

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE L-ASPARAGINASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA MATA ATLÂNTICA**

SIMONE VON GROLL

**CASCAVEL-PR
2024**

SIMONE VON GROLL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE L-ASPARAGINASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

**CASCADEL-PR
2024**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Von Groll, Simone
Produção e caracterização bioquímica de L-asparaginase
produzida por fungos filamentosos isolados da mata Atlântica
/ Simone Von Groll; orientador Alexandre Maller. -- Cascavel,
2024.
59 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. L-asparaginase. 2. fungos filamentosos. 3.
biotecnologia. I. Maller, Alexandre, orient. II. Título.

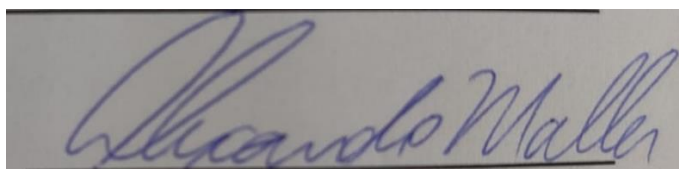
SIMONE VON GROLL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE L-ASPARAGINASE
PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA MATA ATLÂNTICA**

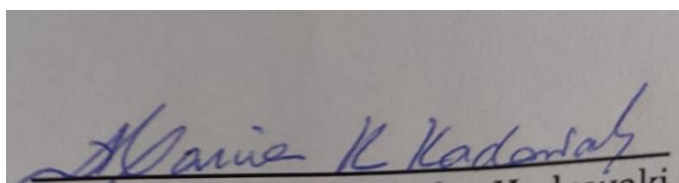
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Maller

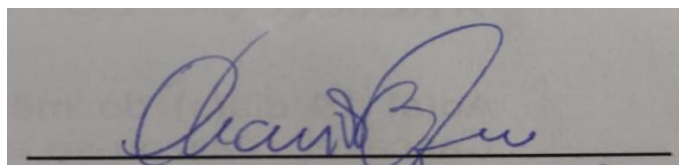
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Alexandre Maller
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
Campus de Cascavel (UNIOESTE)
Orientador



Prof. Dr. Marina Kimiko Kadowaki
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Prof. Dr. Thaís Duarte Bifano
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
Campus de Cascavel (UNIOESTE)

**CASCADEL-PR
2024**

BIOGRAFIA RESUMIDA

Simone Von Groll, natural de Realeza, Paraná, Brasil, nascida no dia 30 de agosto de 1996, possui graduação em Farmácia – Bacharelado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel (2019), pós-graduação *Lato Sensu*, Residência Farmacêutica com especialidade em Farmácia Hospitalar e Clínica, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (2022) e pós-graduação *Lato Sensu* em Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica pelo Centro Universitário União das Américas Descomplica (2022). Atuou como docente no Centro Brasileiro de Cursos Profissionalizantes da área da saúde (2022-2023). Atualmente é discente do programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* da Universidade Federal Latino-Americana (UNILA) e desenvolve projeto experimental de dissertação de mestrado, relacionado a enzima L-asparaginase na linha de pesquisa de Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, orientada pelo Prof. Dr. Alexandre Maller.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser minha força, guia e sustento em todos os momentos da minha vida. Pela sabedoria e coragem que me foram concedidas para superar todos os desafios.

Aos meus pais, Sonia e Bernardo, agradeço por todo amor, apoio e ensinamentos que sempre me ofereceram. Vocês me ensinaram valores que levarei para toda a vida, e cada conquista minha é um reflexo do cuidado e dedicação que sempre tiveram comigo. Sou eternamente grata pelo esforço e pelas oportunidades que me proporcionaram, por acreditarem em mim e me motivarem a sempre dar o meu melhor. E, também ao meu irmão Ricardo, por toda ajuda e cuidados com a Clara.

Agradeço de coração à minha querida filha Clara, que me acompanhou durante e pós gestação na realização do mestrado, que me inspira todos os dias com seu amor e alegria. Você é a luz que me ilumina e a razão pela qual sempre busco ser uma pessoa melhor.

Ao Marcelo, meu companheiro, quero expressar minha profunda gratidão. Obrigada por ser meu porto seguro, por me apoiar nos momentos de incerteza e celebrar comigo as minhas conquistas.

Ao meu orientador Prof. Alexandre, por toda a orientação, paciência e apoio ao longo deste percurso de mestrado. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Professores Marina, José Luiz e Rita por todas as orientações e dicas durante a execução dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Letícia e Wálisson, por terem sido meu braço direito no desenvolvimento dessa pesquisa, bem como, aos meus colegas de mestrado, Vitória, Paula Rother, Tatiane, Paula Rocha, Bruna, Nickson e Pedro. Obrigada por todo o auxílio nos experimentos e por todas as nossas conversas e cafés, que foram essenciais para deixar essa jornada mais fácil e divertida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela bolsa concedida e pelo apoio para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE L-ASPARAGINASE PRODUZIDA POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DA MATA ATLÂNTICA

RESUMO

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é empregada no tratamento de leucemias, notavelmente a Leucemia Linfóide Aguda (LLA), além de encontrar aplicação na indústria de alimentos para mitigar a formação de acrilamida. No entanto, a L-asparaginase disponível para indústria farmacêutica é de origem bacteriana, o que resulta em efeitos adversos e prejudica a eficácia terapêutica. Diante disso, este estudo buscou rastrear fungos filamentosos isolados de fragmento da mata Atlântica do Oeste do Paraná, com o objetivo de identificar um produtor de L-asparaginase. A seleção de fungos produtores de L-asparaginase foi executada utilizando metodologias em meio sólido e líquido. O fungo escolhido passou por avaliação em relação ao meio e tempo de cultivo, fontes de carbono, nitrogênio e suplementação de aminoácidos, a fim de determinar sua influência na atividade enzimática. Empregou-se um delineamento estatístico de Plackett-Burman para investigar os efeitos de sete variáveis na produção de L-asparaginase, seguido por um planejamento de composto central rotacional com 27 ensaios. Além disso, realizou-se a caracterização bioquímica da enzima presente no extrato bruto, definindo as condições ideais de temperatura e pH, bem como procedeu-se à purificação por meio de cromatografia de exclusão molecular, seguida da caracterização bioquímica da enzima. Os cinco fungos avaliados no screening em placa, demonstraram ser produtores de L-asparaginase. A partir dos experimentos de fermentação submersa, destacou-se o fungo *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM como capaz de sintetizar a L-asparaginase, com atividades de 4,79 U/mL e 2,70 U/mL em seus extratos extracelular e intracelular, respectivamente. O meio de cultura de Czapek revelou-se mais adequado para a produção otimizada de L-asparaginase com 120 horas de cultivo. As condições ótimas de cultivo foram estabelecidas por meio de planejamento Plackett-Burman, seguido pelo delineamento composto central rotativo (DCCR). A atividade enzimática máxima (7,14 U/mL) foi obtida após 120 horas de cultivo a 28 °C, com suplementação de 7% de glicose, 1,5% de peptona de galinha e 0,15% de prolina. A faixa ideal para a atividade da enzima no extrato bruto foi em pH 5,0 à 6,0 °C. A purificação parcial da enzima foi alcançada através de cromatografia de exclusão molecular seguida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), resultando em um fator de purificação de 10,4 vezes e uma recuperação de 0,2 %. A atividade máxima da enzima parcialmente purificada foi observada em pH 7,0 e temperatura de 85 °C, além de apresentar estabilidade na faixa de pH 4-6 e termoativação aos 30 minutos de incubação à 95 °C. O composto beta-mercaptoetanol aumentou a sua atividade enzimática em 72,1 %. Os valores aparentes de K_m e V_{max} para hidrólise da asparagina foram 0,011 mmol L⁻¹ e 126,5 mmol L⁻¹ min⁻¹, respectivamente. Em conclusão, os resultados evidenciam o fungo *C. echinulata* PA3S12MM como um potencial produtor de L-asparaginase, a ser explorado em estudos da medicina translacional e para verificar a mitigação de acrilamida em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: L-asparaginase, *screening*; fungo filamentoso; enzima.

PRODUCTION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF L-ASPARAGINASE PRODUCED BY FILAMENTAL FUNGI ISOLATED FROM THE ATLANTIC FOREST

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) is widely used in the treatment of leukemias, particularly Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), and in the food industry to mitigate acrylamide formation. However, the L-asparaginase currently available for pharmaceutical applications is of the bacterial origin, which can result in adverse effects and reduced therapeutic efficacy. Consequently, this study aimed to screen filamentous fungi isolated from a fragment of the Atlantic Forest, from western Paraná, to identify a microorganism capable of producing L-asparaginase. The screening for L-asparaginase-producing fungi was conducted using solid and liquid media methodologies. The selected fungal strain was evaluated for its enzymatic activity under varying culture conditions, including medium composition, incubation time, carbon and nitrogen sources and amino acid supplementation. A Plackett-Burman statistical design was employed to assess the influence of seven variables on L-asparaginase production, followed by optimization using a central composite rotational design (CCRD) comprising 27 trials. Additionally, the enzyme present in the crude extract was biochemically characterized to determine its optimal temperature and pH conditions. Partial purification was performed via size exclusion chromatography, followed by biochemical characterization of the purified enzyme. Plate screening revealed that all five evaluated fungal strains were L-asparaginase producers. Among them, *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM demonstrated superior enzyme production during submerged fermentation, achieving activities of 4.79 U/mL and 2.70 U/mL in the extracellular and intracellular extracts, respectively. The Czapek culture medium was identified as the most suitable for the optimized L-asparaginase production, with maximum activity observed after 120 hours of cultivation. The optimal culture conditions were determined through Plackett-Burman design followed by CCRD optimization. Maximum enzymatic activity (7.14 U/mL) was achieved after 120 hours of cultivation at 28 °C, with supplementation of 7% glucose, 1.5% chicken feathers and 0.15% proline. The crude enzyme extract exhibited optimal activity at pH 5.0 and 60 °C. Partial enzyme purification via size exclusion chromatography and high-performance liquid chromatography (HPLC) resulted in a 10.4-fold purification factor with a recovery yield of 0.2%. The partially purified enzyme demonstrated maximum activity at pH 7.0 and 85 °C and showed stability within a pH range of 4.0-6.0, along with thermoactivation following 30 minutes of incubation at 95 °C. Beta-mercaptoethanol enhanced enzymatic activity by 72.1%. The apparent kinetic parameters for asparagine hydrolysis were determined as $K_m = 0.011 \text{ mmol L}^{-1}$ and $V_{max} = 126.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. In conclusion, the results highlight the *C. echinulata* PA3S12MM as a promising source of L-asparaginase, with potential applications in translational medicine for leukemia treatment and in the food industry for acrylamide mitigation.

KEYWORDS: L-asparaginase, screening; filamentous fungus; enzyme.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enzima L-asparaginase: descobrimento, pesquisa e produção	2
1.2 Aplicação farmacêutica: ação antineoplásica	3
1.3 Aplicabilidade na indústria alimentícia	5
1.4 Produção de L-asparaginase por fungos	6
1.5 <i>Cunninghamella echinulata</i> PA3S12MM	7
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1 Delineamento do estudo	8
3.2 Isolamento e seleção dos microrganismos	8
3.3 Identificação do microrganismo selecionado	8
3.4 Manutenção das linhagens selecionadas e preparo do inóculo	9
3.5 Extração das enzimas extracelulares e intracelulares	9
3.6 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas	9
3.6.1 Teor de proteínas totais	9
3.6.2 Atividade enzimática	9
3.7 Curva de calibração do Reagente Nessler	10
3.8 Screening enzimático de L-asparaginase em meio sólido	11
3.9 Determinação do índice enzimático	11
3.10 Seleção de fungos quanto a produção de L-asparaginase em meio líquido	12
3.11 Otimizações de cultivo	12
3.11.1 Influência dos componentes do meio de cultura sobre a produção enzimática de L-asparaginase	12
3.11.2 Influência de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase	13
3.11.3 Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase	13
3.11.4 Influência da suplementação de aminoácidos na indução da produção enzimática de L-asparaginase	14
3.11.5 Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase	14
3.11.6 Seleção de variáveis para produção de L-asparaginase por <i>C. echinulata</i> PA3S12MM através de planejamento experimental Plackett-Burmann	14
3.11.7 Otimização da produção de L-asparaginase por <i>C. echinulatta</i> PA3S12MM utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR)	15
3.12 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da L-asparaginase produzida por <i>C. echinulata</i> PA3S12MM presente no extrato bruto	16
3.13 Purificação da enzima por meio de colunas cromatográficas	16
3.14 Eletroforese do extrato enzimático	17
3.15 Caracterização bioquímica da L-asparaginase parcialmente purificada	17
3.15.1 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática	17
3.15.2 Especificidade ao substrato	18
3.16 Análise estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19

4.1 Screening enzimático em meio sólido	19
4.2 Seleção de fungos quanto a produção de L-asparaginase extracelular e intracelular em meio líquido	20
4.3 Otimizações de cultivo	21
4.3.1 Efeito do meio de cultura sobre a produção enzimática de L-asparaginase extracelular	21
4.3.2 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase ...	22
4.3.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase	23
4.3.4 Influência da suplementação de aminoácidos na indução da produção enzimática de L-asparaginase	24
4.3.5 Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase	24
4.3.6 Seleção de variáveis dependentes para produção de L-asparaginase por <i>C. echinulata</i> PA3S12MM através de planejamento experimental Plackett-Burmann	25
4.3.7 Otimização da produção de L-asparaginase por <i>C. echinulatta</i> PA3S12MM utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	27
4.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade de L-asparaginase produzida por <i>C. echinulata</i> presente no extrato bruto	31
4.5 Purificação da L-asparaginase	32
4.6 Análise da pureza por eletroforese	33
4.7 Caracterização bioquímica da L-asparaginase parcialmente purificada	33
4.7.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática	33
4.7.2 Especificidade ao substrato	35
4.7.3 Efeito de diferentes compostos na atividade da L-asparaginase	36
4.7.4 Parâmetros cinéticos da L-asparaginase	37
5.CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	38
7.ANEXO.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição meio Czapek Dox Modificado	11
Tabela 2. Meios de cultivo a serem avaliados.....	13
Tabela 3. Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para estudo da otimização de L-asparaginase por PBD	14
Tabela 4. Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para estudo da otimização de L-asparaginase por DCCR	15
Tabela 5. Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman para produção de L-asparaginase em cultivo submerso	25
Tabela 6. Planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase por <i>C. echinulata</i> utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	27
Tabela 7. Tabela ANOVA para produção de L-asparaginase	28
Tabela 8. Etapas da purificação da L-asparaginase extracelular de <i>C. echinulata</i> ...	32
Tabela 9. Efeito de diferentes compostos na atividade da L-asparaginase	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reação catalisada pela L-asparaginase. Adaptado de NARTA <i>et al.</i> (2007). Figura preparada com software ChemSketch®.	2
Figura 2. Ação da L-asparaginase na célula tumoral. Adaptado de (FUGANHOLI, 2021)	4
Figura 3. (a) Controle negativo; (b) PA2S7MM; (c) PA3S12MM; (d) PA2S4MY; (e) PA3S17MC; (f) PA1S2MV.....	19
Figura 4. Índice enzimático dos fungos testados quanto a produção de L-asparaginase em meio sólido	20
Figura 5. Produção de L-asparaginase pelos fungos estudados. (a) Screening enzimático extracelular. (b) Screening enzimático intracelular.....	20
Figura 6. Influência de diferentes meios de cultura em função do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase.....	21
Figura 7. Produção de L-asparaginase por fermentação submersa a 28°C por 120h, utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono (controle positivo: glicose).....	22
Figura 8. Produção de L-asparaginase por fermentação submersa a 28°C por 120h, utilizando diferentes fontes de nitrogênio..	24
Figura 9. Influência da suplementação de aminoácidos ao meio de cultura sob a produção de L-asparaginase.....	24
Figura 10. Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase	25
Figura 11. Variáveis significativas no delineamento de Plackett-Burmann – Diagrama de Pareto.....	26
Figura 12. Gráfico de Pareto para os parâmetros estimados do DCCR para a produção de L-asparaginase.....	29
Figura 13. Gráfico de superfície de resposta para produção de L-asparaginase (U mL ⁻¹): (a) Fonte de nitrogênio X Prolina; (b) Fonte de carbono X Temperatura; (c) Fonte de nitrogênio x Fonte de carbono.....	30
Figura 14. L-asparaginase produzida por <i>C. echinulata</i> PA3S12MM presente no extrato bruto. a) Efeito do pH. b) Efeito da temperatura.....	31
Figura 15. a) Perfil cromatográfico obtido após aplicação do extrato bruto liofilizado em coluna cromatográfica Sephacryl S-100 HR 19.....	32
Figura 16. Análise por SDS-PAGE 10% da L-asparaginase de <i>C. echinulata</i> PA3S12MM	33
Figura 17. Efeito do pH na atividade da L-asparaginase: (a) pH ótimo. (b) Estabilidade ao pH.....	34
Figura 18. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da L-asparaginase: (a) Temperatura ótima. (b) Estabilidade térmica (■) 85 °C; (●) 90 °C e (▲) 95 °C..	35
Figura 19. Especificidade ao substrato pela L-asparaginase de <i>C. echinulata</i>	35
Figura 20. Gráfico de Lineweaver-Burk para L-asparaginase parcialmente purificada de <i>C. echinulata</i> PA3S12MM.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Asp: aspartato
ANOVA: *Analysis of variance* (Análise da variância)
BDA: Batata dextrose ágar
BSA: *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
CLAE: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
DCCR: Delineamento composto central rotacional
DTT: *Dithiothreitol* (Ditiotreitol)
E.C.: *Enzyme Commision*
EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
 F_{cal} : Valor calculado do teste F
 F_{tab} : Valor tabelado do teste F
FDA: *Food and Drug Administration*
GRAS: *Generally recognized as safe* (Geralmente reconhecido como seguro)
HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
His: Histidina
LLA: Leucemia Linfoide Aguda
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
q.s.p.: quantidade suficiente para
SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*
(Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)
Ser: Serina
sp.: Espécie
spp.: Espécies
TCA: ácido tricloroacético

