



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS
DO BIOMA CAATINGA**

Campina Grande/PB

2017

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS
DO BIOMA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos de Interesse Farmacêutico

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profº Drº Harley da Silva Alves

Co-orientador: Drº Tales Alexandre Costa e Silva – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campina Grande/PB

2017

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

R672p Rocha, Wilma Raianny Vieira da.
Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos isolados do bioma caatinga [manuscrito] / Wilma Raianny Vieira da Rocha. - 2017.
109 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2017.
"Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Prof. Dr. Tales Alexandre Costa e Silva, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP".
1. ASNase. 2. Aspergillus terreus. 3. Leucemia linfóide aguda. 4. Biorreator air-lift. I. Título.

21. ed. CDD 615

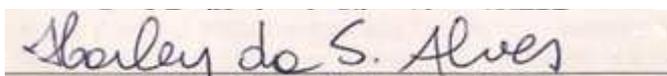
WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS
DO BIOMA CAATINGA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 14 de Fevereiro de 2017.

Banca examinadora



Profº Drº Harley da Silva Alves

Departamento de Farmácia - Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª Drª Ângela Maria Santiago

Departamento de Química – Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profª Drª Glauciane Danusa Coelho

Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento (UATEC) – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

A minha mãe, **Vilma**, pelo amor incondicional e nunca medir
esforços para a minha realização pessoal e profissional,
A minha irmã, **Valma**, pelo apoio e amor dedicados a mim,
Ao meu pai, **Ronaldo**, por se fazer presente em todos os
momentos,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as graças que sempre me presenteia.

À toda minha família pelo amor incondicional e dedicação aos meus objetivos. Minha gratidão eterna Vilma, Valma e Ronaldo.

Ao meu orientador Dr^o Harley da Silva Alves, pela amizade e confiança que depositou em mim e pelas oportunidades de crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu co-orientador e amigo, Dr^o Tales Alexandre Costa e Silva, a quem devo grande parte deste trabalho, sua dedicação me inspirou e me fortaleceu.

As professoras Angêla Maria e Glauciane Coelho pela disponibilidade de avaliarem este trabalho.

À professora Dr^a Raïssa Mayer Ramalho Catão pela disponibilidade de sempre.

Ao professor Dr^o Adalberto Pessoa Junior por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia - USP para realização dos experimentos e pela confiança.

A Arthur Galvão, pelo amor, pela paciência, pela espiritualidade e compreensão.

A Suellen Feitosa, pela amizade e parceria neste trabalho.

Aos amigos e funcionários do Labiotec da USP, em especial, Talita, Alexsandra, Juan, Ignácio, Valker, Luciana, Rafaela, Larissa e Alex pela imensa ajuda, amizade, momento de descontração e conversas construtivas.

Aos amigos da cidade de São Paulo, Lívia, João Paulo, Shu Wei, Filipe, Leonardo e Natasha por me ajudarem a enfrentar essa cidade de coração e cabeça abertos.

A todos os meus amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para a construção desse sonho. Aos amigos da turma de mestrado em Ciências Farmacêuticas 2015, em especial Yargo, Anna Emmanuela e Rawny.

À Universidade Estadual da Paraíba e à Universidade de São Paulo, por serem as sedes da realização deste trabalho. Ao Programa de cooperação acadêmica (PROCAD) pelo apoio financeiro.

*Somente aquele que se dispõe a fazer as coisas
pequenas, que sabe e pode, virá a saber, e
realizar grandes coisas.*

Emmanuel - Chico Xavier

Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos isolados do bioma Caatinga

RESUMO

Wilma Raianny Vieira da Rocha¹; Tales Alexandre Costa e Silva²; Harley da Silva Alves³

