de aceitação ou rejeição de um produto permite acompanhamento com um gráfico. Ele é realizado colocando-se na abscissa o número das amostras analisadas e na ordenada o valor da variável medida. Na escala vertical há três valores importantes, pelos quais são traçadas as linhas horizontais da média e dos limites inferior e superior de controle. O gráfico fica dividido em duas zonas: a zona I, interior aos limites de controle (ex: $X \pm 2.S$) e correspondente à faixa de normalidade ou de controle; a zona II, exterior aos limites de controle e correspondente à faixa de anormalidade ou falta de controle.

Entre as várias ferramentas do controle estatístico de qualidade estão os testes de significância, nomeadamente o teste F e o teste t . Estes testes são utilizados para verificar se existe diferença significativa entre dois grupos independentes de dados. O teste F compara a variação (dispersão) de dois grupos de dados, ao passo que o teste t compara os valores médios desses dois grupos de dados. Calculam-se os valores para F e t e comparam-se os resultados com o valor crítico tabelado para o nível de confiança estipulado. Se o valor de F ou o valor de t excedem o respectivo valor crítico, então o grupo de dados é estatisticamente diferente.

Para o teste F é realizado o cálculo

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (6.4)$$

onde $S_1^2 > S_2^2$

Quando as duas variâncias são iguais, o valor de F é igual a 1,0. À medida que o resultado se torna maior que 1,0 existe a possibilidade de que a diferença entre as variâncias dos dois grupos seja significativa. Se não houver diferença significativa entre F e o seu valor crítico tabelado no limite de confiança analisado, aplica-se o teste t ou teste de Student, utilizando a relação entre a diferença das duas médias e a combinação dos erros padrão da média.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} \quad (6.5)$$

O valor de t calculado é comparado com o valor do t crítico tabelado, no intervalo de confiança especificado. Quando o valor calculado é maior que o valor

crítico tabelado, pode-se concluir que a diferença entre as médias é estatisticamente significativa, não ocorrendo simplesmente uma variação aleatória.

A exatidão traduz a concordância dos valores experimentais com o valor verdadeiro.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{valor médio experimental}}{\text{valor teórico}} \cdot 100 \quad (6.6)$$

Mesmo os mais exatos instrumentos de medida necessitam ser submetidos, de tempos em tempos, a processos de aferição ou calibração. Esta necessidade é ligada diretamente ao fato de que o envelhecimento ou desvios provocados por diversos fatores ocorre e desloca o grau de exatidão dos instrumentos.

A qualidade e manutenção periódica dos instrumentos de medição são alguns pontos imprescindíveis para a medição exata. O laboratório deve verificar periodicamente os volumes dispensados pela vidraria volumétrica e pipetas automáticas, utilizando para isso a massa da água. No caso das pipetas automáticas, para garantir medidas confiáveis, além de procedimentos de limpeza e manutenção de peças, é necessário verificar a performance da pipeta, avaliando-se o conjunto pipeta + ponteira + operador (técnica de pipetagem). A periodicidade da limpeza deve ser estabelecida de acordo com a frequência de uso, número de usuários para uma mesma pipeta, número de ciclos em cada utilização da pipeta e a natureza dos líquidos pipetados. A periodicidade mínima seria a cada três meses. A ANVISA (2002) ainda enfatiza que a pipeta deve ser guardada na posição vertical para evitar que ela entre em contato com superfícies que podem estar contaminadas e porque, se não for feita a ejeção da ponteira e houver sobrado uma quantidade residual de líquido no interior da ponteira, ao se deitar a pipeta este líquido pode escorrer para o interior do instrumento, contaminando e danificando as peças internas.

As balanças analíticas devem ser instaladas em local adequado, niveladas e livres de correntes de ar, preferencialmente em bancadas exclusivas para as mesmas, e estável. Deve ser limpa imediatamente após o uso. Para a maioria das balanças de laboratório, o valor da divisão real de verificação (d) deve ser 0,1 mg ou inferior. Com isso, a carga mínima (min) da balança não deve ser inferior a $100 \times d$. A incerteza da pesagem (erro sistemático + erro randômico) não deve ser superior a 0,1% da massa pesada.

Os equipamentos com temperatura controlada devem possuir um termômetro colocado em seu interior, verificando-se diariamente a temperatura.

Higiene e segurança no laboratório

O laboratório químico é um lugar possível de acidentes e, por isso, a segurança é um fator fundamental, desde a localização adequada dos equipamentos de segurança a itens elementares, como o uso de avental, máscaras e óculos de proteção.

Cada um que trabalha no laboratório deve ter responsabilidade no seu trabalho e evitar atitudes impensadas de desinformação ou pressa, que possam acarretar um acidente e possíveis danos para si e para os demais. Deve-se prestar atenção a sua volta e prevenir-se contra perigos que possam surgir do trabalho de outros, assim como do seu próprio. A pessoa no laboratório deve adotar uma atitude atenciosa, cuidadosa e metódica em tudo o que faz, concentrando-se no trabalho e não permitindo qualquer distração enquanto trabalha. Da mesma forma, não deve distrair os demais desnecessariamente.

As regras definidas a seguir constituem a base das práticas de contenção seguras de laboratório e podem ser estabelecidas como regulamentos de trabalho. São as regras mais importantes, às quais podem ser acrescentadas outras, muitas delas, específicas para cada laboratório.

O laboratório deve ser mantido limpo e em ordem, livre de todo e qualquer material não relacionado às atividades nele executadas. As superfícies de trabalho devem ser impermeáveis e resistentes a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e calor moderado.

Todo material biológico é por princípio contaminado. Todo material químico é, por princípio, prejudicial à saúde. Para evitar qualquer risco de presença de resíduos químicos e/ou contaminação, as bancadas e outras superfícies de trabalho devem ser descontaminadas pelo menos uma vez ao dia com hipoclorito a 1% ou álcool a 70% e sempre após o respingo de qualquer material, sobretudo material biológico. O laboratório deve ser mantido limpo e sempre antes e após a manipulação de material biológico, ou antes de deixar o laboratório, os laboratoristas devem lavar as mãos.

A proibição de fumar, comer e beber no local de trabalho, bem como a de guardar alimentos, é uma advertência sobre o aumento de risco de contaminação por microrganismos potencialmente patogênicos ou produtos químicos, risco de incêndio e inconveniência com relação aos colegas de trabalho.

É essencial o uso dos EPIs (equipamento de proteção individual) - roupas protetoras, avental e de luvas - durante a execução de atividades no interior do laboratório, no sentido de prevenir a contaminação da pele e da indumentária do analista. Tais roupas protetoras somente devem ser usadas no interior do laboratório e em corredores de áreas técnicas comuns, devendo ser retiradas quando o analista deixar o ambiente. É proibido o uso de tais roupas e de luvas, nas áreas externas do laboratório, tais como: sala de lanche, área administrativa, toailete, etc. Quando necessário, fazer uso de óculos de proteção, ou outro tipo de proteção facial, prevenindo os olhos contra respingos e explosões.

Deve ser proibido o manuseio de maçanetas, telefones, puxadores de armários, ou outros objetivos de uso comum por pessoas usando luvas durante a execução de atividades em que, agentes patogênicos ou material correlato (químico e/ou biológico) esteja sendo manipulado.