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

mmol L⁻¹: Milimol por litro
rpm: Rotação por minuto
mL: Mililitro
μmol: Micromol
mol L⁻¹: Mol por litro
mg mL⁻¹: Miligrama por mililitro
g: Grama
μL: Microlitro
V: Volt
mA: Miliampére
kDa: Kilodalton
K_m: Constante de Michaelis
V_{máx}: Velocidade máxima
nm: Nanômetro
mL min⁻¹: Mililitro por minuto
U mL⁻¹: Unidade de atividade enzimática por mililitro
R²: Coeficiente de determinação
p: Nível de significância
U mg⁻¹: Unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína
U: Unidade de atividade enzimática
mmol L⁻¹ min⁻¹: Milimol por litro por minuto
s⁻¹: Por segundo
mmol L⁻¹ s⁻¹: Milimol por litro por segundo

1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase ou L-asparagina amidohidrolase – E.C. 3.5.1.1. (BARRETT; TIPTON, 1997) é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise da asparagina, produzindo ácido L-aspártico e amônia (PARIZOTTO, 2018). Possui aplicações importantes na indústria farmacêutica, como no tratamento da leucemia linfoblástica aguda ou leucemia linfóide aguda (LLA) e, estudos clínicos apontam sua eficácia em tratamentos quimioterápicos de melanossarcoma, leucemia mielonocítica, linfoma de Hodking e linfossarcoma (ZUO *et al.*, 2015b).

A LLA é uma neoplasia maligna caracterizada pelo acúmulo de linfócitos imaturos na medula óssea (MEDICAL *et al.*, 2024). Células neoplásicas sintetizam em exíguas quantidades a enzima asparagina L-sintetase e por isso são incapazes de produzirem L-asparagina em níveis regulares, enquanto células humanas normais possuem essa capacidade de produção. Essa diferença metabólica entre células neoplásicas e células normais possibilita o uso de L-asparaginase no tratamento de câncer, uma vez que, a asparaginase esgota rapidamente os níveis extracelulares de asparagina bloqueando o metabolismo normal das células neoplásicas e impedindo a síntese de proteínas, de DNA e RNA, dessa forma inibindo a proliferação celular (TRIMPONT *et al.*, 2022).

Esta patologia é responsável por 30-35% das neoplasias diagnosticadas em crianças (MATIAS, 2019). Atualmente, a enzima L-asparaginase é o principal tratamento utilizado na LLA, com cerca de 90% de cura entre as crianças (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

Além da importante atuação como biofármaco, descobriu-se a aplicação da enzima na indústria de alimentos, onde atua na redução de uma neurotoxina, altamente cancerígena produzida durante o processamento de alimentos, como a acrilamida proveniente da fritura da batata, formada por meio da reação de Maillard em alimentos ricos em açúcares redutores na presença de L-asparagina, durante o processamento térmico (SANIA *et al.*, 2024).

A L-asparaginase pode ser produzida por diversos seres vivos, tais como bactérias, fungos e algas. Atualmente a enzima utilizada no tratamento quimioterápico têm sido produzida através de fermentação submersa pelas bactérias *Escherichia coli*, na sua forma nativa ou peguilada (ligação covalente a um grupo de polietilenoglicol) e pela *Erwinia chrysanthemi* (PARASHIVA *et al.*, 2023). A disponibilidade de L-asparaginase de origem bacteriana de certa forma impacta o tratamento de LLA devido à dificuldade na produção a partir da extração intracelular das bactérias, o que

torna sua purificação onerosa, além de comumente ocorrerem reações adversas durante a administração, devido a imunogenicidade em decorrência de sua origem procarionte (MAHAJAN *et al.*, 2013).

Dentre os fungos produtores da L-asparaginase já relatados na literatura, pode-se destacar *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (DA CUNHA MC *et al.*, 2022; KHALIL; RODRIGUEZ-COUTO; EL-GHANY, 2021; NS; HK, 2013; SA, 2022) que possibilitam contornar os quadros de reações adversas devido a hipersensibilidade imunológica durante o tratamento quimioterápico de LLA com L-asparaginase bacteriana (MENEGUETTI, 2017).

Nesse cenário, buscaram-se novas fontes de produção dessa enzima na biodiversidade brasileira. A mata Atlântica, floresta tropical, situada na América do Sul e se distribui ao longo do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (CERQUEIRA; SOUSA, 2024). No Brasil, é constituída por um conjunto de formações florestais que atualmente compreende cerca de 11% da área florestal original, com a maioria dos remanescentes fragmentados e distantes geograficamente (BENCHIMOL *et al.*, 2016). A região de fragmentos da mata Atlântica é vista com potencial para descoberta de organismos eucariontes como os fungos filamentosos produtores de enzimas, por esse motivo, torna-se viável selecionar fungos filamentosos do solo e investigar sua capacidade de produção de L-asparaginase, contribuindo dessa forma para o avanço da biotecnologia brasileira (CÂNDIDO, 2015).

1.1 Enzima L-asparaginase: descobrimento, pesquisa e produção

A L-asparagina é um aminoácido não essencial que possui papel crucial para o desenvolvimento e crescimento celular, pois é necessário no processo de síntese de proteínas (MARTINEZ-OUTSCHOORN *et al.*, 2017).



Figura 1. Reação catalisada pela L-asparaginase. Adaptado de NARTA *et al.* (2007). Figura preparada com software ChemSketch®.

O mecanismo de ação genérico da L-asparaginase é análogo ao mecanismo clássico das serina-proteases, cujas atividades dependem de um grupo de aminoácidos, conhecidos como tríade catalítica: serina, histidina e aspartato. Essa

tríade consiste em um aminoácido nucleofílico (Ser), uma base (His) e um aminoácido de natureza ácida (Asp), todos interligados por meio de ligações de hidrogênio. O processo catalítico ocorre em duas etapas consecutivas. Na primeira etapa, o resíduo nucleofílico da enzima, ativado por uma base forte, empreende uma reação de ataque no átomo de carbono amida do substrato, resultando na formação de um produto intermediário conhecido como beta-acil-enzima, que passa por uma fase intermediária tetraédrica. A segunda etapa da reação é análoga, porém, o ataque no carbono éster ocorre através da ação de um nucleófilo ativado por uma molécula de água (CACHUMBA *et al.*, 2016).

A hidrólise da L-asparagina foi observada pela primeira vez em músculo bovino (LANG, 1904) e posteriormente confirmada a mesma quantidade de atividade enzimática em órgãos de cavalos e suínos (FURTH, O.; FRIEDMANN, 1910). Além disso, relatou-se a atividade dessa enzima em experimentos utilizando soro de mamíferos e observou que o soro de porquinhos-da-índia apresentava essa atividade enzimática (CLEMENTI, 1922).

Anos mais tarde observou pela primeira vez que os linfomas em ratos e camundongos recidivavam após o tratamento com soro de suíno (KIDD, 1953). Apesar da potencialidade terapêutica da enzima L-asparaginase proveniente do soro suínos, seu uso clínico foi desconsiderado devido produção limitada e aos efeitos colaterais.

Dessa forma, na busca por fontes bacterianas, identificou-se duas isoenzimas de L-asparaginase em *Escherichia coli*. O tipo I inclui as enzimas citosólicas de baixa afinidade pela L-asparagina e tipo II localizadas no espaço periplasmático, com expressão induzida por anaerobiose, além de alta afinidade pela L-asparagina com potencial atividade antineoplásica e capacidade de produção em larga escala (SRIKHANTA *et al.*, 2013).

1.2 Aplicação farmacêutica: ação antineoplásica

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é caracterizada pela intensa produção de leucócitos e acomete principalmente pacientes com idade entre 2 à 4 anos. Cerca de 50% dos casos acometem indivíduos do sexo masculino. A patogenia que ocasiona a LLA ainda é desconhecida, em alguns casos a doença é hereditária, associada a síndromes genéticas, como Síndrome de Down e de Bloom ou devido a exposições a algumas radiações ionizantes e a medicamentos quimioterápicos (AMARAL;

PUGGINA, 2024). A L-asparaginase é comumente usada como uma droga quimioterápica combinada para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) em adultos e crianças e linfoma não-Hodgkin em crianças (DORIYA; KUMAR, 2016).

Novos tratamentos antineoplásicos vem sendo explorados, como o estudo desenvolvido com L-asparaginase produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* em ensaio anti-proliferativo com linhagem de células de câncer de mama humano MDA-MB-231 foi observado que 71%, 87,7% e 96,5% de morte celular ocorreram quando administraram-se 5, 10 e 20 UI de droga, respectivamente (DANI BENCHAMIN, SREEJAI R, SUJITHA S, JENSY ROSHAN F, 2019)

A administração de L-asparaginase reduz as concentrações plasmáticas de L-asparagina de forma completa, privando os blastos leucêmicos desse aminoácido, resultando na redução da síntese proteica e dessa forma, morte das células leucêmicas. O tratamento é caracterizado por três fases: indução ou remissão da indução, consolidação ou intensificação e manutenção (SOUZA, 2019).

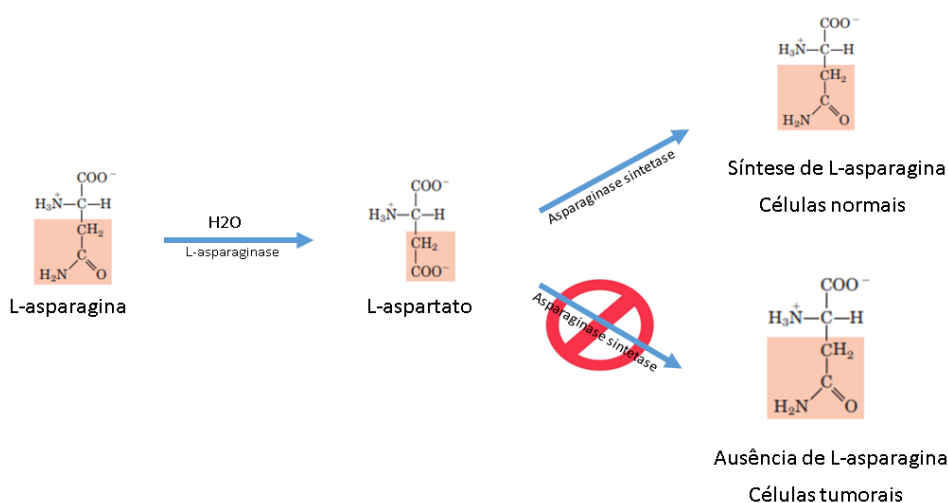


Figura 2. Ação da L-asparaginase na célula tumoral. Adaptado de (FUGANHOLI, 2021).

Atualmente, existem 3 preparações de L-asparaginase aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos para tratamento dos pacientes com LLA. As obtidas da *Escherichia coli* que são a L-asparaginase nativa e a L-asparaginase peguillada (PEG-asparaginase) e a L-asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi*, que possuem a mesma ação, no entanto, com propriedades farmacológicas diferentes (RIZZARI *et al.*, 2013).

A enzima asparaginase está associada a reações de hipersensibilidade, devido a produção de anticorpos anti-asparaginase, sendo observado em até 60% dos pacientes em algum período do tratamento com L-asparaginase de *E. coli*, sendo mais comum com a forma nativa quando comparada e enzima peguilada. Dentre os sintomas de hipersensibilidade mais comuns apresentados pelos pacientes, inclui-se a anafilaxia, dor, edema, urticária, eritema, erupção cutânea e prurido (SILVA, 2023).

1.3 Aplicabilidade na indústria alimentícia

Em 2002, descobriu-se altos teores de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos, processados em altas temperaturas. A acrilamida é formada pela reação entre açúcares redutores e L-asparagina, resultando na formação de N-glicosilasparagina, através da reação de Maillard (LIMA et al., 2022). Como resultado do tratamento em altas temperaturas, devido à fritura, cozimento ou grelha de alimentos ricos em amido, formará uma base de Schiff descarboxilada, que pode se decompor diretamente para formar acrilamida (ZUO et al., 2015a).

Sabe-se que a acrilamida causa danos à saúde humana, devido seu potencial neurotóxico, genotóxico e cancerígeno (MOHAN KUMAR et al., 2014). Estratégias para redução na produção de acrilamida durante processamento industrial, como alteração da composição do produto, otimização das condições de produção, bem como pré-tratamento enzimático, como forma simples e eficaz na redução de acrilamida em alimentos, sem afetar as propriedades nutricionais e sensoriais (KHALIL; RODRÍGUEZ-COUTO; EL-GHANY, 2021).

A enzima L-asparaginase por sua vez, devido sua atividade hidrolítica em relação ao aminoácido L-asparagina, gerando ácido aspártico e amônia, torna-se uma escolha promissora, visto que impede a participação dela na reação de Maillard, desse modo inibindo significativamente a formação de acrilamida (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

Atualmente, a indústria alimentícia de batatas processadas, produtos de panificação, café solúvel entre outros, faz uso da L-asparaginase proveniente dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* (ADEBO, 2017; MUNEER et al., 2020) sendo desativada durante o processamento, devido ao aquecimento, garantindo sua aplicação segura, mas de certa forma diminuída, impulsionando novos estudos na direção de se obter L-asparaginase termoestável (SANIA et al., 2024).

Dentre os alimentos beneficiados com o tratamento enzimático para redução da formação de acrilamida, tem-se os grãos de café. Em estudo desenvolvido com L-L-asparaginase produzida por *Penicillium crustosum* NMKA 511 e grãos de café claro obtidos por torra a 210°C por 20 minutos e com grãos de café escuro obtidos por torra a 240°C por 25 minutos. Comparado com o controle, o teor de acrilamida dos grãos torrados claros e torrados escuros tratados com a enzima foi reduzido para 80,7% e 75,8%, respectivamente (KHALIL; RODRÍGUEZ-COUTO; EL-GHANY, 2021).