A enzima L-asparaginase (ASNase) é utilizada no tratamento de leucemia linfóide aguda, sendo que os medicamentos comerciais contêm ASNase de origem procariótica e a principal desvantagem de seu uso são as reações de hipersensibilidade. Diante disso, este trabalho teve como objetivo a avaliação da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos, representando uma fonte eucariótica alternativa para esta enzima. Foram avaliados 32 fungos isolados do bioma Caatinga no sertão Paraibano quanto à capacidade de produção da L-asparaginase. Inicialmente foi realizado o *screening* qualitativo por meio da utilização do azul de bromotimol como indicador. Os fungos selecionados nessa primeira etapa foram cultivados em meio Czapek Dox modificado para determinação da atividade enzimática, tanto intra quanto extracelular. Para determinar a atividade enzimática foi utilizado método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (ABA) e o *Aspergillus terreus* S-18 foi definido como a melhor cepa produtora. Obteve-se a caracterização dos perfis de crescimento fúngico e produção da enzima com subsequente otimização da produção de biomassa e da enzima por meio de planejamento estatístico dividido em três blocos com repetição do ponto central. Avaliou-se também a recuperação da enzima intracelular por meio do rompimento mecânico do micélio e aumento na escala de produção por meio do cultivo em biorreator *air-lift* (adaptado). Foram selecionados 15 fungos após o *screening* qualitativo. A produção intracelular de ASNase foi maior quando comparada a produção extracelular, sendo que 9 fungos produziram a enzima intracelular no *screening* quantitativo com destaque para produção intracelular do *A. terreus* S-18, que foi de $1,58 \text{ U.g}^{-1}$ ($18,2 \text{ U}$ totais) para ASNase e $0,15 \text{ U.g}^{-1}$ para L-glutaminase (GLUase), apresentando relação ASNase/GLUase de 10,5. Nos cálculos dos parâmetros cinéticos o *A. terreus* S-18 apresentou μ_{Max} de $0,019 \text{ h}^{-1}$, Td de 36,5 h e fator de conversão de substrato em células, na fase de crescimento, de $0,9 \text{ g.g}^{-1}$. Na otimização da produção de biomassa e de ASNase por *A. terreus* S-18, os valores ótimos para produção de biomassa: pH de 5,7 e temperatura de 29 °C e para produção da enzima: pH de 7,0, inóculo de $3,24\text{E}+07$ esporos.mL⁻¹ e temperatura de 29 °C, resultando na produção de 69,3 U totais de ASNase. Na recuperação da enzima obteve-se atividade de $0,8 \text{ U.mL}^{-1}$ por rompimento celular por pérolas de vidro e vórtex. Em biorreator, o inóculo utilizando esporos não resultou em produção de ASNase extracelular e/ou intracelular, já o cultivo utilizando pellets o fungo *A. terreus* S-18 foi capaz de produzir a enzima intracelular, correspondente a 109,7 U totais de ASNase.

Palavras-chave: ASNase; *Aspergillus terreus*; leucemia; cultivo submerso; biorreator *air-lift*.

¹Mestranda em Ciências Farmacêuticas – UEPB

²Co-orientador – USP

³Orientador - UEPB

L-asparaginase production by filamentous fungi isolated from the Caatinga biome

ABSTRACT

Wilma Raianny Vieira da Rocha¹; Tales Alexandre Costa e Silva²; Harley da Silva Alves³