A manipulação de compostos tóxicos ou irritantes, ou quando houver desprendimento de vapores ou gases, deve ser feita na capela.

Antes de acender uma chama do maçarico, certifique-se de que não existem solventes próximos e destampados, especialmente aqueles mais voláteis (éter etílico, éter de petróleo, hexano, dissulfeto de carbono, benzeno, acetona, álcool etílico, acetato de etila). Mesmo uma chapa ou manta de aquecimento quentes podem ocasionar incêndios, quando em contato com solventes como éter, acetona ou dissulfeto de carbono.

Quando existirem janelas nas dependências do laboratório, elas devem ser dotadas de proteção contra insetos ou não serem abertas. A área de trabalho deve ser bem iluminada e ventilada, mas sem corrente de ar.

Antes de iniciar o trabalho, certifique-se de que haja água nas torneiras.

Na hora de ligar um aparelho, verifique a voltagem e tome o máximo cuidado durante o uso.

Uma das recomendações internacionais de BPL é a de não jogar nenhum material sólido, produto químico e biológico dentro da pia ou da rede de esgoto comum. Armazene e identifique estes rejeitos em recipientes apropriados para que depois sejam levados a um tratamento apropriado. Só derrame compostos orgânicos líquidos na pia depois de estar seguro de que não são tóxicos e de não haver perigo de reações violentas ou desprendimento de gases. De qualquer modo, faça-o com abundância de água corrente.

As vidrarias contaminadas devem ser colocadas em desinfetante químico (hipoclorito a 1% ou solução de Extran 5%) imediatamente após o uso, antes de serem lavadas e reutilizadas. O material restante de um crescimento microbiológico, por sua vez, deve ser previamente autoclavado (descontaminado) antes de ser descartado na pia.

Não deve ser permitida a presença de animais e plantas que não estejam relacionados com as atividades do laboratório.

Ao iniciar as atividades práticas, você entrará em contato com uma série de problemas que exigirão, para sua solução, cuidados especiais na manipulação técnica e raciocínio para a interpretação dos resultados. O trabalho no laboratório será mais fácil e exato se seguir os seguintes itens: mantenha-se informado sobre a localização de material para socorro de urgência e de extintores de incêndio.

Os recipientes com soluções em uso devem ser rotulados, datados e armazenados em prateleiras localizadas na altura dos olhos para baixo, evitando-se riscos de queda e derramamento.

Antes de utilizar reagentes químicos, leia com atenção os rótulos dos frascos, evitando erros na realização das técnicas. Conserve os frascos fechados e não coloque tampas de qualquer maneira sobre a bancada.

Se precisar diluir um ácido, despeje-o lentamente sobre a água e agite.

Tome cuidado com reações que desenvolvem grande quantidade de energia.

A pipetagem e o manuseio de material contaminado devem ser feitos com o máximo de cuidado, na câmara de fluxo ou próximo à chama de um maçarico. Não se deve pipetar com a boca material infeccioso ou tóxico. Além disso, deve-se proteger a ponta superior das pipetas com algodão antes de esterilização.

Produtos químicos irritantes ou tóxicos não devem ser pipetados diretamente com a boca, fazendo-se uso de pró-pipetas de borracha, buretas ou provetas e manuseados dentro de uma capela. Nas diluições, nunca se deve juntar água ao ácido concentrado, devendo-se sempre adicionar o ácido à água, sob resfriamento, de preferência.

Fazendo-se ou não uso de luvas durante a manipulação no laboratório, lavar as mãos sempre que houver mudança de atividade, na saída do laboratório e antes de comer, beber e até mesmo fumar. A lavagem deve envolver as mãos e antebraços, usando-se água e sabão líquido. Usar, de preferência, toalhas descartáveis.

Deve-se ter todo o cuidado no manuseio de compostos suspeitos de causarem câncer, evitando-se a todo custo a inalação de vapores e a contaminação da pele. Devem

ser manipulados exclusivamente em capelas e com uso de luvas protetoras. Entre estes compostos, destacam-se os reagentes para a eletroforese de proteínas.

Ao se aquecerem substâncias voláteis e inflamáveis no laboratório, deve-se sempre levar em conta o perigo de incêndio. Para temperaturas inferiores a 100°C, use preferencialmente banho-maria ou banho a vapor. Para temperaturas superiores a 100°C, use banhos de óleo. Glicerina pode ser aquecida até 150°C, sem desprendimento apreciável de vapores desagradáveis. Chapas de aquecimento podem ser empregadas para solventes menos voláteis e inflamáveis.

Identificação de microrganismos

O estudo da morfologia e fisiologia bacteriana é importante para auxiliar a identificação e o tratamento a ser dado aos microorganismos, seja para serem eliminados (bactérias patogênicas), seja para serem preservados (bactérias não patogênicas).

De uma forma geral, as bactérias possuem um tamanho médio em torno de 1 micron e podem assumir, basicamente, três formas: cocos, bacilos e forma curva ou espiralada que, por sua vez, podem se associar em arranjos. As leveduras, por sua vez, possuem forma oval ou cilíndrica, com tamanho médio de 4 a 8 micras.

A visualização direta em microscópio permite observar a morfologia e avaliar a existência de motilidade. A técnica consiste em gotejar uma gota de solução salina (0,85% p/v de cloreto de sódio) no esfregaço de uma colônia passada assepticamente em alça de platina para uma lâmina de microscopia. Suspendida a colônia ou uma alçada do material a ser investigado, cobre-se com uma lamínula e examina ao microscópio, com objetiva de 100x.

Existem dois tipos de parede celular revelados pela coloração de Gram, que dividem as bactérias em dois grandes grupos: Gram positivo e Gram negativo. As bactérias Gram positivas possuem parede espessa de peptidoglicano associada à molécula de ácido lipoteicóico, que conferem rigidez e virulência. As Gram negativas apresentam uma estrutura mais complexa.

A técnica de coloração de Gram é utilizada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes. Baseia-se na retenção do complexo cristal violeta – lugol na parede espessa das bactérias, formando um complexo de cor roxa. O tratamento com álcool-acetona é a etapa diferencial. Nas

bactérias Gram-positivas, o álcool-acetona não retira o complexo corado, pois sua ação desidratante faz com que a espessa camada de peptidoglicano se torne menos permeável, retendo o corante. Nas Gram-negativas, entretanto, devido à pequena espessura da camada basal e às discontinuidades existentes nesta camada, em pontos de aderência entre a membrana externa e a membrana celular, o complexo corado é extraído pelo álcool-acetona deixando as células descoradas. O tratamento com safranina ou fucsina não altera a cor roxa adquirida pelas Gram-positivas por serem um corante mais fraco, ao passo que as Gram-negativas, descoradas pelo álcool-acetona, tornam-se avermelhadas.

Dois itens são muito importantes para uma boa coloração:

- idade da cultura, pois culturas muito jovens, velhas, mortas ou em degeneração não são coradas adequadamente
- corantes e reagentes, onde se deve verificar a validade e armazená-los em frasco âmbar e local escuro para evitar sua degradação.

O método e as soluções de coloração de Gram são descritos a seguir:

Solução de violeta cristal (Gram I)

Solução A: dissolver 2 g de violeta cristal em 20 mL de etanol 95%

Solução B: dissolver 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada.