1.4 Produção de L-asparaginase por fungos

Em decorrência da sua importância como fármaco, a procura por novas fontes de L-asparaginase tem sido alvo de muitas pesquisas, com o objetivo de se obter enzimas microbianas que apresentem menos efeitos adversos. Os fungos filamentosos apresentam uma proximidade evolutiva maior com os seres humanos do que as bactérias e, aparentemente, isso minimiza os efeitos secundários da L-asparaginase fúngica (HUANG *et al.*, 2014).

Várias espécies de fungos filamentosos são conhecidas pela produção de L-asparaginase, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* (DANI BENCHAMIN, SREEJAI R, SUJITHA S, JENSY ROSHAN F, 2019; EL-GENDY *et al.*, 2021; HAMED; OSMAN; ATES, 2021; KHALIL; RODRÍGUEZ-COUTO; EL-GHANY, 2021).

Em estudo realizado por FREITAS *et al.*, 2021, 39 fungos foram isolados do Cerrado brasileiro e avaliados quanto a produção de L-asparaginase. Destes, 27 tiveram crescimento em placa contendo L-asparagina, na triagem semiquantitativa. Na triagem quantitativa, os maiores valores de atividade enzimática da L-asparaginase e menor atividade de glutaminase foram obtidos dos fungos *Penicillium sizovae* e *Fusarium proliferatum*.

A região da mata Atlântica é vista como potencial para descoberta de fungos produtores de diversas enzimas com aplicações farmacêuticas. Por esse motivo, busca-se selecionar fungos filamentosos e investigar sua capacidade quanto a produção da enzima L-asparaginase. Considerando a incidência de leucemia linfóide aguda em crianças menores de 5 anos e o seu tratamento com L-asparaginase, bem como o desenvolvimento de hipersensibilidade associada a enzima de origem bacteriana, risco de desabastecimento e a necessidade da obtenção de uma enzima com características vantajosas em relação ao seu custo e aos efeitos adversos.

1.5 *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM

Apesar do amplo conhecimento sobre L-asparaginase produzidas por diferentes espécies de fungos filamentosos, até o momento, a produção desta enzima por *C. echinulata* foi abordada somente em um ensaio de screening, sem caracterização bioquímica (RAMOS *et al.*, 2024).

Este fungo, classificado como *C. echinulata*, pertence ao filo *Mucoromycota*, à classe *Mucoromycetes*, à ordem *Mucorales* e à família *Cunninghamellaceae* (NCBI Taxonomy). É importante destacar que os esporângios dessa espécie são maiores em comparação com outras espécies do mesmo gênero, apresentando uma superfície coberta por espinhos compostos principalmente por oxalato de cálcio (ELKHATEEB; ELNAHAS, 2021).

As enzimas desempenham um papel fundamental na vida celular, catalisando reações químicas essenciais para o metabolismo dos organismos. Dentro dessa diversidade enzimática, *C. echinulata* emerge como um microrganismo produtor de enzimas com potencial biotecnológico. A capacidade dessa espécie fúngica em sintetizar uma variedade de enzimas com notáveis propriedades funcionais tem despertado a atenção dos pesquisadores. Estudos prévios têm se dedicado à exploração das enzimas produzidas por *C. echinulata*, visando suas possíveis aplicações industriais e biotecnológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Rastrear a produção da enzima L-asparaginase por diferentes isolados de fungos provenientes de um fragmento da mata Atlântica do Oeste do Paraná e caracterizar essa molécula bioquimicamente do fungo com maior produção.

2.2 Objetivos específicos

- Rastrear fungos produtores de L-asparaginase em meio sólido;
- Selecionar a linhagem com maior produção de L-asparaginase;
- Otimizar condições de cultivo para produção de L-asparaginase com o fungo selecionado;
- Purificar L-asparaginase por meio de colunas cromatográficas;

- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada quanto ao pH e temperatura ótima, à especificidade do substrato, ao efeito de íons e determinados compostos sobre a atividade enzimática e aos parâmetros cinéticos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Esta investigação é de natureza aplicada, adotando uma abordagem quantitativa, descritiva e experimental. Após a identificação do fungo produtor de L-asparaginase, a população de interesse foi composta por todas as proteínas sintetizadas por esse organismo. As amostras foram delimitadas para incluir exclusivamente a enzima L-asparaginase produzida por esse fungo.

3.2 Isolamento e seleção dos microrganismos

As amostras de solo foram coletadas previamente em uma plantação próxima a um fragmento de mata Atlântica, localizada no município de Nova Aurora (PR) (RASBOLD *et al.*, 2021), entre 24° 32' 00" Sul e 53° 15' 10" Oeste, com 520 m de altitude em relação ao nível do mar e armazenados na Coleção de Fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel. Os fungos filamentosos foram isolados e selecionados de acordo com a maior produção de proteínas gerais já caracterizadas anteriormente (SCHMITT *et al.*, 2020), sem identificação de espécie ou gênero.

3.3 Identificação do microrganismo selecionado

A identificação do microrganismo foi descrita previamente (RASBOLD *et al.*, 2021) pelo sequenciamento da região não codificadora ITS (Internal Transcrib Spacer) do RNA ribossômico pela técnica de Sanger, realizado pela empresa Helixxa® (Campinas-SP) (WHITE *et al.*, 1990). A determinação da espécie foi realizada comparando-se a sequência obtida com a depositada pelo Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), utilizando a ferramenta BLAST. A sequência da região ITS1 do fungo *C. echinulata* PA3S12MM está depositada sob o número de acesso MN699284 no GenBank do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (RASBOLD, 2020). *C. echinulata* PA3S12MM estava armazenada na coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel.

3.4 Manutenção das linhagens selecionadas e preparo do inóculo

As cepas foram mantidas por meio da utilização de tubos de ensaio esterilizados contendo meio de cultivo BDA (batata dextrose ágar), incubados à 28 °C durante 8 dias. As cepas selecionadas foram preservadas pelo método de Castellani (URDANETA M.; LACAZ, 1965) em temperatura ambiente. O inóculo foi obtido a partir de cultura de BDA, no qual 5 mL solução de Tween 80 foram adicionados, resultando em uma suspensão homogênea de esporos. Posteriormente, realizou-se a contagem do número de esporos presentes na solução em câmara de Neubauer. Onde padronizou-se o volume de 1,5 mL para ser adicionado aos meios de cultura em triplicata.

3.5 Extração das enzimas extracelulares e intracelulares

Os cultivos foram submetidos a filtração a vácuo usando um funil de Buchner e papel filtro, resultando em um filtrado extracelular livre de células e micélio. O filtrado resultante foi dividido em alíquotas para a posterior análise de proteínas e atividade enzimática extracelular. A porção de micélio foi congelada e, posteriormente, triturada usando um gral de porcelana e pistilo. Para atingir uma consistência homogênea, foi adicionado um volume igual de areia previamente tratada com solução sulfocrômica, com uma proporção de 1:1, enquanto mantido em banho de gelo. A seguir, aproximadamente 10 mL de água deionizada foram adicionados ao tubo Falcon contendo a mistura triturada, após o qual o tubo foi centrifugado a 4000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O material precipitado foi descartado e o líquido claro sobrenadante foi coletado para ser utilizado nas dosagens subsequentes. Ambas as porções, o micélio e o filtrado extracelular, foram empregados para determinar a atividade enzimática.

3.6 Determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas

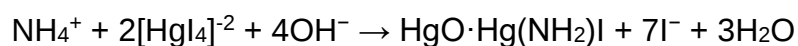
3.6.1 Teor de proteínas totais

A quantificação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por (BRADFORD, 1976), utilizando-se albumina de soro bovina (BSA) como padrão. A concentração proteica foi expressa como miligrama (mg) de proteína por mililitro (mL) de amostra.

3.6.2 Atividade enzimática

Durante essa etapa, foram utilizados tanto o filtrado como o extrato intracelular para avaliação da atividade das enzimas extracelulares e intracelulares, respectivamente.

A determinação da concentração de amônio no filtrado das culturas permite um acompanhamento indireto da hidrólise do substrato L-asparagina e sugere a expressão da atividade enzimática. Para a dosagem de amônio utilizou-se a metodologia de Nessler adaptada (A. IMADA, S. IGARASI, 1973). O reagente de Nessler é uma solução de iodeto de mercúrio em meio alcalino que, em contato com íons amônio (NH_4^+), forma um complexo amarelo de óxido de mercúrio-amidoiodeto de mercúrio, conforme equação abaixo:



Equação 1

A intensidade dada pela cor amarela deste complexo é proporcional à concentração inicial de amônio, gerando uma correlação entre o íon e a absorbância em 450 nanômetros (nm).

Para a dosagem, 100 μL de solução 0,1 M de L-asparagina, 160 μL de tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e 40 μL de extrato enzimático foram incubados a 37 °C durante 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 100 μL de solução 1,5 M de ácido tricloroacético. Para fins de calibração do espectrofotômetro, foi preparado outro meio reacional com a adição do meio de cultura sem inocular o fungo, no lugar da enzima, denominado como branco meio. Para a quantificação da amônia liberada, uma alíquota de 25 μL da mistura de reação foi adicionada à 200 μL de água destilada e 25 μL de reagente de Nessler. Após 15 minutos ao abrigo de luz mediu-se a absorbância a 450 nm em espectrofotômetro. A atividade da enzima foi expressa em U mL^{-1} , onde uma unidade de atividade de enzima (U) ficou definida como a quantidade de enzima que libera 1,0 μmol de amônia por minuto sob as condições de ensaio padrão.

3.7 Curva de calibração do Reagente Nessler

Foi empregada uma curva analítica utilizando sulfato de amônio para a quantificação da amônia liberada. A solução de calibração foi preparada em triplicata por meio da diluição de uma solução mãe de sulfato de amônio 100 mM abrangendo as seguintes concentrações: 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 e 4 mmol. Em seguida, 200 μL da

solução foram pipetados na microplaca de leitura do espectrofotômetro, sendo acrescidos 25 µL das respectivas diluições e 25 µL do reativo de Nessler. Após um período de espera de 15 minutos, a leitura foi realizada a 450 nm. Por fim, os dados foram utilizados para construir um gráfico exibindo a curva de calibração do reagente, com um valor R^2 correspondente.

3.8 Screening enzimático de L-asparaginase em meio sólido

Para a triagem da enzima foi realizado um ensaio rápido em placa para triagem de microrganismos produtores de L-asparaginase (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997) com meio Czapek Dox's modificado (Tabela 1), sendo ajustado pH para 6,2, antes da adição do corante vermelho de fenol e ágar. Após a preparação dos meios, foi realizado o inóculo depositando-se os esporos fúngicos, com o auxílio de uma alça estéril, no centro do meio contido na placa, com a mesma invertida. O ensaio foi conduzido em triplicata, com concentração do corante de vermelho de fenol a 0,0012%. As placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias.

A formação de uma zona vermelha ao redor da colônia indica atividade de L-asparaginase, caracterizando o fungo como produtor da enzima. O vermelho de fenol é um indicador de pH o qual muda de uma coloração amarela em condições ácidas para uma coloração vermelha em condições básicas/alcalinas. Logo, o surgimento do halo vermelho ao redor da colônia indica alteração do pH, que pode ter sido gerado a partir do acúmulo de amônia no meio (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997).

Tabela 1. Composição meio Czapek Dox Modificado

Glicose	0,2%
L-asparagina	1%
NH ₄ NO ₃	0,2%
KH ₂ PO ₄	0,152%
KCl	0,052%
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,052%
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0001%
CuSO ₄ . 7H ₂ O	0,0001%
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,0001%
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Ágar	2%
Vermelho de fenol	0,0012%

3.9 Determinação do índice enzimático

As medições dos diâmetros dos halos de hidrólise e das colônias foram realizadas com auxílio de paquímetro (cm) no verso das placas de Petri, em cruz, calculando-se a média, a cada 24 horas.

A atividade enzimática extracelular da L-asparaginase foi avaliada pelo nível de degradação do substrato específico considerando o diâmetro dos halos de degradação, sendo os resultados expressos através de índice enzimático (IE).

$$IE = \frac{DH}{DC}$$

Equação 2

Onde IE corresponde ao índice enzimático, DH diâmetro do halo de hidrólise e DC diâmetro da colônia. O índice enzimático expressou a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia correspondente (FLORENCIO; COURI; FARINAS, 2012). Assim, um aumento no IE reflete uma maior atividade enzimática.

3.10 Seleção de fungos quanto a produção de L-asparaginase em meio líquido

Após a verificação do IE, procedeu-se a fermentação submersa para quantificação da atividade enzimática. Foram utilizados 25 mL de caldo Czapek Dox modificado (glicose 0,2%; prolina 2%; NH_4NO_3 2%; KH_2PO_4 1,52%; KCl 0,52%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,52%; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001%), com pH ajustado para 8,5 em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Para cada linhagem foram feitos cultivos em triplicata. Os frascos contendo o meio foram previamente esterilizados em autoclave por 30 min (121°C). Após resfriamento, foi inoculado 1,5 mL da suspensão de esporos e o cultivo foi mantido estático a 28 °C, por 120 h. A cada 24 horas foram coletadas alíquotas de 1000 µL dos cultivos, que foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida realizou-se a determinação de atividade enzimática, conforme item 3.5.2.

3.11 Otimizações de cultivo

3.11.1 Influência dos componentes do meio de cultura sobre a produção enzimática de L-asparaginase

A fim de otimizar a produção de L-asparaginase, o fungo selecionado a partir do screening em placa e cultivo submerso, *C. echinulata* PA3S12MM foi inoculado nos meios de cultura Adams, Czapek e Klausen com composições distintas, suplementados diariamente com 500 µL sacarose 1% em triplicata. Os cultivos foram

incubados em estufa do tipo BOD à 28 °C por 144 horas sob regime estacionário, sendo retiradas alíquotas a cada 24 horas para determinação da atividade enzimática e quantificação de proteínas. Os meios testados e suas composições estão descritos na Tabela 2 a seguir:

Tabela 2. Meios de cultivo a serem avaliados

Componentes	Adams	Czapek	Klausen
KH_2PO_4	0,1g	1g	-
KCl	-	0,05g	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,05g	0,05g	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	-	0,001g	-
CaCO_3	-	-	0,1g
Extrato de levedura	0,2g	0,1g	0,1g
Peptona	-	-	0,1g
NaCl	-	-	0,5g
Gelatina	-	-	0,25g
Água destilada	100mL	100mL	100mL
Referências	(ADAMS, 1990)	(WISEMAN, 1975)	(PERALTA, M; TERENZI; JORGE, 1990)

3.11.2 Influência de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase

A melhor fonte de carbono para produção de L-asparaginase a partir de *C. echinulata* PA3S12MM foi avaliada utilizando-se os seguintes substratos alternativos a 1%: bagaço de cana, casca de banana, casca de laranja, casca de mandioca, casca de batata, farelo de trigo, farinha de soja, glicose, lactose, folhas de *Ora-pro-nóbis*, palha de soja e sorgo. Os resíduos agroindustriais utilizados na fermentação submersa servem como fonte de nutrientes, fornecendo os componentes necessários para o desenvolvimento do microrganismo. Normalmente, estes substratos são subprodutos e diferem entre si na sua composição (MANAN; WEBB, 2017). Foi realizado cultivo submerso em triplicata, durante 144 horas à 28 °C, utilizando-se o meio de cultivo já definido no experimento anterior.

3.11.3 Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase

O efeito das fontes de nitrogênio foi estudado preparando meio Czapek com a fonte de carbono previamente definida, usando seis fontes diferentes de nitrogênio, (aspargo, caseína, pena de galinha, peptona, extrato de carne, triptona) e uma triplicata sem adição de fonte de nitrogênio. Cada uma das fontes de nitrogênio

testadas foi incorporada em 25 mL de meio Czapek em Erlenmeyer de 125 mL, na concentração de 0,4% a 28 °C por 144 horas. A fonte de nitrogênio que induziu a maior produção de L-asparaginase foi considerada como ideal para estudos subsequentes.

3.11.4 Influência da suplementação de aminoácidos na indução da produção enzimática de L-asparaginase

O efeito da suplementação dos aminoácidos Asparagina, Arginina e Prolina a 0,2 % foi avaliado em meio Czapek, após a definição da fonte de carbono e nitrogênio, em cultivo submerso contendo 25 mL em Erlenmeyer de 125 mL, em cultivo a 28 °C por 144 horas.