L-asparaginase (ASNase) is used in the treatment of acute lymphoid leukemia, the medicines contain ASNase of prokaryotic origin and the disadvantage of its use are the hypersensitivity reactions, this study had the objective of the evaluation of filamentous fungi for production of enzyme, representing a eukaryotic source. 32 filamentous fungi isolated from the Caatinga biome, through qualitative screening, using bromothymol as indicator and quantitative screening in two stages in modified Czapek Dox medium, using both culture fluid and mycelium to determine the enzymatic activity through L-aspartyl- β -hydroxamic acid (ABA) method. Characterization of *Aspergillus terreus* S-18 growth was carried out, the kinetic parameters {maximum growth rate (μ Max), doubling time (Td) and substrate conversion factor in cells (g.g)} and optimization of biomass and enzyme production. By the best producer through statistical planning divided into three blocks with repetition of the central point in two stages of cultivation, recovery of the intracellular enzyme through mechanical disruption of the mycelium, besides cultivation in an *air-lift* bioreactor (adapted) to evaluate the influence of the inoculum in the production of ASNase, using inoculum with spores and pre-inoculum cultured in rotativo shaker. A total of 15 fungi produced ASNase in qualitative screening, all of which produced the extracellular enzyme but the intracellular production of ASNase was higher when compared to extracellular production, and 9 fungi produced the intracellular enzyme in the quantitative screening with emphasis on intracellular production of *Aspergillus Terreus* S-18, which was 1.58 U.g^{-1} (18.2 U total) for ASNase and 0.15 U.g^{-1} for L-glutaminase (GLUase), showing ASNase/GLUase ratio of 10.5. In the kinetic parameters *A. terreus* S-18 had μ Max of 0.019 h^{-1} , Td of 36.5 h and substrate conversion factor in cells in the growth phase of 0.9 g.g^{-1} . In the optimization of biomass and ASNase production by *A. terreus* S-18, the optimum values defined for biomass production: pH 5.7 and temperature of $29 \text{ }^\circ\text{C}$, already for enzyme production: pH 7.0, inoculum of $3.24\text{E}+07 \text{ spores.mL}^{-1}$ and temperature of $29 \text{ }^\circ\text{C}$, resulting in the production of 69.3 U total of ASNase. In the recovery of the enzyme, 0.8 U.mL^{-1} activity was obtained using cell disruption by glass beads and vortex. In the bioreactor cultivation, the inoculum using spores did not result in the production of extracellular and / or intracellular ASNase, and the culture using pellets of the fungus *A. terreus* S-18 was able to produce the intracellular enzyme, corresponding to $109.7 \text{ total U ASNase}$.

Keywords: ASNase; *Aspergillus terreus*; Leukemia; Submerged culture; Bioreactor *air-lift*

¹Master's Degree student of Pharmaceutical Sciences – UEPB

²Co-supervisor – USP

³Professor – UEPB

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Reação catalisada pela enzima L-asparaginase.....	19
CAPÍTULO I	
Figura 1. Reação catalisada pela enzima L-asparaginase.....	41
Figura 2. Local da coleta das amostras das raízes, dos caules, das folhas e dos frutos de coqueiros e do solo do coqueiral localizado em Várzeas de Sousa, PB, Brasil.....	45
Figura 3. (A) Frascos baffed com cultura dos fungos filamentosos. (B) Agitador rotativo com controle de temperatura.....	47
Figura 4. Determinação da atividade qualitativa da produção de L-asparaginase.....	56
Figura 5. Perfil cinético de biomassa, consumo de glicose e pH em função do tempo (h) de cultivo pré-fermentativo.....	59
Figura 6. Acompanhamento cinético do perfil de produção das enzimas pelo fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	60
Figura 7. Valores preditos e observados na otimização da biomassa.....	63
Figura 8. Influência da temperatura e pH na biomassa produzida pelo fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	64
Figura 9. Valores preditos e observados na otimização da produção de L-asparaginase intracelular pelo fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	65
Figura 10. Influência das variáveis na otimização da produção de L-asparaginase de <i>A. terreus</i> S-18.....	68
Figura 11. Atividade de L-asparaginase, proteínas totais e atividade específica a	

partir do rompimento celular do fungo <i>A. terreus</i> S-18, utilizando pérolas de vidro e vórtex.....	70
Figura 12. Atividade de L-asparaginase, proteínas totais e atividade específica a partir do rompimento celular do fungo <i>A. terreus</i> S-18, utilizando congelamento seguido de trituração.....	71
Figura 13. Eletroforese de proteínas a partir do rompimento celular do fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	72

CAPÍTULO II

Figura 1. Esquema de Biorreator STR (a) e Biorretor <i>air-lift</i> (b).....	81
Figura 2. Biorreator adaptado para <i>air-lift</i>	85
Figura 3. Micélio em forma de pellets, característica de fermentações submersas com rotação.....	87
Figura 4. Gráfico para cálculo de $k_L a$	89
Figura 5. Cultivo C1 em biorreator adaptado para <i>air-lift</i> utilizando vazão 0,5 vvm de oxigênio.....	90
Figura 6. Acompanhamento cinético da produção de L-asparaginase e biomassa <i>A. terreus</i> S-18 no cultivo C2 em biorreator – Etapa fermentativa.....	92
Figura 7. Cultivo C1 em biorreator adaptado para <i>air-lift</i> utilizando vazão 0,5 vvm de oxigênio.....	93