Preparar as soluções separadamente e aguardar 24 horas antes de usar

Misturar as duas soluções

Filtrar em papel de filtro, transferindo para um frasco protegido de luz. Validade de 1 ano em temperatura ambiente.

Solução de lugol (Gram II)

Solubilizar 2,0 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada

Dissolver, gradativamente, 1,0 g de cristal de iodo nesta solução de iodeto de potássio

Aramazenar em frasco âmbar. Validade de 6 meses em temperatura ambiente

Solução Álcool-Acetona

Misturar igual volume de etanol 95% e acetona

Guardar em frasco âmbar bem vedado. Validade de 1 ano a temperatura ambiente

Solução de safranina (Gram IV)

Dissolver 0,25 g de safranina em 10 mL de etanol 95%

Avolumar a 100 mL com água destilada

Armazenar a solução em frasco escuro. Validade de 6 meses em temperatura ambiente

Em câmara de fluxo laminar:

Transferir assepticamente 1 gota de cultura para uma lâmina de microscopia, caso o microrganismo esteja em cultura líquida, ou fazer o esfregaço com alça de platina em solução salina (0,85% p/v de cloreto de sódio), caso o microrganismo esteja em cultura em meio sólido.

Esperar a lâmina secar e fixar a massa bacteriana passando a lâmina algumas vezes sobre a chama de um maçarico ou lamparina, no lado oposto do esfregaço.

Processo de coloração:

Cobrir a lâmina com solução de violeta cristal (Gram I) e deixar em repouso por um minuto

Escorrer o corante e enxaguar a lâmina com água para remover o excesso de corante, sem que o jato caia diretamente sobre os microrganismos.

Cobrir a lâmina com lugol (Gram II) e deixar em repouso por um minuto.

Escorrer o fixador e lavar a lâmina com água.

Com a lâmina inclinada, despejar algumas gotas da solução álcool-acetona (Gram III) por 10 segundos.

Enxaguar a lâmina com água para remover o excesso de solvente.

Cobrir a lâmina com solução de safranina (Gram IV) e deixar em repouso por 15 segundos.

Escorrer o corante, lavar com água e deixar secar.

Observar a preparação corada ao microscópio ótico sob imersão, com aumento de 100x. As bactérias Gram-positivas coram de roxo e as Gram-negativas de vermelho-rosado. O tampão utilizado como líquido de montagem para aumentar a fluorescência é feito com 0,15 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 50 mL de glicerol e 100 mL de água destilada. Para a limpeza da objetiva usa-se uma solução 70% de álcool etílico e 30% de éter.

O inóculo ideal

Quando os microrganismos se reproduzem, por gemulação ou fissão binária, o crescimento conduz ao aumento do número de células, podendo este crescimento ser representado graficamente como o logaritmo decimal do número de células versus o tempo de incubação e permitindo calcular a taxa específica de crescimento e o tempo de geração ou duplicação do microrganismo em questão. As fases de crescimento microbiano são ilustradas na Figura 6.2. O meio do inóculo pode também ser diferente daquele do qual provém o microrganismo e, com isso, novas enzimas terão que ser sintetizadas para utilizar novos nutrientes.

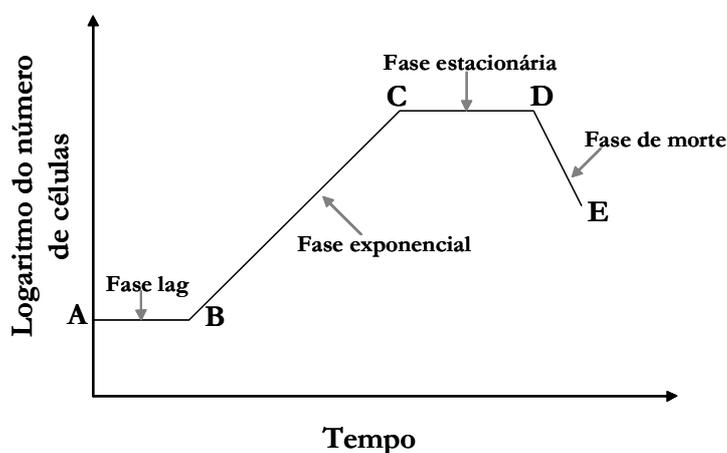


Figura 6.2 – Fases do crescimento microbiano.

Durante a fase de lag ou fase de latência dá-se a replicação do ADN, a massa celular começa a aumentar e, finalmente, dá-se a divisão celular da bactéria. Seu tempo varia consideravelmente com a condição em que se encontra o microrganismo e a natureza do meio, podendo ser muito longa se o inóculo provém de uma cultura velha ou de uma cultura que refrigerada ou até mesmo se o novo meio for muito diferente do meio de onde as bactérias provêm. Por outro lado, quando se transfere uma cultura jovem em fase de crescimento exponencial para um meio fresco de igual composição, a fase lag é muito curta ou praticamente inexistente. Na fase exponencial de crescimento, os microrganismos crescem e se dividem à sua taxa máxima devido ao potencial genético, à natureza do meio e às condições de crescimento (temperatura, pH, disponibilidade de água, etc.). A taxa de crescimento é constante durante a fase exponencial o que significa que os microrganismos se dividem em intervalos regulares

de tempo (tempo de geração, g) e a biomassa duplica igualmente nesses intervalos de tempo. Durante esta fase existe uma uniformidade populacional em termos de propriedades fisiológicas e bioquímicas. Por este motivo, as culturas em fase exponencial são geralmente usadas em estudos fisiológicos e bioquímicos dos microrganismos

Uma vez que a cultura bacteriana deve ser desenvolvida exponencialmente logo após a sua inoculação, o inóculo não deve estar apenas na fase exponencial de crescimento, mas também ser transferido sobre condições que não permitam qualquer interrupção na sua reprodução celular. O tamanho de inóculo ideal está na faixa de 3 a 10%, permitindo a sua reutilização ao longo de 3 a 4 gerações.

Na fase estacionária, o esgotamento de pelo menos um nutriente essencial e/ou a acumulação de produtos inibidores do metabolismo leva ao fim do crescimento da população. As células de alguns microrganismos podem manter-se viáveis durante períodos longos à custa das reservas endógenas, que usam em processos de manutenção. Outras morrem assim que entram na fase estacionária

Os estudos realizados mostraram que para se atingir uma reprodutibilidade de crescimento, deve-se acompanhar o crescimento a partir da medida de densidade ótica e, com esta medida ao se atingir a taxa específica máxima de crescimento, inocular a mesma massa de células da etapa anterior. Uma diferença nesta etapa, transferindo-se células antes ou depois da fase de máxima capacidade celular, pode gerar variações significativas na quantidade e na qualidade do inóculo.

Confiabilidade das medições analíticas

A adequação dos métodos analíticos é de fundamental importância no processo. Para assegurar a qualidade analítica, estudos de repetitividade, com no mínimo dez amostras, devem ser efetuados, avaliando-se a média, o desvio padrão e a precisão do método empregado. O coeficiente de variação deve ser inferior a 15%.