3.11.5 Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase

Foi realizado cultivo submerso estacionário em triplicata, durante 144 horas à 28 °C, utilizando meio CzapeK, com fontes de carbono, nitrogênio e aminoácidos já definidos. Retirou-se alíquotas de 500 µL a cada 24h para determinação da atividade enzimática e proteínas para verificar o melhor tempo de cultivo para produção de L-asparaginase.

3.11.6 Seleção de variáveis para produção de L-asparaginase por *C. echinulata* PA3S12MM através de planejamento experimental Plackett-Burmann

Planejamento de Plackett-Burman (PBD) foi proposto para identificar as variáveis mais importantes na produção de L-asparaginase neste modelo, sendo estas avaliadas em dois níveis com triplicata no ponto central, como mostrado na Tabela 3. A fermentação submersa foi realizada em triplicata em Erlenmeyer contendo 25 mL de meio Czapek-Dox (0,15% K₂HPO₄, 0,052% KCl, 0,052% MgSO₄, 0,001% FeSO₄, 0,001% ZnSO₄, 0,001% CuSO₄) (p/v). Sete variáveis independentes foram estudadas: glicose (X1), pena de galinha (X2), L-asparagina (X3), L-prolina (X4), L-arginina (X5), temperatura °C (X6) e tempo de cultivo em horas (X7).

Tabela 3. Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para estudo da otimização de L-asparaginase por PBD

Variável independente	Fator	Níveis e valores		
		-1	0	+1

Fonte de Carbono (%)	X ₁	3	4	5
Fonte de Nitrogênio (%)	X ₂	1	2	3
L-asparagina (%)	X ₃	0,1	0,2	0,3
L-prolina (%)	X ₄	0,1	0,2	0,3
L-arginina (%)	X ₅	0,1	0,2	0,3
Temperatura (°C)	X ₆	22	28	34
Tempo de Incubação (h)	X ₇	96	120	144

Todas as culturas foram inoculadas com 1500 µL de solução de esporos preparadas com solução de Tween 80% após esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos e incubados sob crescimento estacionário. Três repetições nos pontos centrais foram adicionadas para verificar a reprodutibilidade do ensaio, totalizando 15 corridas. Após o período de incubação, o meio de cultura foi filtrado e procedeu-se a dosagem enzimática conforme item 3.5.2. Os resultados foram analisados através do software Statistica versão 10.0 e as variáveis que apresentaram $p \leq 0,05$ no gráfico de Pareto foram consideradas estatisticamente significativas na produção de L-asparaginase.

3.11.7 Otimização da produção de L-asparaginase por *C. echinulatta* PA3S12MM utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR)

O delineamento composto central rotacional (DCCR) e metodologia de superfície de resposta foram empregados para otimizar a produção de L-asparaginase a partir de fatores previamente selecionados por planejamento Plackett-Burman. A matriz de DCCR (2⁴) foi construída utilizando as variáveis glicose (x1), temperatura (x2), prolina (x3) e pena de galinha (x4) incluindo 3 repetições nos pontos centrais e seis pontos axiais (Tabela 4).

Tabela 4. Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para estudo da otimização de L-asparaginase por DCCR

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores				
		-2	-1	0	+1	2
Glicose (%)	X1	1	3	5	7	9
Temperatura (°C)	X2	10	16	22	28	34
L-Prolina (%)	X3	0	0,15	0,3	0,45	0,6
Pena de galinha (%)	X4	0	1,5	3	4,5	6

A resposta para as variáveis, onde Y representa a atividade da L-asparaginase, pode ser aproximada pela equação polinomial:

$$Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{14}X_1X_4 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 + \beta_{44}X_4^2$$

Equação 3

Onde β_0 é o intercepto; β_1 , β_2 , β_3 e β_4 são os coeficientes de primeira ordem do modelo; β_{12} , β_{13} , β_{14} e β_{23} são os coeficientes de interação; e β_{11} , β_{22} , β_{33} e β_{44} são os coeficientes de segunda ordem do modelo.

O teste t de Student foi usado para verificar a significância estatística dos coeficientes de regressão e o programa Statistica 10.0 foi utilizado para analisar os dados experimentais

3.12 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade da L-asparaginase produzida por *C. echinulata* PA3S12MM presente no extrato bruto

A influência do pH na atividade enzimática foi verificada solubilizando o substrato da reação (asparagina 0,04 mol L⁻¹) em tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ (MCILVAINE, 1921), variando o pH entre 3,0 e 8,0, seguido pela dosagem de atividade enzimática.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi investigado através da dosagem em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 90°C. O substrato da reação foi solubilizado em tampão Tris-HCl 0,05 mol L⁻¹ pH 8.

3.13 Purificação da enzima por meio de colunas cromatográficas

O extrato bruto foi liofilizado e equilibrado com tampão citrato de sódio 0,02 mol L⁻¹ (pH 5) e aplicado 900 µL na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR, previamente equilibrada com tampão citrato de sódio 0,02 mol L⁻¹ (pH 5). Frações de 1 mL foram coletadas, sendo determinadas a atividade enzimática (450 nm) e conteúdo de proteínas (280 nm). As frações que apresentaram alta atividade foram reunidas e a nova amostra foi liofilizada e filtradas em membrana microporosa 0,22 µm, para posterior aplicação coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl TM S-200 HR (GE Healthcare), em sistema Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo LC-20 Shimadzu, tendo como fase móvel tampão citrato de sódio 20 mM pH 5. A coluna cromatográfica foi submetida a uma etapa de limpeza,

conforme essa sequência: 120 mL de NaOH 200 mM, 60 mL de NaOH 500 mM e 240 mL de água deionizada. Após, ela foi equilibrada com 240 mL da mesma solução da fase móvel. Foram injetados 100 μ L de amostra previamente concentrada por liofilização, com um fluxo de corrida de 0,8 mL/minuto. O comprimento de onda utilizado para leitura no aparelho foi de 280 nm sendo que as frações que apresentaram absorbância diferente de 0 foram coletadas e dosadas para atividade enzimática, conforme item 3.5.2. Todas as etapas de purificação foram conduzidas à 4 °C.

3.14 Eletroforese do extrato enzimático

O extrato bruto foi clareado por ultrafiltração com membrana de 30 kDa em Vivaspin® e o filtrado foi ultracentrifugado em membrana de 10 kDa. Foram utilizados 2 mL de extrato bruto da amostra por ciclo de centrifugação por 20 minutos a 10.000 *g*, sob temperatura de 4 °C. O concentrado ultracentrifugado em membrana de 10 kDa foi aplicado na eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) descrito por (U.K. LAEMLLI, 1970). A eletroforese foi desenvolvida em temperatura ambiente sob tensão de 120 V e uma corrente elétrica de 20 mA. Foi utilizado marcador de peso molecular Thermo Scientific™ PageRuler™ Plus de 10 a 250 kDa. Após a corrida, o gel foi revelado com coloração de nitrato de prata.

3.15 Caracterização bioquímica da L-asparaginase parcialmente purificada

3.15.1 Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A influência do pH foi avaliada através da reação conduzida com o substrato asparagina 0,1 mol L⁻¹ com tampão citrato-fosfato 0,1 mol L⁻¹ (MCILVAINE, 1921), na faixa de pH entre 4,0 e 8,0. O efeito do pH na estabilidade enzimática foi avaliado pela incubação da enzima sem substrato no mesmo tampão e pH a 4 °C durante 24 horas. Após esse período, a atividade enzimática residual (A. IMADA, S. IGARASI, 1973) foi determinada no pH ótimo.

A temperatura ótima da L-asparaginase foi avaliada através da dosagem da atividade enzimática em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 100 °C. A estabilidade térmica foi determinada pela incubação da enzima pura sem adição de substrato a 85, 90 e 95 °C por 180 minutos, seguido da verificação da atividade enzimática residual (A. IMADA, S. IGARASI, 1973) na temperatura e pH ótimos da enzima.

3.15.2 Especificidade ao substrato

A especificidade da L-asparaginase parcialmente purificada foi analisada pela incubação da enzima com os substratos L-asparagina, L-prolina, L-glutamina e glicina a 0.1 mol. L⁻¹, seguida pela quantificação da atividade relativa nas condições ótimas de reação.

3.15.3 Efeito de íons e outros compostos na atividade da L-asparaginase

O efeito dos compostos ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); ditioneitol (DTT) e 2-mercaptoetanol e íons metálicos: BaCl₂, CuCl₂, CoCl₂, FeCl₂, KCl, MgCl₂, MnCl₂, NaCl, AgNO₃, L-cisteína, K₂SO₄, MnSO₄, NH₄NO₃, HgCl e HgCl₂ foram avaliados adicionando-se ao substrato L-asparagina 0,1 mol. L⁻¹ em tampão citrato-fosfato 0,1 mol. L⁻¹ pH 7 nas concentrações 5 e 10 mM, seguido da dosagem de atividade enzimática (A. IMADA, S. IGARASI, 1973).

3.15.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os valores aparentes da constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) da L-asparaginase foram determinadas através da incubação da enzima com o substrato L-asparagina nas concentrações de 0,02 a 0,3 mmol. L⁻¹ nas condições ideais de temperatura e pH, os resultados foram obtidos através do programa Enzyplot (LEONE; BARANAUSKAS, 1995).

3.16 Análise estatística

Todos os resultados apresentados representam a média dos experimentos em triplicata $\pm$ desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram obtidas utilizando GraphPad Prism versão 10.3.1 e, quando necessário, os valores encontrados foram comparados a partir do teste one-way ANOVA, com análise de múltipla comparação, seguido pelo teste de análise de Tukey, sendo $p \leq 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Os gráficos foram plotados no programa Origin 6.1. As constantes cinéticas foram obtidas através do software Enzyplot (LEONE; BARANAUSKAS, 1995).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Screening enzimático em meio sólido

Na Figura 3, são exibidos os 5 isolados de fungos filamentosos avaliados que demonstraram atividade enzimática em meio sólido após 48 horas de inoculação de esporos na placa de Petri.

O ensaio qualitativo em placa é considerado vantajoso pelo fato de identificar de forma rápida a produção de L-asparaginase a partir do halo de hidrólise e cálculo do índice enzimático (ARIMA *et al.*, 1972).

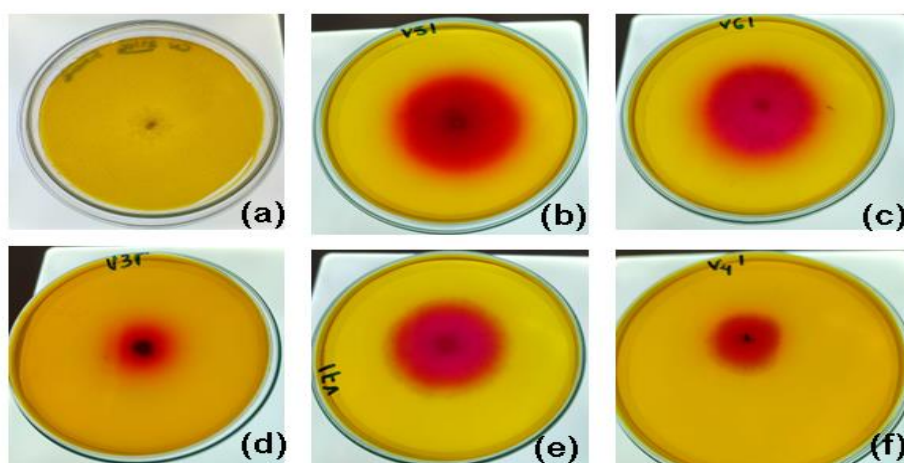


Figura 3. (a) Controle Negativo; (b) PA2S7MM; (c) PA3S12MM; (d) PA2S4MY; (e) PA3S17MC; (f) PA1S2MV

Em estudo que verificou a capacidade de produção de asparaginase por fungos, observou-se teste positivo em placa para as espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*, *Mucor* e *Basidiomycetes* (RANI; SUNDARAM; VASANTHA, 2012). Igualmente, ao realizar o ensaio qualitativo empregando o indicador de pH vermelho de fenol, foi possível constatar a formação de um halo vermelho ao redor das colônias de várias espécies distintas de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2011).

Para identificação qualitativa em meio sólido da produção de L-asparaginase, todas as cinco linhagens de fungos filamentosos testadas apresentaram halo de degradação, com índice enzimático variando 0,67 a 2,1 (Figura 4).

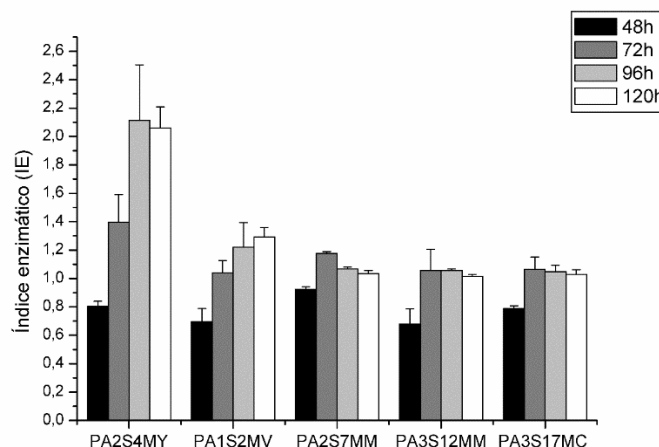


Figura 4. Índice enzimático dos fungos testados quanto a produção de L-asparaginase em meio sólido

4.2 Seleção de fungos quanto a produção de L-asparaginase extracelular e intracelular em meio líquido

Foram avaliados cinco fungos filamentosos em meio líquido para determinar a curva de produção de L-asparaginase extracelular durante um período de 120 horas por meio de fermentação submersa. Os resultados revelaram uma atividade enzimática variando entre 4,79 U/mL para o fungo PA3S12MM e 1,79 para o fungo PA2S7MM em cultivo submerso. A atividade enzimática obtida do cultivo submerso dos extratos intracelulares foi verificada após 120 horas de cultivo e apresentada nos gráficos a seguir.

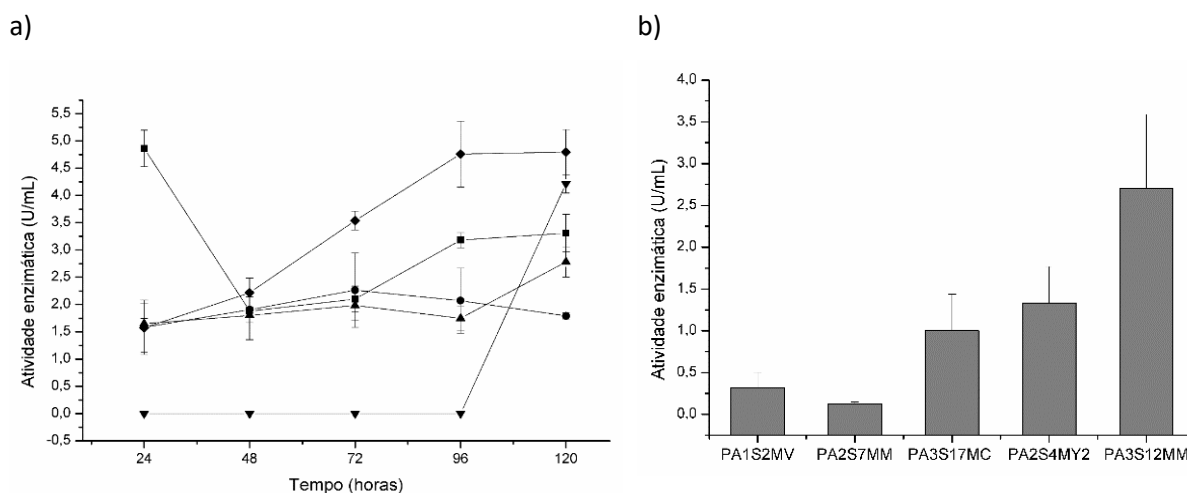


Figura 5. Produção de L-asparaginase pelos fungos estudados. (a) *Screening* enzimático extracelular. (b) *Screening* enzimático intracelular. Símbolos: (■) PA1S2MV, (●) PA2S7MM, (▲) PA3S17MC, (▼) PA2S4MY2, (◆) PA3S12MM.