LISTA DE TABELAS

	Pág.
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Identificação dos fungos filamentosos isolados no coqueiral nas Várzeas de Sousa – PB produtores de L-asparaginase.....	45
Tabela 2. Constituição do meio Czapek Dox utilizado no cultivo pré-fermentativo.....	47
Tabela 3. Planejamento experimental dividido em três blocos com repetição do ponto central <i>A. terreus</i> S-18 para otimização da biomassa.....	51
Tabela 4. Planejamento experimental dividido em três blocos com repetição do ponto central <i>A. terreus</i> S-18 para otimização da produção de ASNase.....	52
Tabela 5. Resultado da avaliação quantitativa das enzimas extracelulares: L-asparaginase e L-glutaminase	56
Tabela 6. Resultado da avaliação quantitativa das enzimas intracelulares: L-asparaginase, L-glutaminase e proteases.....	57
Tabela 7. Valores de biomassa obtida no modelo do planejamento experimental para otimização da biomassa do fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	61
Tabela 8. Valores ótimos dos fatores testados para produção de biomassa de <i>A. terreus</i> S-18.....	64
Tabela 9. Valores de L-asparaginase obtida no modelo do planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase do <i>A. terreus</i> S-18.....	65
Tabela 10. Valores ótimos dos fatores testados para produção de L-asparaginase.....	68
Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de rompimento celular.....	71

LISTA DE QUADROS

	Pág.
Quadro 1. Demonstrativo de espécies de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase.....	22

CAPÍTULO I

Quadro 1. Valores dos resíduos obtidos na otimização da produção de biomassa pelo fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	62
Quadro 2. Análise da variância para biomassa.....	63
Quadro 3. Valores dos resíduos obtidos na otimização da produção de L-asparaginase pelo fungo <i>A. terreus</i> S-18.....	66
Quadro 4. Análise da variância para produção de L-asparaginase.....	67

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
CAPÍTULO I	
Anexo 1. Padronização do método de quantificação de asparaginase pelo método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA).....	98
Anexo 2. Determinação de curvas de calibração para dosagem de glicose e proteínas totais.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

AHA - Ácido L-aspartil- β -hidroxâmico

ASNase - L-asparaginase

BTB - Azul de bromotimol

CDM - Czapek Dox Modificado

G - Gramas

g.L⁻¹ - Gramas por Litro

GLUase - L-glutaminase

INCA - Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

Km - Constante de Michaelis Menten

NCBI - National Center for Biotechnology Information

LLA - Leucemia linfoide aguda

Mg - Miligrama

mL - Mililitro

m/v - Massa por volume

PDA - Agar Batata Dextrose

pH - Potencial hidrogeniônico

p/v - Massa por volume

q.s.p. - Quantidade suficiente para

rpm - Rotações por minuto

U - Unidade de atividade enzimática

U.g⁻¹ - Unidade de atividade enzimática por grama

U.mL⁻¹ - Unidade de atividade enzimática por mililitro

V/V - Volume por volume

μ L - Microlitro

μ Max - Velocidade máxima de crescimento (h⁻¹)

Td - Tempo de duplicação (h)

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	16
2. Fundamentação teórica	19
2.1 L-asparaginase (ASNase).....	19
2.1.1 Histórico.....	19
2.1.2 Farmacologia e toxicidade.....	20
2.2 Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos.....	22
2.3 Aplicações da enzima L-asparaginase.....	23
2.3.1 Leucemias.....	23
2.3.1.1 Leucemia linfocítica aguda.....	25
2.3.2 L-asparaginase na indústria de alimentos.....	27
2.4 Recuperação de enzimas intracelulares.....	28
3. Referências	30
CAPÍTULO I - Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos do bioma Caatinga utilizando fermentação submersa	38
RESUMO	39
ABSTRACT	40
1. Introdução	41
2. Objetivos	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3. Materiais e métodos	44
3.1 Coleta, isolamento e identificação dos micro-organismos.....	44
3.2 Seleção de fungos filamentosos pela produção de L-asparaginase.....	45
3.2.1 Análise qualitativa da produção de L-asparaginase.....	45
3.2.2 Análise quantitativa da produção de L-asparaginase.....	46
3.2.3 Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase e L-glutaminase.....	47
3.3 Perfil cinético da etapa pré-fermentativa de <i>Aspergillus terreus</i> S-18.....	48
3.3.1 Curva de crescimento fúngico.....	48
3.3.2 Determinação da concentração de glicose e pH no meio.....	49
3.3.3 Cálculos dos parâmetros cinéticos de <i>Aspergillus terreus</i> S-18.....	49
3.4 Perfil cinético da etapa fermentativa de <i>Aspergillus terreus</i> S-18.....	50
3.4.1 Curva de produção de L-asparaginase e L-glutaminase intracelular.....	50
3.4.2 Quantificação da atividade proteolítica intracelular.....	50
3.5 Otimização da produção de biomassa e da produção da L-asparaginase de <i>Aspergillus terreus</i> S-18 em agitador rotativo.....	51