Procedimentos de Planejamento e Otimização

Em um bioprocessos, quando se está interessado na síntese de determinada substância, a produção desse material dependerá de diversos fatores ou propriedades, tais como tipo da fonte e concentração dos reagentes que participam da síntese, temperatura, pressão, pH, agitação, etc. Para se obter um rendimento máximo, deve-se

escolher todas as propriedades necessárias para descrever o sistema e procurar ajustá-las até a obtenção da maior massa ou concentração da substância de interesse. Entretanto, podemos considerar que algumas dessas propriedades não devem interferir significativamente no resultado final e conseqüentemente, com o intuito de obter resultados significativos mais rapidamente (o que também pode ser considerado como um processo a ser otimizado), selecionamos apenas um conjunto restrito de propriedades que acreditamos ser responsáveis pela maior ou menor obtenção do produto desejado.

No desenvolvimento de novos métodos analíticos e no melhoramento ou adaptação dos métodos já estabelecidos, o planejamento de experimentos avalia os fatores que exibem efeito significativo sobre a resposta do sistema e que podem ser ajustados para melhorar os resultados do método (por exemplo, aumentar a sensibilidade, diminuir reações paralelas e melhorar separações entre sinais analíticos).

O planejamento de experimentos é uma técnica estatística que reduz a carga experimental, obtendo parâmetros da forma mais precisa possível. Num planejamento fatorial, as influências de todas as variáveis, fatores e efeitos de interação nas respostas são investigadas. A otimização pode ser dividida em estágios que se caracterizam pela definição da função objetivo (resposta), pela determinação dos fatores (variáveis) que apresentam influências significativas sobre a resposta que se deseja otimizar e pela otimização propriamente dita, que é procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultam na melhor resposta (maximização ou minimização). Modelos de interação linear ou de segunda ordem são comuns.

Um procedimento criterioso para a otimização de um sistema químico deve envolver as seguintes etapas:

- realização de experimentos de varredura para caracterizar as variáveis do sistema, usando um planejamento fatorial;
- localização da região ótima ou ideal;
- certificação e/ou ajuste fino da região ótima, usando planejamento fatorial e/ou superfície de respostas, dependendo de quão apurados se desejam os resultados.

O emprego de planejamento experimental exploratório de Taguchi e semifatorial a dois níveis (Box e Draper, 1987) pode permitir avaliar a importância e o efeito linear das variáveis. A escolha do tipo apropriado de planejamento dependerá do número de variáveis, com a limitação da carga experimental exigida. Certos tipos especiais de

planejamentos fatoriais são muito úteis no desenvolvimento e melhoria do processo. Se as combinações de k fatores são investigadas a 2 níveis, o planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Os níveis dos fatores são dados por “-” para o nível inferior e “+” para o nível superior. O nível zero ou central é também incluído, avaliando-se o valor médio das variáveis. Três ou quatro experimentos centrais devem ser sempre incluídos no planejamento fatorial para permitir a estimação do erro experimental. Os ensaios e as replicatas devem, também, ser realizados de forma aleatória para evitar distorções estatísticas que possam vir a comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos calculados para as variáveis estudadas. O efeito de algumas variáveis relevantes selecionadas no planejamento exploratório pode ser mais explorado empregando planejamento experimental fatorial completo com réplicas no ponto central (Box e Draper, 1987). O uso de três níveis sempre fornece mais resultados, permitindo inferir sobre a existência de não linearidades no processo, além das interações entre as variáveis. A Figura 6.3 ilustra experimentos num planejamento com 2 e 3 variáveis. Em função deste número de fatores e de níveis, este planejamento fatorial pode ser indicado como sendo 2^2 e 2^3 , o que já sugere que o número de experimentos diferentes a serem realizados é 4 e 8, respectivamente.

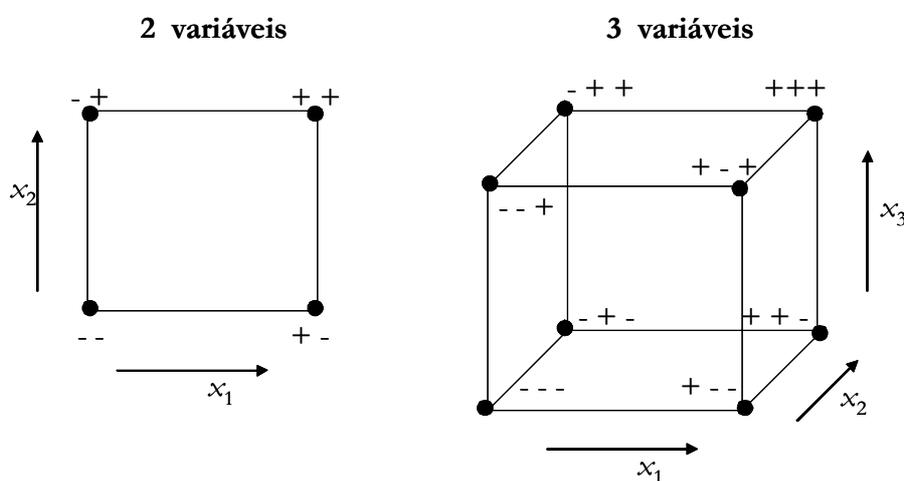


Figura 6.3 – Os planejamentos fatoriais com 2 e 3 variáveis.

A avaliação dos efeitos das variáveis e a otimização da resposta serão feitos mediante utilização de modelagem empírica e estimação de parâmetros, empregando o programa Statistica 6.0 (StatSoft, 2001), que descrevem como as variáveis experimentais e suas interações influenciam na resposta.

Em vista de tudo o que foi apresentado neste protocolo, sugere-se o fluxograma disposto na Figura 6.4 como procedimento para a realização de qualquer trabalho em um laboratório de bioprocessos. As ferramentas de qualidade apresentadas no início deste capítulo ajudam a criar um ambiente propício ao desenvolvimento deste trabalho.