É possível observar que o fungo PA3S12MM, previamente identificado como *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM (RASBOLD *et al.*, 2021), exibiu atividade enzimática tanto no extrato extracelular ($4,79 \text{ mL}^{-1}$) quanto no intracelular ($2,70 \text{ mL}^{-1}$). Em estudo que explorou a L-asparaginase intracelular do fungo *Chaetomium sp.*, obteve-se atividade enzimática de $33,6 \text{ U mL}^{-1}$ no extrato bruto intracelular (ARUMUGAM; THANGAVELU, 2022) e no filtrado atividade enzimática reduzida para $6,42 \text{ U mL}^{-1}$ (ARUMUGAM; SHANMUGAM; THANGAVELU, 2021). Nota-se que nesse rastreio inicial através de fermentação submersa, o fungo *C. echinulata* teve superioridade no filtrado extracelular.

4.3 Otimizações de cultivo

4.3.1 Efeito do meio de cultura sobre a produção enzimática de L-asparaginase extracelular

O fungo *C. echinulata* PA3S12MM cultivado em meio Czapek sob fermentação submersa em regime estacionário teve um aumento progressivo da atividade enzimática a partir de 24 horas de cultivo, enquanto no meio Adams e Klausen não se identificou atividade enzimática na primeira alíquota de 24 horas e nas subsequentes obteve-se menor atividade enzimática quando comparado ao meio Czapek, que atingiu $2,43 \text{ U mL}^{-1}$ com 144 horas de cultivo.

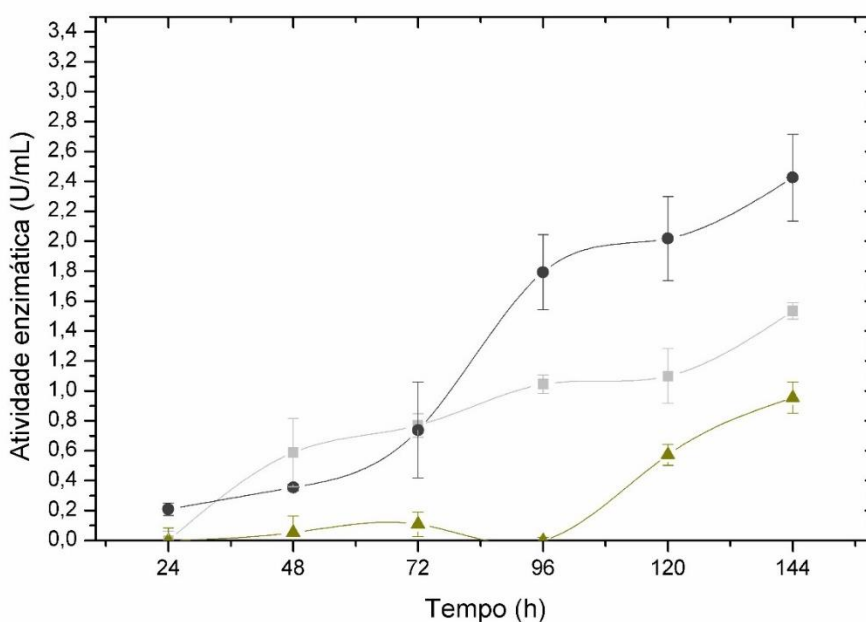


Figura 6. Influência de diferentes meios de cultura em função do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase. Símbolos: (■) Adams, (●) Czapek, (▲) Klausen

Nas investigações que abordaram a síntese de L-asparaginase por meio de fungos, é evidente que, em grande parte, ao empregar a técnica de fermentação submersa, o meio de cultura preferencial foi o Czapek Dox Modificado (SILVA *et al.*, 2018) sendo explorado diferentes fontes de carbono e nitrogênio, bem como, otimização dos componentes desse meio através de delineamentos estatísticos.

4.3.2 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de L-asparaginase

Em relação aos substratos analisados como fonte de carbono para a produção enzimática, pode-se observar, que os valores máximos de atividade de L-asparaginase foram obtidos com glicose 1% suplementada diariamente ($2,73 \text{ U mL}^{-1}$), seguida pelo resíduo agroindustrial farelo de trigo ($1,55 \text{ U mL}^{-1}$) e farinha de soja ($1,17 \text{ U mL}^{-1}$). Em relação aos outros resíduos utilizados como substrato, a o valor máximo de atividade de L-asparaginase não foi superior a $0,75 \text{ U mL}^{-1}$.

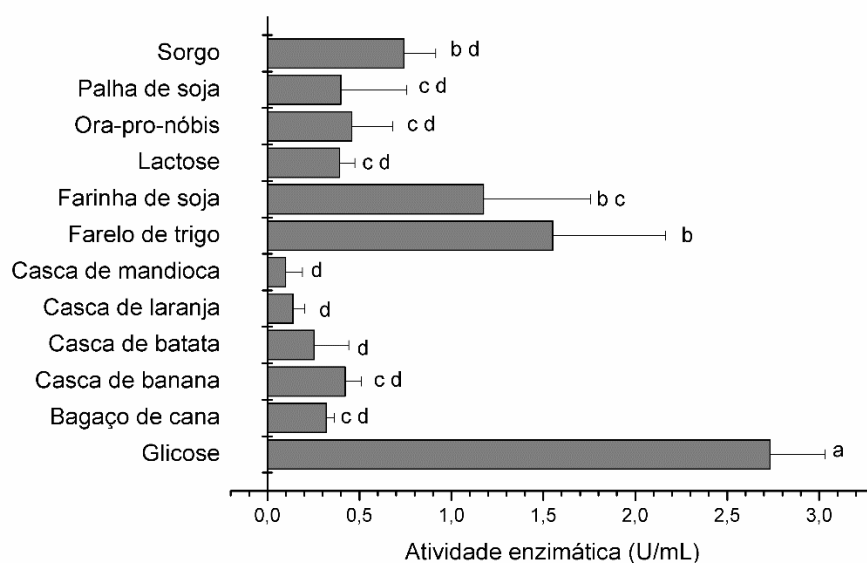


Figura 7. Produção de L-asparaginase por fermentação submersa a 28°C por 120 horas, utilizando diferentes resíduos agroindustriais como fonte de carbono (controle positivo: glicose). Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de três réplicas e as diferentes letras (a–d) indicam diferenças significativas no teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

De modo semelhante, em investigação envolvendo *Fusarium equiseti* AHMF4 (EL-GENDY *et al.*, 2021) a glicose se destacou como a melhor fonte de carbono para produção de L-asparaginase em cultivo submerso, o que pode ser atribuído ao fato dos fungos preferirem açúcares simples em vez de complexos. Resultados análogos foram constatados em estudo com *Aspergillus terreus* (COSTA-SILVA *et al.*, 2019), *Aspergillus sp.* ALAA-2000 (MORSY *et al.*, 2015).

Dentre os resíduos incluídos nesse estudo, os farelos são fontes ricas em fibras, mas também possuem em sua composição, carboidratos, minerais, vitaminas, tiamina, folato e compostos fenólicos que são hidrolisados pelos fungos em açúcares menores, mais facilmente assimilados (STEVENSON *et al.*, 2012).

Por outro lado, a soja é rica em proteínas, as quais são importantes fontes de nitrogênio, composto essencial para o crescimento dos microrganismos. Já a casca de laranja é rica em açúcares solúveis, os quais são importantes fontes de carbono, assim como os substratos amiláceos, de fácil assimilação pelos microrganismos (MANAN; WEBB, 2017). Por sua vez, a casca de mandioca é constituída majoritariamente de material lingocelulósico e pobre em proteínas (5,5% aproximadamente) (MORGAN; CHOCT, 2016).

4.3.3 Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase

Ao investigar diferentes fontes de nitrogênio, observou-se que o resíduo agrônômico de pena de galinha induziu a maior atividade enzimática ($5,1 \text{ U mL}^{-1}$), seguido por aspargo, extrato de carne e triptona ($4,2 \text{ U mL}^{-1}$) como apresentado na Figura 8. Dados na literatura sugerem que a atividade asparaginolítica está diretamente associada a regulação de nitrogênio (SARQUIS *et al.*, 2004). Nesse sentido, em pesquisa que avaliou diferentes fontes de nitrogênio para produção de L-asparaginase por *Fusarium proliferatum*, observou-se que a suplementação de peptona ($3,72 \text{ U mL}^{-1}$), extrato de carne ($3,2 \text{ U mL}^{-1}$), extrato de levedura ($2,33 \text{ U mL}^{-1}$) e nitrato de sódio ($0,79 \text{ U mL}^{-1}$), resultaram em atividades enzimáticas significativamente inferiores em comparação com a atividade obtida com suplementação de L-asparagina ($17,44 \text{ U mL}^{-1}$) (YAP; LEE; TING, 2021).

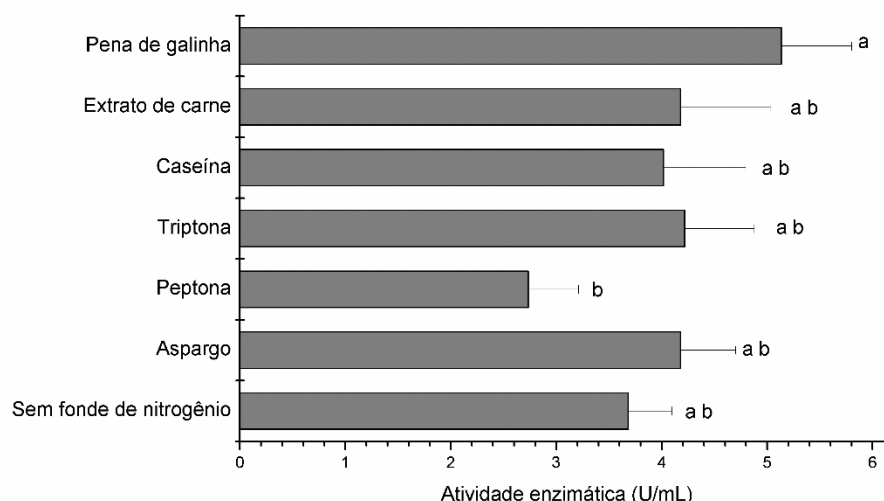


Figura 8. Produção de L-asparaginase por fermentação submersa a 28 °C por 120 horas, utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de três réplicas e as diferentes letras (a–b) indicam diferenças significativas no teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.3.4 Influência da suplementação de aminoácidos na indução da produção enzimática de L-asparaginase

Foram avaliadas as produções enzimáticas por meio da adição de alguns aminoácidos ao meio de cultura Czapek, utilizando glicose 1% como fonte de carbono e pena de galinha 0,4% como fonte de nitrogênio. Observou-se superioridade na produção enzimática de L-asparaginase ao suplementar o meio de cultivo com L-prolina (11 U mL⁻¹) seguido por L-arginina (6,61 U mL⁻¹) e L-asparagina (5,73 U mL⁻¹). De maneira semelhante, resultados mais favoráveis na atividade enzimática da L-asparaginase produzida por *A. terreus* foram observados em meio Czapek Dox modificado suplementado com 1% L-prolina (COSTA-SILVA *et al.*, 2019).

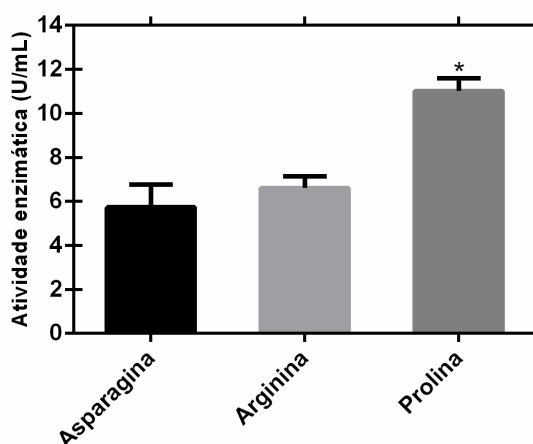


Figura 9. Influência da suplementação de aminoácidos ao meio de cultura sob a produção de L-asparaginase

4.3.5 Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase

A avaliação da influência do tempo de cultivo, revelou que 120 horas resultaram na maior produção enzimática de *C. echinulata* (16,8 U/mL) e que após 144 horas teve uma redução de 39,3 % na atividade. De modo semelhante, L-asparaginase de *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593 teve maior produção com 120 horas em fermentação submersa (1,49 U/mL) (RABELO, 2021).

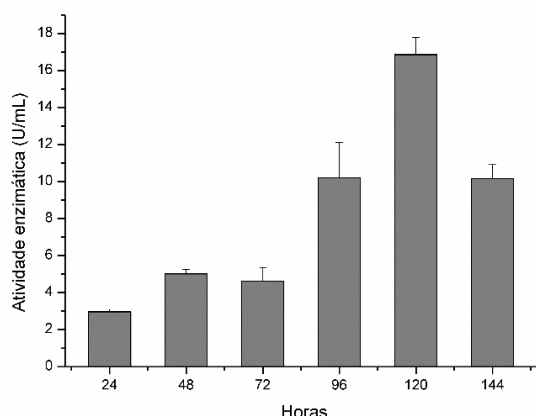


Figura 10. Influência do tempo de cultivo na produção de L-asparaginase

4.3.6 Seleção de variáveis dependentes para produção de L-asparaginase por *C. echinulata* PA3S12MM através de planejamento experimental Plackett-Burmann

Nessa pesquisa foi utilizada a estratégia estatística em duas etapas, combinando planejamento experimental Plackett-Burmann (PB) seguido do delineamento composto central rotacional (DCCR) com análise de superfície de resposta. Inicialmente, uma pré-seleção das variáveis foi conduzida, envolvendo glicose (X1), pena de galinha (X2), L-asparagina (X3), L-prolina (X4), L-arginina (X5), temperatura °C (X6) e tempo de cultivo em horas (X7) através de 12 ensaios e 3 repetições do ponto central. A produção máxima de L-asparaginase foi alcançada no ensaio 2 (5,32 mL⁻¹) e a menor no ensaio 11 (0,36 mL⁻¹), conforme observado na tabela abaixo.

Tabela 5. Matriz do planejamento experimental Plackett-Burman para produção de L-asparaginase em cultivo submerso

Ensaios	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Atividade enzimática
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	3,581
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	5,322
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1,823
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	2,576
5	1	1	-1	1	1	-1	1	4,621

6	1	1	1	-1	1	1	-1	2,988
7	-1	1	1	1	-1	1	1	2,142
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1,946
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1,52
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	0,445
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	0,36
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,027
13	0	0	0	0	0	0	0	2,214
14	0	0	0	0	0	0	0	2,626
15	0	0	0	0	0	0	0	1,895

Glicose (X1), pena de galinha (X2), L-asparagina (X3), L-prolina (X4), L-arginina (X5), temperatura °C (X6) e tempo de cultivo em horas (X7)

Valores codificados: -1; 0 e 1. Ensaios 13 a 15 correspondem aos pontos centrais.