3.6 Ensaio de rompimento celular de <i>Aspergillus terreus</i> S-18 para obtenção de L-asparaginase.....	52
3.6.1 Condições de cultivo.....	52
3.6.2 Rompimento celular utilizando pérolas de vidro e vórtex.....	53
3.6.3 Rompimento celular utilizando congelamento seguido por trituração.....	53
3.6.4 Determinação de proteínas totais.....	54
3.6.6 Eletroforese SDS-PAGE.....	54
3.7 Análise estatística.....	54
4. Resultados e Discussão	55
5. Conclusão	73
6. Referências	74
CAPÍTULO II - Influência do inóculo de <i>Aspergillus terreus</i> (S-18) em biorreator <i>air-lift</i> (adaptado) para produção de L-asparaginase.....	77
RESUMO	78
ABSTRACT	79
1. Introdução	80
2. Objetivos	83
2.1 Objetivo geral.....	83
2.2 Objetivos específicos.....	83
3. Materiais e métodos	84
3.1 Micro-organismo e condições de cultivo.....	84
3.2 Biorreator utilizado e cálculo do coeficiente volumétrico de transferência (k_{La}).....	84
3.3 Cultivo em biorreator utilizando esporos.....	86
3.4 Cultivo em biorreator utilizando micélio obtido em agitador rotativo.....	87
3.5 Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase.....	87
3.6 Estimativa de biomassa e pH do meio de cultivo.....	88
3.7 Análise estatística.....	89
4. Resultados e Discussão	90
5. Conclusão	95
6. Referências	96
ANEXOS	98

1. INTRODUÇÃO

A partir da década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, foram desenvolvidos processos fermentativos realizados em condições assépticas, pela grande demanda da produção de antibióticos (MCNEIL; HARVEY, 2008), sendo possível aplicar as técnicas também na produção de vacinas, anticorpos, aminoácidos e enzimas (CHISTI; MOO-YOUNG, 2002; VITOLO, 2015).

Nesse contexto, as enzimas apresentam grande importância devido às características físico-químicas que regem em uma reação bioquímica e pela especificidade dos substratos, desempenhando papel importante e de forte interesse para aplicação industrial, sendo a indústria alimentícia a que mais movimentava o mercado de enzimas. A descoberta de novas enzimas auxilia tanto no crescimento do mercado como nas suas abrangências de aplicações biotecnológicas (SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Tendo em vista o crescimento do mercado e o interesse por novas enzimas com aplicações diferenciadas, têm-se desviado a atenção para o isolamento e caracterização de enzimas microbianas, já que os micro-organismos são reconhecidos como valiosas fontes de enzimas com características especiais (PATEL; SINGH; DODIA, 2005).

Os fungos filamentosos compreendem um grande grupo de organismos de interesse biológico. Muitas espécies produzem metabólitos úteis, como pigmentos, enzimas, vitaminas e antibióticos. Uma característica importante dos fungos filamentosos é a sua utilização na indústria alimentícia, farmacêutica e têxtil, devido à elevada eficiência na produção de enzimas. Por esse motivo, têm-se estudado espécies de fungos não apenas para compreender doenças de humanos e de plantas, mas também para identificar metabólitos para fins industriais e até mesmo novos antibióticos (SCHOBERLE; NGUYEN-COLEMAN; GREGORY, 2013).