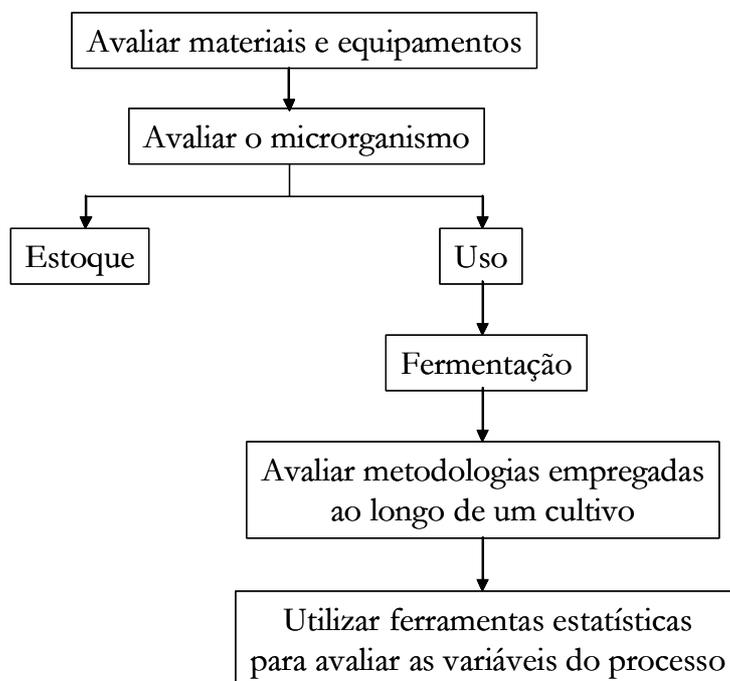


Figura 6.4 – Fluxograma de desenvolvimento de um bioprocessamento com qualidade.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUD, A.K.S., ALVES, T.L.M, PINTO, J.C., 2004, Processo de Produção de Asparaginase pela Bactéria *Zymomonas mobilis* e Uso do Caldo Fermentativo e/ou da Enzima Purificada no Tratamento de Doenças. *Patente PI0404952-7*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, Brasil.
- ALEXANDRI, E., DRAINAS, C., TYPAS, M. A., 1990, “Glutamine Uptake in *Zymomonas mobilis*”, *Biotechnology Letters*, v. 12, pp. 457-462.
- ALMEIDA, V.L., LEITÃO, A., REINA, L.C.B., MONTANARI, C.A., DONNICI, C.L., LOPES, M.T.P., 2005, “Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução”, *Química Nova*, v.28, pp. 118-129.
- ALVES, T.L.M., 1993, *Estudo da Produção de Etanol por Zymomonas mobilis*. Tese de D. Sc., Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ANDREWS, A. T., 1986, *Electrophoresis: Theory, Techniques and Biochemical Applications*. 1 ed. New York, Oxford University Press.
- ANVISA, 2003, *Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003.
- ANVISA, 2002, *Manual de Boas Práticas de Biodisponibilidade e Bioequivalência*, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, v. I (146 p.) e II (166 p.).
- ARIMA K., ARAKI C., SAKAMOTO T., TAMURA G., 1972, “Production of Extracellular L-Asparaginases by Microorganisms”, *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 36 (3) pp. 356-361.
- BARNES, W.R., DORN, G.L., VELA, G.R., 1977, “Effect of Culture Conditions on Synthesis of L-Asparaginase by *Escherichia coli* A-1”, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 3, n. 2, pp. 257-261.
- BASCOMB, S., BANKS, G.T., SKARSTEDT, M.T., FLEMING, A., BETTELHEIM, K. A., 1975, “The Properties and Large-Scale Production of L-Asparaginase from *Citrobacter*”, *Journal of General Microbiology*, v. 90, n. 2, pp. 1-16.

- BANSAL-MUTALIK, R., GAIKAR, V.G., 2003, "Cell Permeabilization for Extraction of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* by Reverse Micellar Solutions", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, pp. 14-26.
- BELAICH, J. P., SENEZ, J. C., 1965, "Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of *Zymomonas mobilis*", *Journal of Bacteriology*, v. 89, n. 5, pp. 1195-1200.
- BELAICH, J. P., BELAICH, E., SIMONPIETRI, P., 1972, "Uncoupling in Bacterial Growth: Effect of Pantothenate on Growth of *Zymomonas mobilis*", *Journal of General Microbiology*, v. 70, pp. 179-185.
- BERKOW, R., BEERS, M. H., BOGIN, R. M., FLETCHER, A. J., 2002, "Tratamento do Câncer", Em: *Manual Merck de Informação Médica: Saúde para a Família*, cap. 166, sec 15. Tradução: Dr. Fernando Gomes do Nascimento. Barueri, SP, Manole, 1595 p.
- BHAT, N., NAINA, N. S., GOWDA, L. R., BHAT, S. G., 1993, "Detergent Permeabilized Yeast Cells as the Source of Intracellular Enzymes for Estimation of Biomolecules", *Enzyme Microbiol Technoogy*, v. 15, pp. 796-800.
- BOECK, L.D.; HO, P.P.K., 1973, "L-Asparaginase Production During Static Incubation of Aerobically Grown *Escherichia coli* B", *Cannadian Journal of Microbiology*, v.19, pp.1251-1257.
- BOREK, D., JASKÓLSKI, M., 2001, "Sequence Analysis of Enzymes with Asparaginase Activity", *Acta Biochimica Polonia*, v. 48 , n. 4, pp. 893-902.
- BOX, G.E.P., DRAPER, N.R., 1987, *Empirical Model-Building and Response Surfaces*. Hardcover Edition, John Wiley & Sons, New York.
- BRADFORD, M., 1976, "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding", *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248-254.
- BROOME, J.D., 1961, "Evidence that the L-asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is Responsible for its Antilymphoma Effects", *Nature*, v. 191, pp. 1114-1115.
- BROOME, J., 1963a, "Evidence that the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum is Responsible for its Antilymphoma Effects. I. Properties of the L-Asparaginase of

- Guinea Pig Serum in Relation to Those of the Antilymphoma Substance”, *Journal of Experimental Medical Sciences*, v. 118, pp. 99-117.
- BROOME, J., 1963b, “Evidence that the L-Asparaginase of Guinea Pig Serum is Responsible for Its Antilymphoma Effects. II. Lymphoma 6C3HED Cells Cultured in a Medium Devoid of L-Asparaginase Lose Their Susceptibility to the Effects of Guinea Pig Serum in Vivo”, *Journal of Experimental Medical Sciences*, v. 118, pp. 118-121.
- BURNS, M., 2004, “Current Practice in the Assessment and Control of Measurement Uncertainty in Bio-Analytical Chemistry”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 23, n. 5, pp. 393-398.
- BUSHMAN, J.E., PALMIERI, D., WHINNA, H.C., CHURCH, F.C., 2000, “Insight into the Mechanism of Asparaginase-Induced Depletion of Antithrombin III in Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia”, *Leukemia Research*, v. 24, pp. 559-565.
- CACHIADO, E., JALES, S. L., XIMENES, E., ROLIM, P., 2001, “Tecnologia de Obtenção das Formas Farmacêuticas Cápsulas e Flaconetes à Base de *Zymomonas mobilis*”, *II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas do Estado do Rio de Janeiro (RIOPHARMA)*, Rio de Janeiro-RJ, maio de 2001.
- CALAZANS, G. M. T., LIMA, R. C., FRANÇA, F. P., LOPES, C.E., 2000, “Molecular Weight and Antitumor Activity of *Zymomonas mobilis* Levans”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 27, pp. 245-247.
- CALAZANS, G. M. T., LOPES, C. E., LIMA, R. M. O. C., DEFRANCA, F. P., 1997, “Antitumor Activities of Levans Produced by *Zymomonas mobilis* Strain”, *Biotechnology Letters*, v. 19, pp. 19-21.
- CAPIZZI, R., 1993, “Asparaginase”, In: *Cancer Medicine*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 796-805.
- CARRA, S., PASQUALI, F.C., MALVESSI, E., SILVEIRA, M.M., 2005, “Bioconversão de Carboidratos em Sorbitol e Ácidos Orgânicos por Enzimas Periplasmáticas de *Zymomonas mobilis*”, *XV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM 2005)*, Recife, Pernambuco, Brasil, 3-5Ago.