As variáveis glicose (%) como fonte de carbono, temperatura (°C), prolina (%) e pena de galinha (%) como fonte de nitrogênio apresentaram maior influência sobre a produção de L-asparaginase por *C. echinulata* PA3S12MM conforme apresentado através do diagrama de Pareto, considerando p-valor $\leq 0,05$

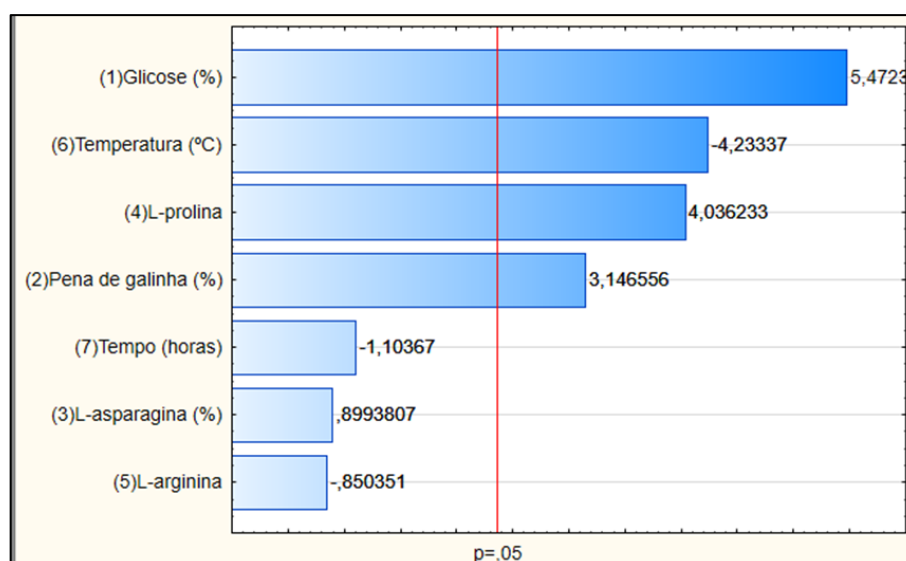


Figura 11. Variáveis significativas no delineamento de Plackett-Burmann – Diagrama de Pareto

As variáveis que não influenciaram significativamente na produção enzimática (asparagina 0,2% e arginina 0,2%) foram adicionadas no experimento seguinte, DCCR, com concentração correspondente a do ponto central (0). Quanto a temperatura °C (X6), variável significativa com efeito negativo, foi mantida no nível correspondente ao ponto central até o final do planejamento.

O efeito apresentado pela ANOVA no planejamento representa a tendência de cada variável em influenciar na resposta. Quando essa influência é positiva, é possível

inferir que, ao aumentar os valores de uma variável específica até o limite do intervalo testado, pode ocorrer uma melhora positiva na resposta. Em contrapartida, se o impacto for negativo, isso sugere que a diminuição dos valores de cada variável analisada pode resultar em um aumento na resposta esperada (CARDOSO, 2018).

Em estudos que exploraram a otimização da produção de L-asparaginase utilizando PBD, ao contrário dos resultados obtidos, identificaram a L-asparagina como sendo um fator significativo com influência positiva (CARDOSO *et al.*, 2020; PR; PD, 2016).

4.3.7 Otimização da produção de L-asparaginase por *C. echinulatta* PA3S12MM utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O melhor resultado para a produção de L-asparaginase foi observado no ensaio 13, no qual o fungo foi cultivado durante 120 horas à 28 °C e suplementado com glicose 7%, prolina 0,15% e pena de galinha 1,5% (Tabela 7). Em contraste, os ensaios 2 e 6 apresentaram baixa atividade enzimática, cujas concentrações das variáveis foram glicose 3%, prolina 0,15% e pena de galinha 4,5%. No ensaio 21, que demonstrou o menor resultado do delineamento, as concentrações de glicose, prolina e pena de galinha corresponderam ao valor do ponto central, enquanto a temperatura correspondeu ao ponto axial de 10 °C.

Tabela 6. Planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase por *C. echinulata* utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Atividade enzimática (U mL ⁻¹)
	Glicose (%)	Temperatura (°C)	Prolina (%)	Pena de galinha (%)	
1	-1	-1	-1	-1	1,409
2	-1	-1	-1	1	0,873
3	-1	-1	1	-1	1,415
4	-1	-1	1	1	1,261
5	-1	1	-1	-1	1,050
6	-1	1	-1	1	0,673
7	-1	1	1	-1	1,061
8	-1	1	1	1	1,386
9	1	-1	-1	-1	4,638
10	1	-1	-1	1	3,463
11	1	-1	1	-1	4,775
12	1	-1	1	1	3,723
13	1	1	-1	-1	7,137
14	1	1	-1	1	3,355
15	1	1	1	-1	2,482

16	1	1	1	1	3,566
17	0	0	0	-2	3,657
18	0	0	0	2	4,673
19	0	0	-2	0	3,320
20	0	0	2	0	4,039
21	0	-2	0	0	0,154
22	0	2	0	0	3,714
23	-2	0	0	0	1,398
24	2	0	0	0	5,528
25	0	0	0	0	1,609
26	0	0	0	0	1,563
27	0	0	0	0	1,849

A equação de regressão obtida após análise da variância (ANOVA) prevê os níveis de L-asparaginase em função das variáveis glicose, temperatura, prolina e pena de galinha. A produção enzimática pode ser predita pelo modelo codificado com 95% de confiança:

$$Y \text{ (U mL}^{-1}\text{)} = 1,67 + 0,26 X_1 - 0,046 X_1^2 + 0,062 X_2 + 0,39 X_3 - 0,046 X_3^2 + 0,323 X_4 + 0,010 X_3 X_4 + 0,38 X_4^2$$

Onde Y é a atividade de L-asparaginase (U mL⁻¹), X₁ é a concentração de glicose, X₂ é a temperatura (°C), X₃ é a concentração de prolina e X₄ é a concentração de fonte de carbono (%).

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos pela análise de variância (ANOVA). O F_{cal} (5,56) da regressão foi 2,21 vezes maior que o F_{tab} (2,51), indicando que a regressão é significativa. O valor do coeficiente de determinação (R²) foi de 0,787, isto demonstra que o modelo quadrático consegue explicar 78,7% da variabilidade dos dados experimentais. A falta de ajuste no modelo apresentou significância estatística. O modelo quadrático não apresentou falta de ajuste, pois o F_{cal} (0,22) foi menor do F_{tab} (19,41). Portanto, este modelo é preditivo e estatisticamente significativo em um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 7 – Tabela ANOVA para produção de L-asparaginase

Fontes de variação	GL	SS	QM	Teste F		R ²
				F _{cal}	F _{tab}	
Regressão	8	57,330	7,166272	5,56	2,51	78,7
Resíduo	18	23,179	1,287747			
Falta de ajuste	16	23,132	1,44578	0,22	19,41	
Erro puro	2	12,99	6,495			

Total	26	80,510
--------------	----	--------

Na Figura 12, o gráfico de Pareto ilustra as variáveis que foram significativas e que influenciaram de forma positiva no aumento da produção enzimática. Entre essas variáveis, destacam-se a concentração da fonte de carbono (X1) - tanto na forma linear quanto quadrática, a concentração de prolina (X3) - na forma quadrática, e a concentração da fonte de nitrogênio (X4) - também na forma quadrática. Esses resultados indicam que o aumento desses fatores contribui para o aumento na produção da enzima, dentro de um modelo de confiança de 95%. Pode-se observar que as variáveis Prolina (%) e Fonte de nitrogênio (%) tiveram uma interação significativa positiva na produção de L-asparaginase no modelo linear.

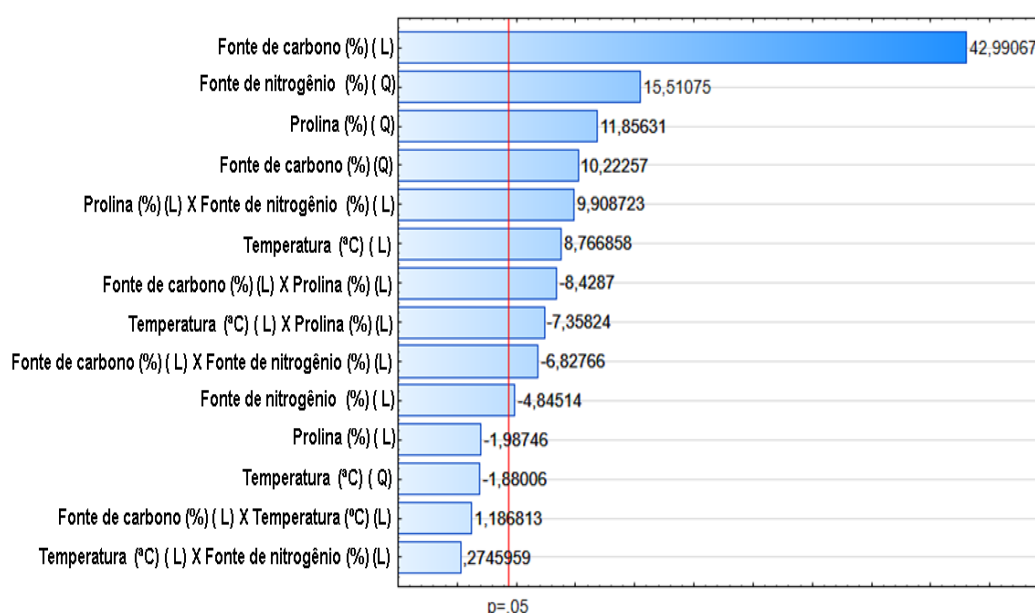
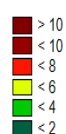
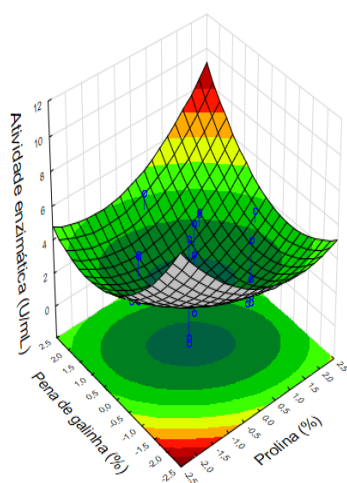
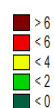
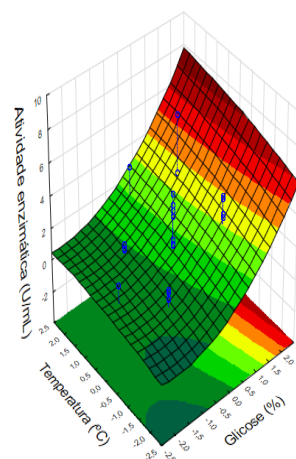


Figura 12. Gráfico de Pareto para os parâmetros estimados do DCCR para a produção de L-asparaginase

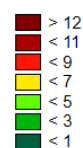
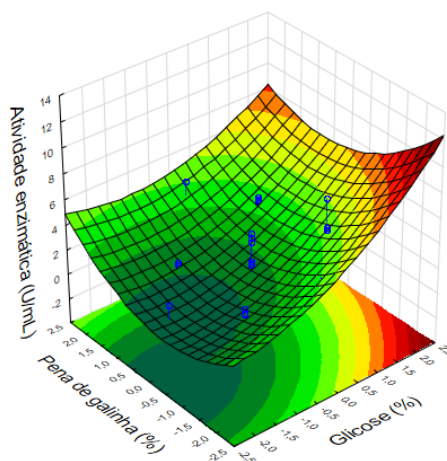
Os gráficos de superfície de resposta descritos através da equação polinomial de segunda ordem para a produção desta enzima indicam que os pontos axiais apresentam melhores valores para a produção de L-asparaginase por *C. echinulata* PA3S12MM. A Figura 13a evidencia aumento da atividade enzimática com um aumento da concentração de prolina e pena de galinha. Na Figura 13b, observou-se que maior concentração de glicose em relação a aumento da temperatura proporcionou maior atividade enzimática. Enquanto a Figura 13c, evidenciou que independente da concentração de pena de galinha (seja alta ou baixa) juntamente com a maior concentração de glicose resultou na maior atividade de L-asparaginase.



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Gráfico de superfície de resposta para produção de L-asparaginase (U mL^{-1}): (a) Fonte de nitrogênio X Prolina; (b) Fonte de carbono X Temperatura; (c) Fonte de nitrogênio x Fonte de carbono.

Em outro estudo focado na otimização da produção de L-asparaginase por *Fusarium proliferatum*, nota-se que, contrariamente aos resultados obtidos em nosso DCCR, a concentração de glicose demonstrou efeito linear negativo sob a atividade enzimática e, de modo semelhante obteve valor de R^2 baixo equivalente a 0,77. (YAP; LEE; TING, 2021)

Após otimização do cultivo, houve um aumento de 40% na produção enzimática ($7,14 \text{ U mL}^{-1}$) quando comparado à produção inicial antes da otimização que era de $5,1 \text{ U mL}^{-1}$. Esses resultados ressaltam a utilidade das estratégias estatísticas para maximizar as atividades enzimáticas, a fim de simplificar os processos produtivos e, consequentemente, reduzir os custos associados a esses procedimentos.

4.4 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade de L-asparaginase produzida por *C. echinulata* presente no extrato bruto

Os resultados relativos ao efeito do pH sobre a atividade da L-asparaginase presente no extrato bruto indicaram que a atividade máxima ($11,3 \text{ U mL}^{-1}$) foi alcançada em pH 5,0 (Figura 14a). Esse achado se assemelha ao resultado encontrado para enzima parcialmente purificada de *A. oryzae* (DA CUNHA MC *et al.*, 2022).

Em relação à temperatura, verificou-se que em 50°C a L-asparaginase presente no extrato bruto apresentou melhor desempenho catalítico, alcançando $11,5 \text{ U mL}^{-1}$, seguida pela temperatura de 60°C com $10,9 \text{ U mL}^{-1}$, sem diferença estatística significativa entre ambas pelo teste de Tukey (Fig 14b).

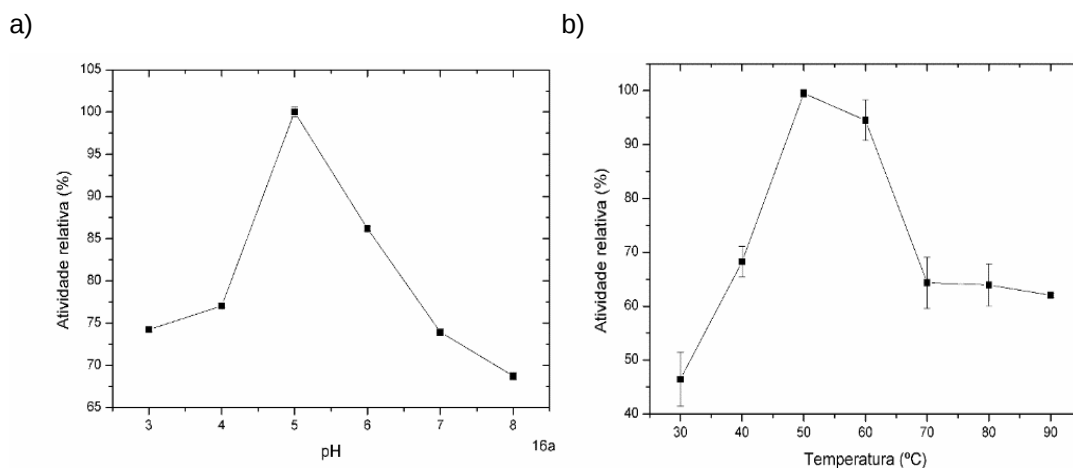


Figura 14. L-asparaginase produzida por *C. echinulata* PA3S12MM presente no extrato bruto. a) Efeito do pH. b) Efeito da temperatura

Esse resultado é semelhante ao encontrado para a enzima purificada de *Trichoderma asperellum* (ELSABA; SALAMA; SOLIMAN, 2022). Temperaturas ótimas na faixa de 50 e 60°C foram reportadas para a L-asparaginase de várias cepas de *Aspergillus* spp. (DUTTA; GHOSH; PRAMANIK, 2015; MORSY *et al.*, 2015).

4.5 Purificação da L-asparaginase

Primeiramente o extrato bruto extracelular foi concentrado através de liofilização e aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 HR (Figura 15a) onde é possível avaliar um pico de atividade enzimática na faixa das frações 70 a 85. Posteriormente, essas frações foram liofilizadas e aplicadas na coluna Sephacryl TM S-200 HR, onde se observa a presença de 4 picos, o que indica que a enzima foi parcialmente purificada (Fig. 15b).