Sabe-se que a produção de enzimas por micro-organismos é influenciada pelos componentes do meio de cultivo, especialmente as fontes de carbono e nitrogênio, além de fatores adicionais, tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e concentração do inóculo (JOHNVESLY; NAIK, 2001).

Dentre as enzimas de importância clínica, destaca-se a L-asparaginase (ASNase) que é amplamente produzida por plantas, animais e micro-organismos. Pela facilidade de manuseio e crescimento os micro-organismos são os mais

estudados na produção de metabólitos deste tipo. Estudos demonstraram que os fungos filamentosos apresentam destaque na produção de ASNase, sendo que as espécies mais conhecidas por produzirem a enzima são: *Aspergillus terreus* (VARALAKSHMI; RAJU, 2013; ALMEIDA, 2015), *Aspergillus tamaritii* (SARQUIS, 2002), *Fusarium* (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012) e *Aspergillus flavus* (PATRO et al., 2014).

Os fungos apresentam facilidade e rapidez no crescimento e necessitam de espaço reduzido para a produção de enzimas (WU et al., 2006; ABD EL BAKY; EL BAROTY, 2016). A L-asparaginase isolada de fungos filamentosos pode apresentar algumas vantagens, dentre elas: ser de origem eucariótica, o que pode minimizar reações de hipersensibilidade em pacientes em tratamento com a enzima em função de propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e não acontecem nos seres procarióticos, os quais são a fonte atual da produção de ASNase comercializada (LARSON, 1998; AVRAMIS; TIWARI, 2006).

Além de ser utilizada no tratamento de leucemia linfóide aguda (LLA), a ASNase têm sido amplamente citada no tratamento de outras neoplasias como a doença de Hodgkin's, a leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (DUVAL et al., 2002; Wink, 2009; KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

A LLA é definida como uma proliferação das células linfóides indiferenciadas, com predominância de linfócitos B na maioria dos casos, caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea, timo, sangue periférico e órgãos linfóides (BÉNÉ et al., 1995; FARIAS; CASTRO, 2004; NEHMY et al., 2011). A maior incidência da LLA ocorre na infância, entre dois a cinco anos, diminuindo na adolescência e nos adultos jovens, porém aumentando a partir dos 40 anos, predominantemente no sexo masculino indivíduos de cor branca, sendo a sua etiologia desconhecida (EMERECIANO et al., 2004; OLIVEIRA; DINIZ; VIANA, 2004).

Para o tratamento de crianças com LLA são utilizadas drogas em combinação, com mecanismos de ação diferentes, de acordo com as fases do tratamento. Em uma destas fases a enzima ASNase é extrema importância durante a terapia, sendo utilizada na indução da remissão da doença, em protocolos pediátricos e adultos (PIETERS et al., 2011).

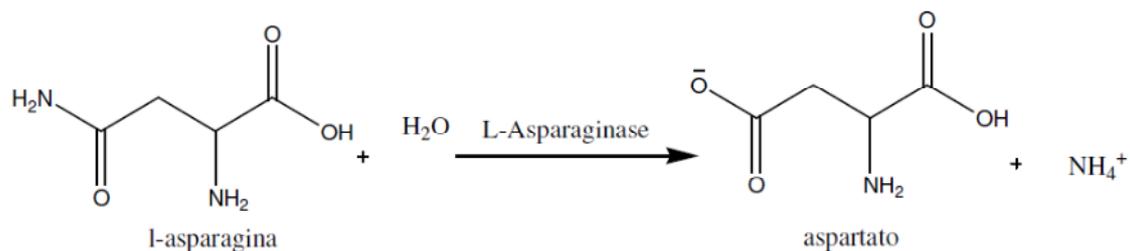
Utilizar micro-organismos na busca de novas fontes de ASNase, principalmente de origem eucariótica, é extremamente importante, já que é possível utilizar fontes naturais e renováveis e obter maiores quantidades do produto por meio da otimização do processo e cultivo em biorreatores que permitem a produção em maior quantidade (U) da enzima.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 L-ASPARAGINASE (ASNase)

A enzima L-asparaginase é classificada como uma hidrolase, responsável pela catálise da reação do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012; NOMME et al., 2012) esquematizada a Figura 1. Segundo Loureiro (2010) pode também ser chamado de L-asparagina amino hidrolase, uma vez que catalisa a hidrólise do grupo amino a cadeia lateral, transformando-o em ácido.