- CEDAR, H., SCHWARTZ, J.H., 1967, "Localization of the Two L-Asparaginases in Anaerobically Grown *Escherichia coli*", *Journal of Biological Chemistry*, v. 242, pp. 3753-3754.
- CEDAR, H., SCHWARTZ, J.H., 1968, "Production of L-Asparaginase II by *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, v. 96, n. 6, pp. 2043-2048.
- COSTA, F.H.N., BUZATO, J.B., CELLIGOI, M.A.P.C., TANO, M.S., 2001, "Fermentação Contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em Concentrações Elevadas de Sacarose", *Revista de Ciências Exatas e Naturais*, v. 3, n. 2, pp.201-207.
- CHEN, Y., CHEN, J., YU, C., DU, G., LUN, S., 1999, "Recovery of Poly-3-hydroxybutyrate from *Alcaligenes eutrophus* by Surfactant Chelate Aqueous System", *Process Biochemistry*, v. 34, pp. 153-157.
- CHUN, U.H., ROGERS, P.L., 1988, "Development of an Ethanol/Sorbitol Process Using a Ceramic Membrane Cell Recycle Bioreactor", *Desalination*, v. 70, pp. 353-361.
- DE LEÓN, A., GARCÍA, B., BARBA DE LA ROSA, A.P., VILLASENÖR, F., ESTRADA, A., LÓPEZ-REVILLA, R., 2003, "Periplasmic Penicillin G Acylase Activity in Recombinant *Escherichia coli* Cells Permeabilized with Organic Solvents", *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 301-305.
- DIAS, A. A, 1995, *Qualidade e a ISO 9000*. ed. Montandon & Dias, São Paulo.
- DOBLHOFF-DIER, O., BLIEM, R., 1999, "Quality Control and Assurance from the Development to the Production of Biopharmaceuticals", *TIBTECH*, v. 17, pp. 266-270.
- DOELLE, H. W., KIRK L., CRITTENDEN R., TOH, H., 1993, "*Zymomonas-mobilis* - Science and Industrial Application", *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 13, pp. 57-98.
- DRAINAS, C., KINGHORN, J.R., PATEMAN, J.A., 1977, "Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*", *Journal of General Microbiology*, v. 98, pp. 493-501.

- DRAINAS, D., DRAINAS, C., 1985, "A Conductimetric Method for Assaying Asparaginase Activity in *Aspergillus nidulans*", *European Journal of Biochemistry*, v. 151, pp. 591-593.
- DUNLOP, P.C., ROON, R.J., 1975, "L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: An Extracellular Enzyme", *Journal of Bacteriology*, v. 122, n. 3, pp. 1017-1024.
- EURACHEM/CITAC, 2002, *Guia EURACHEM/CITAC: Determinando a Incerteza na Medição Analítica*. 2 ed, 1ª edição brasileira, 168 p.
- FERRAZ, H.C., 1999, *Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico Utilizando Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* e Separação Simultânea dos Produtos por Eletrodiálise*. Tese de Mestrado, Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FONSECA, E.F., 2003, *Modelagem da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico por Células Permeabilizadas e Imobilizadas de *Zymomonas mobilis* em Reator Tipo Cesta Agitada*. Tese de Doutorado, Programa de Engenharia Química/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- GALANI, I., DRAINAS, C., TYPAS, M. A., 1985, "Growth Requirements and the Establishment of a Chemically Defined Minimal Medium in *Zymomonas mobilis*", *Biotechnology Letters*, v. 7, pp. 673-678.
- GARIN, M.I., KRAVTZOFF, R., CHESTIER, N., SANZ, S., PINILLA, M., LUQUE, J., ROPARS, C., 1994, "Density Gradient Separation of L-Asparaginase-Loaded Human Erythrocytes", *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 33, n. 4, pp. 807-814.
- GARNICK, R.L., SOLLI, N.J, PAPA, P.A., 1988, "The Role of Quality Control in Biotechnology: An Analytical Perspective", *Analytical Chemistry*, v. 60, pp. 2546-2557.
- GECIOVA, J., BURY, D., JELEN, P., 2002, "Methods for Disruption of Microbial Cells for Potential Use in the Dairy Industry – A Review", *International Dairy Journal*, v. 12, pp. 541-553.
- GECKIL, H.; ATES, B.; GENCER, S.; UCKUN, M.; YILMAZ, I., 2005, "Membrane Permeabilization of Gram-Negative Bacteria with a Potassium Phosphate/Hexane Aqueous Phase System for the Release of L-Asparaginase: An Enzyme Used in Cancer Therapy", *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 573-579.

- GECKIL, H.; GENCER, S., 2004, "Production of L-asparaginase in *Enterobacter aerogenes* Expressing *Vitreoscilla* Hemoglobin for Efficient Oxygen Uptake", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 63, pp. 691-697.
- GONÇALVES DE LIMA, O., 1958, "Sobre uma Interessante e Pouco Conhecida Publicação de Paul Lindner Acerca do Emprego Terapêutico de *Zymomonas mobilis* Kluyver e Van Niel, 1936 (*Pseudomonas lindneri*)", *Revista do Instituto de Antibióticos*, v.1, n. 2, p. 119-124.
- GONZALES-MARTINEZ, C., CORRADINI, M. G., PELEG, M., 2003, "Probabilistic Models of Food Microbial Safety and Nutritional Quality", *Journal of Food Engineering*, v. 56, pp. 135-142.
- GOWDA, L.R., BACHHAWAT, N., BLAT, S.G., 1991, "Permeabilization of Baker's Yeast by Cetyltrimethylammonium Bromide for Intracellular Enzyme Catalysis", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, n. 2, pp. 154-157.
- GRAHAM, M.L., 2003, "Pegaspargase: a Review of Clinical Studies", *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, pp. 1293-1302.
- HAPALA, I., 1997, "Breaking the Barrier: Methods for Reversible Permeabilization of Cellular Membranes", *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 17, n. 2, pp. 105-122.
- IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K., ISONO, M., 1973, "Asparaginase and Glutaminase Activities of Microorganisms", *Journal of General Microbiology*, v. 76, pp. 85-99.
- INMETRO, 2003, *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição*. 3 ed. Rio de Janeiro, ABNT.
- INMETRO, 2000, *Guia para Laboratórios Químicos: Um auxílio a Organização e ao Credenciamento*, ed. Interciência, Rio de Janeiro.
- ISHIZAKI, A., TRIPETCHKUL, S., TONOKAWA, M., SHI, Z., SHIMIZU, K., 1994, "pH-Mediated Control Methods for Continuous Ethanol Fermentation Using *Zymomonas mobilis*", *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 77, n. 5, pp. 541-547.
- KEATING, M.J., HOLMES, R., LERNER, S., HO, D.H., 1993, "L-Asparaginase and PEG Asparaginase – Past, Present and Future", *Leukemia & Lymphoma*, v. 10, pp. 139-145.