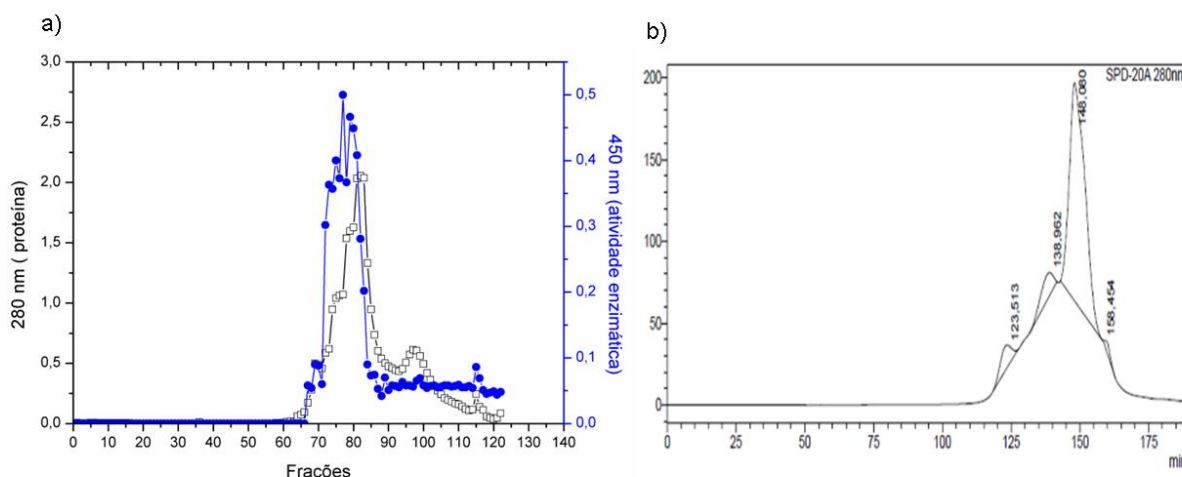


Figura 15.a) Perfil cromatográfico obtido após aplicação do extrato bruto liofilizado em coluna cromatográfica Sephacryl S-100 HR 19. Legenda: (-●-) Atividade enzimática (450 nm); (-□-) Proteína (280 nm); (b) Cromatograma da L-asparaginase parcialmente purificada em coluna Sephacryl TM S-200 HR.

Os dados referentes as etapas de purificação encontram-se sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Etapas da purificação da L-asparaginase extracelular de *C. echinulata* PA3S12MM

Etapas da purificação	Volume (mL)	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica U mg ⁻¹	Recuperação (%)	Purificação (fator)
Extrato bruto	412	1.194,8	138,84	8,61	100	1
Sephacryl S-100 HR	20	324,60	23,40	13,87	27	1,61
Sephacryl TM S-200 HR	4,30	11,40	0,13	89,3	0,2	10,4

Ao fim do processo, a enzima foi purificada 10,4 vezes, com uma atividade específica de 89,3 U mg⁻¹, valor próximo ao obtido da asparaginase de *Cladosporium*

sp, na última etapa de purificação com coluna Sepharose 6b, com $83,3 \text{ U mg}^{-1}$ (NS; HK, 2013). Em purificação parcial da enzima de *A. oryzae* (DA CUNHA MC *et al.*, 2022), foi observada uma recuperação de apenas 0,30% a partir de cromatografia em Sephadex G100, o que evidentemente demonstra que em nossa pesquisa, alcançamos um resultado semelhante e inferior com 0,2%.

4.6 Análise da pureza por eletroforese

O gel de eletroforese evidenciou a presença de quatro proteínas menores ou igual a 35 kDa no extrato bruto ultracentrifugado através da membrana de 10 kDa, o que sugere que a enzima L-asparaginase possa ser alguma dessas bandas. (Fig. 16). Em comparação, na literatura há enzimas já relatadas com pesos moleculares menores que 35 kDa, como a L-asparaginase de *Fusarium* sp. com 22,5 kDa (SA, 2022) e 20,8 kDa a partir de *A. oryzae* spp (DA CUNHA MC *et al.*, 2022).

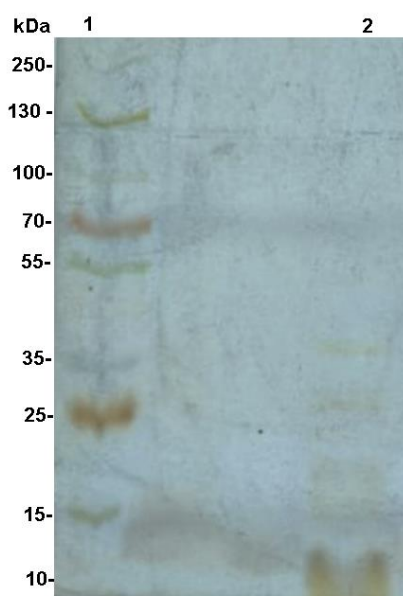


Figura 16. Análise por SDS-PAGE 10% da L-asparaginase de *C. echinulata* PA3S12MM (1) Marcador de peso molecular; (2) L-asparaginase semipurificada.

4.7 Caracterização bioquímica da L-asparaginase parcialmente purificada

4.7.1 Efeito do pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática

Os resultados obtidos através da reação enzimática demonstram que a enzima obteve alta atividade em pH 7 ($171,24 \text{ U mL}^{-1}$) e uma atividade relativa de 84.8% em pH 8 (Fig. 17a), semelhante ao relatado para as enzimas de *Mucor hiemalis*, *Penicillium digitatum*.e *Chaetomium* sp (ARUMUGAM; SHANMUGAM; THANGAVELU, 2021; SHRIVASTAVA *et al.*, 2012; THAKUR *et al.*, 2014). Já em pH

mais ácido, a enzima demonstrou uma atividade relativa na faixa de 99,3 – 93,5%. Em relação à estabilidade enzimática, a L-asparaginase foi estável na faixa de pH 4-6, após 24 horas de incubação reteve 74% da atividade em pH 6. Em pH 3 reteve somente 50% de atividade residual (Fig. 17b). Similarmente, a asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999 reteve de 81,7 a 85,7 % de atividade residual na faixa de pH de 4,0–6,0 (DA CUNHA MC *et al.*, 2022).

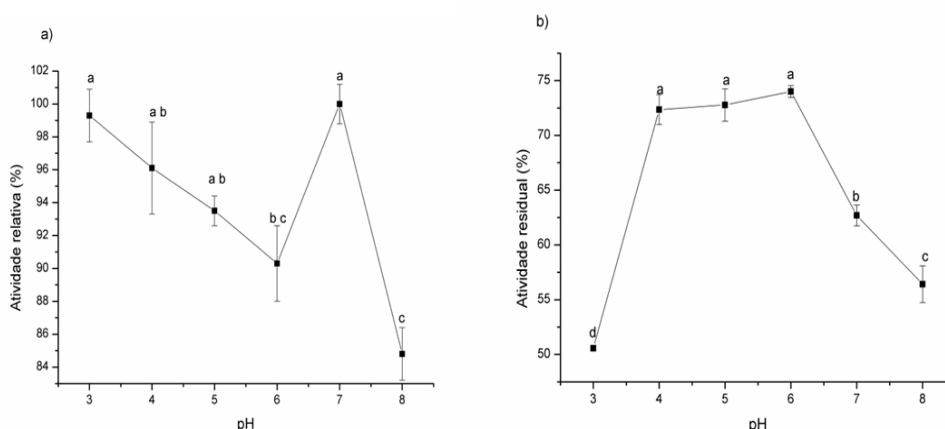


Figura 17. Efeito do pH na atividade da L-asparaginase: (a) pH ótimo. (b) Estabilidade ao pH. Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de três réplicas e as diferentes letras (a–d) indicam diferenças significativas no teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A temperatura ótima para atividade enzimática foi alcançada a 85 °C (231,3 U mL⁻¹) (Fig. 18a), analogamente ao descrito para a enzima recombinante da arqueia hipertermofílica *Thermococcus kodakarensis* KOD1, onde os autores avaliaram a clonagem, expressão e caracterização da L-asparaginase em *Escherichia coli* BLR(DE3) e a enzima foi designada como hipertermoestável, com temperatura ótima de 90 °C (HONG *et al.*, 2014). Os ensaios de estabilidade térmica indicam que a L-asparaginase de *C. echinulata* PA3S12MM foi estável no tempo e temperaturas avaliadas (85, 90 e 95 °C). A 95 °C apresentou ativação térmica aos 30 min de incubação (Fig. 18b). Após 180 min de incubação a 90 °C a enzima reteve cerca de 94% de sua atividade inicial, também similarmente a asparaginase clonada de *T.kodakarensis* KOD1 que manteve 90 % de atividade residual a 90 °C pelo período de até 32 horas (HONG *et al.*, 2014). Tendo em vista a aplicabilidade da L-asparaginase na indústria alimentícia para mitigação da formação de acrilamida em alimentos processados em altas temperaturas, a enzima produzida pela *C. echinulata* PA3S12MM demonstra alto potencial, por sua característica de hipertermozima.

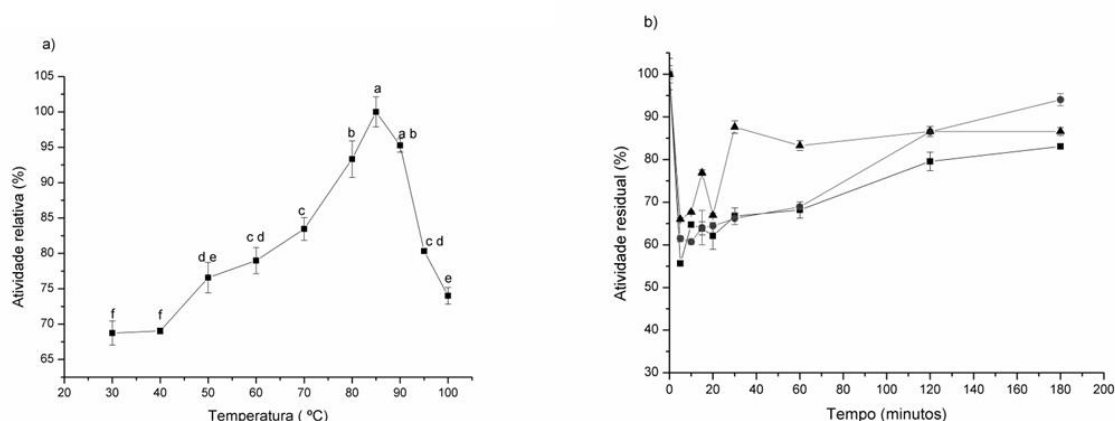


Figura 18. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da L-asparaginase: (a) Temperatura ótima. (b) Estabilidade térmica (■) 85 °C; (●) 90 °C e (▲) 95 °C. Os dados são expressos como médias $\pm$ desvio padrão de três réplicas e as diferentes letras (a–f) indicam diferenças significativas no teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4.7.2 Especificidade ao substrato

A L-asparaginase purificada demonstrou afinidade a todos os aminoácidos avaliados, porém, maior atividade enzimática com o substrato L-asparagina, quando comparado aos demais (Fig. 19). A característica de alta afinidade para L-asparagina e baixa atividade para o substrato L-glutamina (32,9 %) confere potencial para seu uso na indústria farmacêutica e alimentícia. Porém, a enzima apresentou em torno de 75 % de atividade sobre prolina e glicina. Em estudos que avaliaram esta enzima de origem fúngica, observou-se também maior afinidade para L-asparagina (KHALIL; RODRIGUEZ-COUTO; EL-GHANY, 2021).

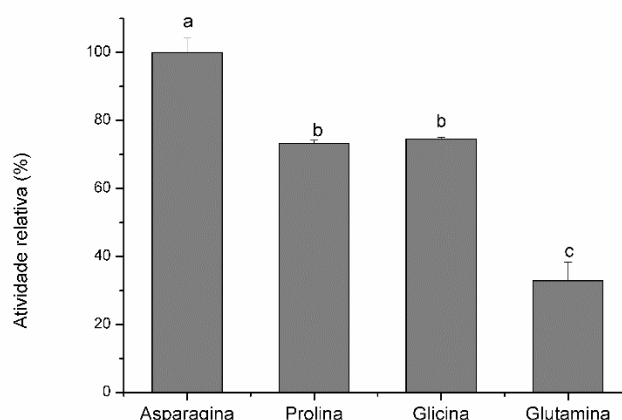


Figura 19. Especificidade ao substrato pela L-asparaginase de *C. echinulata*.

4.7.3 Efeito de diferentes compostos na atividade da L-asparaginase

O efeito de diferentes compostos nas concentrações de 5 e 10 mM sobre a atividade enzimática pode ser observado na Tabela 10. A L-asparaginase incubada com o agente redutor beta-mercaptoetanol teve um aumento em 72,1% na sua atividade. Este efeito pode ser explicado pela quebra de ligações dissulfeto próximas ao sítio ativo a enzima pelo beta-mercaptoetanol, levando a exposição de grupos tióis altamente reativos e favorecer a atividade catalítica pelo relaxamento da rigidez conformacional da proteína (TRIVEDI; LAURENCE; SIAHAAN, 2009). Este resultado corrobora com o trabalho relatado para a L-asparaginase de *A. oryzae* IOC 3999, que mostrou o aumento de 185,8 % na atividade enzimática (DA CUNHA MC *et al.*, 2022).

O EDTA demonstrou influência negativa na concentração de 10 mmol⁻¹, pois reduziu cerca de 51,4% da atividade enzimática, o que poderia justificar estar se tratando de uma metaloproteína.

Tabela 9. Efeito de diferentes compostos na atividade da L-asparaginase

Composto	Atividade relativa (%)	
	5 mmol	10 mmol
Controle	100	100
CoCl ₂	54,6 ± 0,02	46,6 ± 0,06
BaCl ₂	55,3 ± 0,04	68,9 ± 0,03
CuCl ₂	64,8 ± 0,03	88,8 ± 0,06
DTT	36,6 ± 0,01	12,2 ± 0,05
EDTA	79,7 ± 0,07	48,6 ± 0,05
FeCl ₂	35,8 ± 0,02	60,7 ± 0,07
NaCl	59,8 ± 0,03	75,1 ± 0,09
MgCl ₂	45,6 ± 0,01	49,2 ± 0,05
AgNO ₃	45,6 ± 0,05	64,2 ± 0,05
MnCl ₂	22,2 ± 0	20,3 ± 0,26
KCl	0,8 ± 0,01	3,6 ± 0,02
L-cisteína	23,2 ± 0,06	20,1 ± 0,14
K ₂ SO ₄	59,3 ± 0,05	69,3 ± 0,08
MnSO ₄	30,2 ± 0,12	0
β-mercaptoetanol	166 ± 0,06	172,1 ± 0,06
NH ₄ NO ₃	49 ± 0,04	21,5 ± 0,05
HgCl ₂	50 ± 0,04	30,4 ± 0,08

Conforme visto na Tabela 9, o composto DTT 10 mmol⁻¹ reduziu a atividade da enzima em 87,8%. Além disso, o composto MnSO₄ 10 mmol⁻¹ inibiu completamente a atividade da enzima parcialmente purificada. Dentre os íons metálicos estudados, os íons de FeCl₂ e KCl demonstraram efeito negativo.

4.7.4 Parâmetros cinéticos da L-asparaginase

A constante de Michaelis (K_m) obtida para a degradação de asparagina pela enzima foi de $0,011 \text{ mmol L}^{-1}$ (Figura 20), resultado inferior ao encontrado para as enzimas de *A. niger* (K_m $0,8141 \text{ mM}$) e de *Chaetomium* sp (K_m $257,1 \text{ mM}$) (ARUMUGAM; THANGAVELU, 2022; VALA *et al.*, 2018). A velocidade máxima (V_{max}) observada de $126,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$, foi cerca de 28,7 vezes mais elevada que ao encontrado para asparaginase de *Cladosporium* sp. (V_{max} : $4,44 \text{ } \mu\text{mol mL}^{-1}\text{min}^{-1}$) (NS; HK, 2013).