- KERBER, C.W., BANK, W.O., HORTON, J.A., 1978, "Polyvinyl Alcohol Foam: Prepackaged Emboli for Therapeutic Embolization", *American Journal of Roentgenology*, v. 130, pp. 1193-1194.
- KIDD, J.G., 1953, "Regression of Transplanted Lymphomas Induced *in vivo* by Means of Norma Guinea Pig Serum. I. Course of Transplanted Cancers of Various Kinds in Mice and Rats Given Guinea Pig Serum, Horse Serum, or Rabbit Serum", *Journal of Experimental Medicine*, v. 98, pp. 565-582.
- KINGHORN, J.R., PATEMAN, J. A., 1976, "Mutants of *Aspergillus nidulans* Lacking Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Specific Glutamate Dehydrogenase", *Journal of Bacteriology*, v. 125, n. 1, pp. 42-47.
- KURTZBERG, J., 2000, *Asparaginase*. In: *Cancer Medicine*, 5 ed., sec. 14 – Chemoterapeutic Agents, cap. 51, pp. 699-705. B. C. Decker Inc, Hamilton, Ontario.
- LAEMMLI, U.K., 1970, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, v. 227, pp. 680-685.
- LANG, J. R., BOLTON, S., 1991, "A Comprehensive Method Validation Strategy for Bioanalytical Applications in the Pharmaceutical Industry - 1. Experimental Considerations", *Journal of Pharmaceutical & Biotechnological Analysis*, v. 9, pp 357-361.
- LANG, J. R., BOLTON, S., 1991, "A Comprehensive Method Validation Strategy for Bioanalytical Applications in the Pharmaceutical Industry - 2. Stastical Analysis", *Journal of Pharmaceutical & Biotechnological Analysis*, v. 9, pp 435-442.
- LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D., 2003, "Cellulosic Fuel Ethanol: Alterantive Fermentation Process Designs with Wild-Type and Recombinant *Zymomonas mobilis*", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 106, pp. 457-470.
- LEE, S., WROBLE, M.H., ROSS, J.T., 1989, "L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: An Improved Recovery and Purification Process Using Affinity Chromatography", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 22, pp.
- LEITE, F., 1996, *Validação em Análise Química*, 1 ed. Campinas, SP, Editora Átomo.
- LIANG, J.F., LI, Y.T., SONG, H., PARK, Y.J., NAIK, S.S., YANG, V.C., 2002, "ATTEMPTS: a Heparin/Proatmine-Based Delivery System for Enzyme Drugs", *Journal of Controlled Release*, v. 78, pp. 67-69.

- LINDHOLM, J., JOHANSSON, M., FORNSTEDT, T., 2003, "Guidelines for Analytical Method Development and Validation of Biotechnological Synthesis of Drugs. Production of a Hydroxyprogesterone as Model", *Journal of Chromatography B*, v. 791, pp. 323-336.
- LINHARES, P.S., 2000, "A Norma ISO/IEC Guia 25 para Laboratórios e sua relação com as ISO 9000 e 17025", *TECBAHIA*, v. 15; n^o1; pp. 108-112.
- LIU, F.S., ZAJIC, J.E., 1973, "Fermentation Kinetics and Continuous Process of L-Asparaginase Production", *Applied Microbiology*, v. 25, pp. 92-96.
- LOOS, H., KRÄMER, R., SAHM, H., SPRENGER, G. A., 1994, "Sorbitol Promotes Growth of *Zymomonas mobilis* in Environments with High Concentrations of Sugar: Evidence for a Physiological Function of Glucose-Fructose Oxidoreductase in Osmoprotection", *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 24, pp. 7688-7693.
- LOPES, J.A., COSTA, P.F., ALVES, T.P., MENEZES, J.C., 2004, "Chemometrics in Bioprocess Engineering: Process Analytical Technology (PAT) Applications", *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 74, pp. 269-275.
- MARLBOROUGH, D.I., MILLER, D.S., CAMMACK, K. A., 1975, "Comparative Study on Conformational Stability and Subunit Interactions of Two Bacterial Asparaginases", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 386, n. 2, pp. 576-589.
- MAROTO, A., BOQUÉ, R., RIU, J., RIUS, F. X., 1999, "Evaluating Uncertainty in Routine Analysis", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18 (9-10), pp. 577-593.
- MARQUES, J. J S., CABRAL, M. L. S. A., 2000, "5S: Um Ambiente para a Qualidade Total", *Fundação Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco (Itep)*, Recife, PE, Brasil.
- MASHBURN, L.T., WRISTON, J.C., 1963, "Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 12, n. 1, pp. 50-55.
- MASHBURN, L.T., WRISTON, J.C., 1964, "Tumor Inhibition Effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*", *Archives of Biochemistry and Biophysical*, v. 105, pp. 450-452.

- MATSUYAMA, H., TAGUCHI, R., IKEZAWA, H., 1991, "Phospholipase D Modified with a Polyethylene Glycol Derivative", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, n. 3, pp. 743-746.
- McSHEERY, S., SZPUNAR, J., MORABITO, R., QUEVAUVILLER, P., 2003, "The Specification of Arsenic in Biological Tissues and Certification of Reference Materials for Quality Control", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 4, pp. 191-209.
- MILLER, O., 1982, *Farmacologia Clínica e Terapêutica*, 13 ed. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro.
- MINIM L. A., ALEGRE R. M., 1992, "Production of Enzyme L-Asparaginase From *Erwinia-Aroideae*", *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 35(2), pp. 277-283.
- MORAIS, J.O.F. (1982), "Zymomonas mobilis e seu Possível Emprego como Agente de Fermentação Alcoólica", *Revista do Instituto de Antibióticos*, v. 21(1/2), pp. 169-182.
- MUKHERJEE, J., MAJUMDAR, S., SCHEPER, T., 2000, "Studies on Nutritional and Oxygen Requirements for Production of L-asparaginase by *Enterobacter aerogenes*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 2, pp. 180-184.
- MUKHERJEE, J., JOERIS, K.; RIECHEL, P.; SCHEPER, T., 1999, "A Simple Method for the Isolation and Purification of L-Asparaginase from *Enterobacter aerogenes*", *Folia Microbiology*, v. 44, n. 1, pp. 15-18.
- MÜLLER, H.J., BOOS, J., 1998, "Use of L-Asparaginase in Childhood ALL", *Critical Reviews in Oncology: Hematology*, v. 28, pp. 97-113.
- NADON, R., SHOEMAKER, J., 2002, "Statistical Issues with Microarrays: Processing and Analysis", *Trends in Genetics*, v. 18, n. 5, pp. 265-271.
- OLIVEIRA, E. M. M., 1998, *Produção de L-asparaginase II de Saccharomyces cerevisiae: Regulação de Nitrogênio*, Tese de Mestrado, Dep. Bioquímica/Instuto de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PAJDAK, E., PAJDAK, W., 1972, "Simple and Sensitive Method for Detection of L-Asparaginase by Polyacrylamide-Gel Electrophoresis". *Analytical Biochemistry*, v. 50, n. 1, pp. 317-320.

- PAJDAK, E., PAJDAK, W., 1974, "Activity Stain For Detection of L-Asparaginase - Anti-L-Asparaginase Complexes In Agar", *Journal of Immunological Methods*, v. 6, n. 1-2, pp. 109-114.
- PAUL, J.H., COOKSEY, K.E., 1981, "Regulation of L-Asparaginase in a *Chlamydomonas* Species in Response to Ambient Concentrations of Combined Nitrogen", *Journal of Bacteriology*, v. 147, n. 1, pp. 9-12.
- PAULING, K.D., JONES, G.E., 1980, "Asparaginase II of *Saccharomyces cerevisiae*. Inactivation During the Transition to Stationary Phase", *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 616, pp. 271-282.
- PETZOLD, L.R., 1989, "A Differential-Algebraic System Solver", *Computer and Mathematical Research Division*, Lawrence Livermore National Laboratory, CA.
- PINHEIRO, I. O., 2001, *Fermentações de Zymomonas mobilis em Meio Mínimo Usando Asparagina como Fonte de Nitrogênio. Tese de Doutorado*, Programa de Engenharia Química/COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T., 2000, *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*, Atheneu Editora, São Paulo – SP, 309p.
- PINTO, J.C., LOPEZ, G.E.; NIEMEYER, M.A.L., SILVA, F.M., JUNIOR, P.A.M., SOUZA, M.N., 2004, Processo de Síntese de Poli(álcool vinílico) e/ou Poli(acetato de vinila) com Morfologia Esférica e Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso na Embolização Vascular, *Patente PI0404994-2*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial. Rio de Janeiro, Brasil.
- QUEVAUVILLER, P., CÁMARA, C., KRAMER, K.J.M., 1999, "EC Initiatives for Quality Assurance Training in Analytical Chemistry", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18 (9-10), pp. 644-649.
- RABILLOUD, T., 1996, "Solubilization of Proteins for Electrophoretic Analysis", *Electrophoresis*, v. 17, pp. 813-829.
- REHR, B., WILHELM, C., SAHM, H., 1991, "Production of Sorbitol and Gluconic Acid by Permeabilized Cells of *Zymomonas mobilis*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 35, pp. 144-148.

- ROBERTS, J., HOLCENBERG, J., DOLOWY, W., 1972, "Isolation, Crystallization and Properties of *Achromobacteraceae* Glutaminase-Asparaginase with Antitumor Activity", *The Journal of Biological Chemistry*, v. 247, pp. 84.
- SANCHEZ, S., DEMAINE, A. L., 2002, "Metabolic Regulation of Fermentation Processes", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, pp. 895-906.
- SHENG, S., KRAFT, J.J., SCHUSTER, S.M., 1993, "A Specific Quantitative Colorimetric Assay for L-Asparagine", *Analytical Biochemistry*, v. 211, pp. 242-249.
- SIECIECHOWICZ, K.A.; IRELAND, R.J., 1989, "Isolation and Properties of an Asparaginase from Leaves of *Pisum Sativum*", *Phytochemistry*, v. 28, n. 9, pp. 2275-2279.
- SIKKEMA, J. DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B., 1995, "Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons", *Microbiological Reviews*, v. 59, n. 2, pp. 201-222
- SILVA, P., 1980, *Farmacologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- SOARES, A. L., GUIMARÃES, G. M., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R. N. M., ABRAHÃO-NETO, J., 2002, "Effects of Polyethylene Glycol Attachment on Physicochemical and Biological Stability of *E. coli* L-Asparaginase", *International Journal of Pharmaceutics*, v. 237, pp. 163-170.
- SOUZA, W. S., 2002, *Extração, Purificação e Caracterização Parcial de L-Asparaginase II de Saccharomyces cerevisiae*, Tese de Mestrado, Dep. Bioquímica/Instituto de Química/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SPRENGER, G.A., 1993, "Approaches to Broaden the Substrate and Product Range of the Ethanolic Bacterium *Zymomonas mobilis* by Genetic Engineering", *Journal of Biotechnology*, v. 27, pp. 225-237.
- SPRENGER, G.A., 1996, "Carbohydrate Metabolism in *Zymomonas mobilis*: a Catabolic Highway with Some Scenic Routes", *FEMS Microbiology Letters*, v. 145, pp. 301-307.
- SREEKUMAR, O., BASAPPA, S.C., 1995, "Effect of Different Nitrogen-Sources on Ethanolic Fermentation of Glucose by *Zymomonas mobilis*", *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, v. 32, pp. 252-254.
- StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, Oklahoma, USA, 2001.

- STECHER, A.L., MORGANTETTI DE DEUS, P., POLIKARPOV, I., ABRHÃO-NETO, J., 1999, "Stability of L-Asparaginase: an Enzyme Used in Leukemia Treatment", *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v. 74, pp. 1-9.
- SWINGS, J., DE LEY, J., 1977, "The Biology of *Zymomonas*", *Bacteriological Reviews*, v. 41, n. 1, pp. 1-46.
- TOMA, M.M., KALNENIEKS, U., BERZINS, A., VIGANTS, A., RIKMANIS, M., VIESTURS, U., 2003, "The Effect of Mixing on Glucose Fermentation by *Zymomonas mobilis* Continuous Culture", *Process Biochemistry*, v. 38, pp. 1347-1350.
- TONKS, D.B., 1983, "A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories", *Clinical Chemistry*, v. 9, pp. 217-233.
- TSIRKA, S.E., KYRIAKIDIS, D.A., 1990, "L-asparaginase of *Tetrahymena pyriformis* is Associated with a Kinase Activity", *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 95, pp. 77-87.
- VALCÁRCEL, M., RÍOS, A., 1994, "Analytical Chemistry and Quality", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 13, n. 1, pp. 17-23.
- VALCÁRCEL, M., CÁRDENAS, S., 2002, "We Need Reliable Ways to Bypass Preliminary Operations in (Bio)Chemical Measurement", *Trends in Analytical Chemistry*, v. 21 (4), pp. 211-212.,
- VIIKARI, L. e GISLER, R., (1986), "By-products in the Fermentation of Sucrose by Different *Zymomonas*-strains", *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 23, pp. 240-244.
- VUOLO, J.H., 1999, "Avaliação e Expressão de Incerteza em Medição", *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 21, n. 3, pp. 350-358.
- WADE, H.E., ROBINSON, H.K., PHILLIPS, B.W., 1971, "Asparaginase and Glutaminase Activities of Bacteria", *Journal of General Microbiology*, v. 69, pp. 299-312.
- WEBB, C., ATKINSON, B., 1992, "The Role of Chemical Engineering in Biotechnology", *The Chemical Engineering Journal*, v. 50, pp. B9-B16.

- WILBERG, K.Q., 1996, *Estudo da Produção de Sorbitol e Ácido Glicônico Utilizando Células Permeabilizadas de Zymomonas mobilis*. Tese de Mestrado, Programa de Engenharia Química/COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- WOLF, M., WIRTH, M., PITTNER, F., GABOR, F., 2003, “Stabilisation and Determination of the Biological Activity of L-Asparaginase in Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Nanospheres”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 256, pp. 141-152.
- WRISTON, J., YELLIN, T.O., 1973, “L-Asparaginase: a Review”, pp. 185-248.
- ZHANG, N.; CLARKE, F.; DI TRAPANI, G.; KEOUGH, D.; BEACHAM, I., 1995, “Guinea Pig Serum L-Asparaginase: Purification and immunological Relationship to Liver L-Asparaginase and Serum L-Asparaginases in Other Mammals”, *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 112B, n. 4, pp. 607-612.
- ZHAO, F.; YU, J., 2001, “L-Asparaginase Release from *Escherichia coli* Cells with K_2HPO_4 and Triton X100”, *Biotechnol. Progress*, v. 17, pp. 490-494.
- ZOONEN, P., HOOGERBRUGGE, R., GORT, S.M., WIEL, H.J., KLOOSTER, H. A., 1999, “Some Practical Examples of Method Validation in the Analytical Laboratory”, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 18, n. 9-10, pp. 584-593.