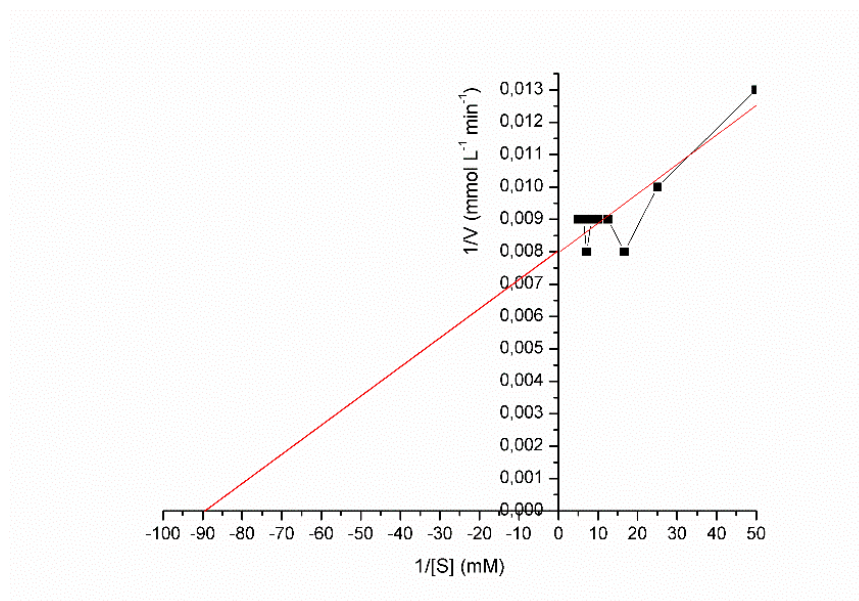


Figura 20. Cinética da L-asparaginase parcialmente purificada de *C. echinulata* PA3S12MM para o substrato asparagina.

5. CONCLUSÃO

Essa prospecção revelou o fungo *C. echinulata* PA3S12MM isolado de um fragmento da mata Atlântica do Oeste do Paraná, com potencialidade para produção de L-asparaginase. A enzima parcialmente purificada demonstrou características bioquímicas favoráveis para possível aplicação na indústria de alimentos, a fim de mitigar a formação de acrilamida, tendo em vista sua atividade em temperatura elevada e termoestabilidade. Além disso, pode ter sua capacidade antitumoral investigada, visto que apresenta pH ótimo neutro e um K_m baixo, o que indica que essa enzima é capaz de esgotar a L-asparagina em concentrações reduzidas, o que para indústria farmacêutica permitiria o uso de doses menores para alcance do efeito desejado.

6. REFERÊNCIAS

- A. IMADA, S. IGARASI, K. N. A. M. I. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of General Microbiologji**, v. 76, p. 85–99, 1973.
- ADAMS, P. R. Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. p. 35–37, 1990.
- ADEBO. Oluwafemi Ayodeji *et al.* Mitigation of acrylamide in foods: An African perspective. In: **Acrylic Polymers in Healthcare**. [s.l: s.n.]. p. 152–172.
- AMARAL, D.; PUGGINA, B. UM PANORAMA GERAL SOBRE AS LEUCEMIAS A GENERAL OVERVIEW OF LEUKEMIA. **Academia de Ciência e Tec**, 2024.
- ARIMA, K. *et al.* Production of Extracellular L-Asparaginases by Microorganisms . **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 36, n. 3, p. 356–361, 1972.
- ARUMUGAM, N.; SHANMUGAM, M. K.; THANGAVELU, P. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease-free L-asparaginase from novel endophyte *Chaetomium* sp. **Biotechnology and applied biochemistry**, out. 2021.
- ARUMUGAM, N.; THANGAVELU, P. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular L-asparaginase from *Chaetomium* sp. **Protein expression and purification**, v. 190, p. 106006, fev. 2022.
- BARRETT, A. J.; TIPTON, K. F. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992 Supplement 4: corrections and additions (1997) Prepared on behalf of the advisory panel on peptidase nomenclature** <http://www.chem.qmw.ac.uk/iuhmb/>. Comments and suggestions on enzyme classification and nomenclature may be sent to Prof. J. Biochem. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.chem.qmw.ac.uk/iuhmb/>>.
- BENCHIMOL, M. *et al.* Forest Ecology and Management Losing our palms : The influence of landscape-scale deforestation on Arecaceae diversity in the Atlantic forest. p. 1–9, 2016.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CACHUMBA, J. J. M. *et al.* Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 77–85, 2016.
- CÂNDIDO, M. A. **Formação de acrilamida em alimentos processados e sua possível ação carcinogênica**. [s.l.] Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, 2015.
- CARDOSO, S. L. **AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGO ISOLADO DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO EM MEIO CONTENDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL**. [s.l: s.n.].

CARDOSO, S. L. *et al.* Optimization of aqueous two-phase micellar system for partial purification of L-asparaginase from *Penicillium* sp. grown in wheat bran as agro-industrial residue. **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. 51, n. 3, p. 979–988, 2020.

CERQUEIRA, A. F.; SOUSA, M. B. C. Tendências e lacunas na literatura sobre palmeiras nativas da Mata Atlântica Brasileira. n. October 2022, p. 1–22, 2024.

CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de L-asparaginase chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organiasma. **Arch Int Physiol**, v. 19, n. 1922, p. 369–376, 1922.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Optimization of culture conditions and bench-scale production of anticancer enzyme L-asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 49, n. 1, p. 95–104, 2019.

DA CUNHA MC *et al.* L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* spp.: effects of production process and biochemical parameters. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 253–263, 2022.

DANI BENCHAMIN, SREEJAI R, SUJITHA S, JENSY ROSHAN F, A. C. AND R. K. Anti-proliferative activity of L-Asparaginase enzyme from fungi on breast cancer. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 407–410, 2019.

DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–10, 2016.

DUTTA, S.; GHOSH, S.; PRAMANIK, S. L-asparaginase and L-glutaminase from *Aspergillus fumigatus* WL002: Production and some physicochemical properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 425–431, 2015.

EL-GENDY, M. M. A. A. *et al.* Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **SAUDI JOURNAL OF BIOLOGICAL SCIENCES**, v. 28, n. 4, p. 2540–2548, 2021.

ELKHATEEB, W. A.; ELNAHAS, M. Bioactive metabolites of *Cunninghamella*, Biodiversity to Biotechnology. n. April, p. 1–6, 2021.

ELSABA, Y. M.; SALAMA, W. H.; SOLIMAN, E. R. S. In silico and biochemical analysis on a newly isolated *Trichoderma asperellum* L-asparaginase. **BIOCATALYSIS AND AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY**, v. 40, mar. 2022.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. v. 2012, 2012.

FREITAS, M. *et al.* Filamentous fungi producing L-asparaginase with low glutaminase activity isolated from brazilian savanna soil. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1–20, 2021.

FUGANHOLI, N. S. **Análise Técnico-Econômica para a produção de biofármacos de L-asparaginase**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 5 fev. 2021.

FURTH, O.; FRIEDMANN, M. Über die Verbreitung asparaginspaltender Organfermente. **Biochemistry**, v. 26, p. 435–440, 1910.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–26, 1997.

HAMED, M.; OSMAN, A. A.; ATES, M. Statistical optimization of L-asparaginase production by *Cladosporium tenuissimum*. **EGYPTIAN PHARMACEUTICAL JOURNAL**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2021.

HONG, S. *et al.* Cloning , expression , and characterization of thermophilic L - asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. p. 1–9, 2014.

HUANG, L. *et al.* Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1561–1569, 2014.

KHALIL, N. M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; EL-GHANY, M. N. A. Characterization of *Penicillium crustosum*-asparaginase and its acrylamide alleviation efficiency in roasted coffee beans at non-cytotoxic levels. **ARCHIVES OF MICROBIOLOGY**, v. 203, n. 5, p. 2625–2637, jul. 2021.

KIDD, J. G. REGRESSION OF TRANSPLANTED LYMPHOMAS INDUCED IN VIVO BY MEANS OF NORMAL GUINEA PIG SERUM. **Journal of Experimental Medicine**, v. 98, n. 6, p. 565–582, 1 dez. 1953.

LANG, S. **Über desamidierung im Tierkörper**. Beitr chem ed. [s.l.: s.n.].

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A. ENZYLOT: A Microcomputer Assisted Program for Teaching Enzyme Kinetics. v. 23, n. 1994, p. 35–37, 1995.

LIMA, E. *et al.* A formação natural de acrilamida em alimentos e seus riscos para saúde. **Revista Presença**, v. 8, p. 41–73, 2022.

MAHAJAN, R. V. *et al.* A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 2, p. 122–126, 2013.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. n. October, 2017.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E. *et al.* Cancer metabolism: A therapeutic perspective. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 11–31, 2017.

MATIAS, N. M. A. **Leucemia Linfoblástica Aguda: Fisiopatologia, Diagnóstico e**

Abordagens Terapêuticas. [s.l.] Universidade de Lisboa, 2019.

MCILVAINE, T. C. A BUFFER SOLUTION FOR COLORIMETRIC COMPARISON. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183–186, 1921.

MEDICAL, P. *et al.* LABORATORY DIAGNOSIS OF ACUTE LYMPHOID LEUKEMIA : A. v. 1, 2024.

MENEGUETTI, G. P. **Desenvolvimento nanotecnológico da L-asparaginase empregando-se metodologia de peguilação.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

MOHAN KUMAR, N. S. *et al.* Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-Asparaginase Treatment. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 3, p. 741–748, 2014.

MORGAN, N. K.; CHOCT, M. Cassava : Nutrient composition and nutritive value in poultry diets. **Animal Nutrition**, v. 2, n. 4, p. 253–261, 2016.

MORSY, M. *et al.* Microbial & Biochemical Technology Production , Purification and Characterization of L-Asparaginase from Marine Endophytic *Aspergillus* sp . ALAA-2000 under Submerged and Solid State Fermentation. v. 7, n. 3, p. 165–172, 2015.

MUNEER, F. *et al.* Microbial l-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 967–981, 2020.

NS, M. K.; HK, M. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013.

PARASHIVA, J. *et al.* Endophytic Fungi as a Promising Source of Anticancer L - Asparaginase : A Review. **Current Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 1–13, 2023.

PARIZOTTO, L. A. Optimization of culture conditions and bench- scale production of anticancer enzyme L- asparaginase by submerged fermentation from *Aspergillus terreus* CCT 7693. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.

PERALTA, MARINA, R.; TERENCE, F.; JORGE, J. A. fl-D-Glycosidase activities of *Humicola grisea* : biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. v. 1033, p. 243–249, 1990.

PR, K.; PD, B. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 46, n. 3, p. 281–287, 2016.

RABELO, N. G. **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR *Aspergillus caespitosus* CCDCA 11593.** [s.l.: s.n.].

RAMOS, R. C. *et al.* *Cunninghamella echinulata* DSM1905 biofilm- pneumatically-driven bioreactors. p. 1–11, 2024.

RANI, S. A.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. B. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279–282, 2012.

RASBOLD, L. M. **β -FRUTOFURANOSIDASE DE *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM: PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE AÇÚCAR INVERTIDO**. [s.l: s.n.].

RASBOLD, L. M. *et al.* *Cunninghamella echinulata* PA3S12MM invertase: Biochemical characterization of a promiscuous enzyme. **Journal of Food Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1–9, 2021.

RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. SUPPL.1, p. 1–9, 2013.

SA, A. Y. *Fusarium* sp. L-asparaginases: purification, characterization, and potential assessment as an antileukemic chemotherapeutic agent. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 8, p. 11243–11254, 2022.

SANIA, A. *et al.* Engineering Tk1656 , a highly active L -asparaginase from *Thermococcus kodakarensis* , for enhanced activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 281, n. P3, p. 136442, 2024.

SARQUIS, M. I. DE M. *et al.* Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.

SCHMITT, C. *et al.* **SCREENING DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA E DE PROTEÍNAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA MATA ATLÂNTICA**. 2020.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574–581, 2012.

SILVA, L. I. DA. **L-ASPARAGINASE, UM PROTÓTIPO DE FÁRMACO UTILIZADO NO TRATAMENTO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA, PRODUZIDA POR BACTÉRIAS: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**. [s.l: s.n.].

SILVA, L. F. *et al.* *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 162, out. 2018.

SOUZA, N. P. DE. **Otimização da extração da enzima asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* expressa em *Pichia pastoris***. [s.l: s.n.].

SRIKHANTA, Y. N. *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Distinct physiological roles for the two L -asparaginase isozymes of *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 436, n. 3, p. 362–365, 2013.

STEVENSON, L. *et al.* Wheat bran : its composition and benefits to health , a European

perspective perspective. v. 7486, 2012.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 6, p. e577, 2017.

THAKUR, M. *et al.* Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 1–9, 2014.

THIRUNAVUKKARASU, N. *et al.* L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. **MYCOSPHERE**, v. 2, n. 2, p. 147–155, 2011.

TRIMPONT, M. VAN *et al.* Novel Insights on the Use of L-Asparaginase as an Efficient and Safe Anti-Cancer Therapy. 2022.

TRIVEDI, M.; LAURENCE, J.; SIAHAAN, T. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 6, p. 614–625, 2009.

U.K. LAEMLLI. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature Publishing Group**, v. 227, p. 680–685, 1970.

URDANETA M., S.; LACAZ, C. DA S. **Preservation of fungi in distilled water: preliminary results** Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo, 1965.

VALA, A. K. *et al.* Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 41–46, mar. 2018.

WHITE, T. J. *et al.* **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics**. [s.l.] Academic Press, Inc., 1990.

WISEMAN, A. Handbook of Enzyme Biotechnology. In: **New York: John Wiley & Sons**. [s.l: s.n.]. p. 148.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chemistry**, v. 210, p. 163–171, 2016.

YAP, L. S.; LEE, W. L.; TING, A. S. Y. Optimization of L-asparaginase production from endophytic *Fusarium proliferatum* using OFAT and RSM and its cytotoxic evaluation. **JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS**, v. 191, 2021.

ZUO, S. *et al.* Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable l-asparaginase during French fries processing. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 841–851, 2015a.

ZUO, S. *et al.* Recent research progress on microbial l-asparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069–1079, 1 fev. 2015b.

7. ANEXO

Original paper

Produção de L-asparaginase por fungos isolados da Mata Atlântica e caracterização bioquímica da nova enzima termotolerante de PS1MM

Simone Von Groll¹, Leticia Claudia da Silva¹, Pedro Henrique Nascimento Souza¹, Wállison Justino da Silva¹, Thaís Duarte Bifano¹, José Luis da Conceição Silva¹, Rita de Cássia Garcia Simão¹, Marina Kimiko Kadowaki¹, Alexandre Maller^{1*}

¹*Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil*

*Corresponding author: Dr. Alexandre Maller

2069 Universitária Street, Faculdade, 85819-110 Cascavel - PR - Brazil

Phone number: +55 45 32203290

e-mail: alexandre.maller@unioeste.br

RESUMO

A L-asparaginase catalisa a hidrólise da asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima tem aplicações biotecnológicas significativas, servindo como um agente antitumoral na indústria farmacêutica e como uma ferramenta para mitigar a formação de acrilamida na indústria alimentícia. Este estudo teve como objetivo identificar um fungo capaz de produzir L-asparaginase e caracterizar bioquimicamente a enzima encontrada. Entre os fungos filamentosos analisados por meio de triagem em placas e cultura líquida, a cepa PS1MM foi identificada como uma promissora produtora de L-asparaginase. A maior indução enzimática foi observada ao utilizar 5% (p/v) de glicose como fonte de carbono e 0,4% (p/v) de pena de frango como resíduo agroindustrial e fonte de nitrogênio, incubados por 120 horas. Os valores aparentes de K_m e V_{max} para a hidrólise da L-asparagina foram 0,011 mmol L⁻¹ e 126,5 mmol L⁻¹ min⁻¹, respectivamente. A enzima parcialmente purificada exibiu atividade ótima em pH 7,0 e temperatura de 85 °C. Em relação à especificidade do substrato, a enzima mostrou 100%

de atividade relativa em relação à L-asparagina e 32,9% em relação à L-glutamina. Sua atividade foi aumentada por β -mercaptoetanol e inibida por Mn^{2+} , L-cisteína e ditioneitol (DTT). Os resultados indicam que PS1MM tem potencial para bioprocessamento em larga escala de L-asparaginase e possíveis aplicações na indústria alimentícia.

PALAVRAS-CHAVE: L-asparaginase, fungos filamentosos, indústria farmacêutica, indústria alimentícia.