Figura 1. Reação catalisada pela enzima L-asparaginase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007)



A reação catalisada pela enzima ASNase acarreta deficiência da oferta plasmática do aminoácido L-L-asparagina, acarretando dificuldade na síntese de proteínas, replicação de DNA e tradução do RNA. Dessa forma as células terão dificuldade na realização regular das funções celulares o que promovendo apoptose da população de células neoplásicas, já que estas não são capazes de sintetizar o aminoácido (GRAHAM, 2003; FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013).

2.1.1 Histórico

O estudo da ASNase vem sendo realizado desde os anos 20, quando Clementi (*Apud* NARTA et al., 2007) descobriu a enzima no soro de mamíferos, observando presença de atividade da enzima em soro de porquinhos-da-índia.

Posteriormente, Kidd (1953) observou a inibição do crescimento de tumores induzidos em ratos e camundongos depois do tratamento com soro de porquinhos da Índia, o que não ocorria com o soro de coelhos, de cavalo e nem com soro

humano (GRAHAM, 2003; BROOME, 1968). Broome (1961) correlacionou estudos de Kidd e Clementi, afirmando que a atividade antitumoral estava relacionada a atividade enzimática da ASNase. Posteriormente, Broome ainda na década de 60, confirmou o potencial terapêutico da enzima (BROMME, 1963a, 1963b). Em 1966, segundo Yellin e Wriston foi possível purificar parcialmente duas isoformas da ASNase, utilizando o soro dos porquinhos da Índia, mas apenas uma das isoformas exibiu atividade anti-tumoral *in vivo*.

Os pesquisadores McCoy et al. (1956) observaram que o crescimento e a viabilidade de alguns tumores dependiam de aminoácidos obtidos de fontes externas às células tumorais e dentre esses de L-asparagina.

Como a extração da enzima do soro dos porquinhos da Índia demonstrou-se quantidade insuficiente para realização de testes clínicos, surgiu a necessidade de buscar novas fontes de obtenção da enzima, por meio da pesquisa da produção por micro-organismos (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; LOUREIRO, 2010).

Estudos relataram a purificação da enzima ASNase a partir de cepas da bactéria *Escherichia coli* e demonstraram que atividade anti-tumoral da enzima foi semelhante àquela encontrada no soro dos porquinhos da Índia (MASHBURN E WRISTON, 1964; CAMPBELL E MASHBURN, 1969), dando início à obtenção de quantidades adequadas para a realização de ensaios clínicos por meio da produção enzimática em escalas maiores (ASSELIN et al., 1993; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

2.1.2 Farmacologia e toxicidade

A L-asparagina é um aminoácido não essencial, haja vista que pode ser sintetizado a partir de intermediários das vias metabólicas principais e age nas células normais dos mamíferos estando intimamente ligada na síntese proteica. Esse aminoácido é obtido a partir da utilização da enzima asparagina sintetase, garantindo à maioria das células humanas a produção dos seus próprios suprimentos de L-asparagina, sem que seja necessário obtê-los da dieta (MULLER; BOSS, 1998).

Algumas células tumorais são incapazes de garantir seu próprio estoque de asparagina, já que não possuem a enzima L-asparagina sintetase, e reação enzimática de hidrólise realizada pela ASNase rapidamente diminui os níveis

celulares de asparagina presentes no corpo, ocorrendo resposta positiva ao tratamento com a ASNase tendo em vista que essas células precisam de oferta extracelular desse aminoácido (MULLER; BOSS, 1998; BUSHMAN et al., 2000; DHALE; MOHAN-KUMARI, 2014). A hidrólise da L-asparagina causa deficiência da oferta do aminoácido as células, acarretando dificuldade na síntese de proteínas, ocasionando inibição da duplicação de DNA e tradução de RNA, interferindo diretamente na realização regular das funções celulares e consequente apoptose da população de células neoplásicas, já que estas não são capazes de sintetizar o aminoácido (GRAHAM, 2003; FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013).

O tratamento da LLA inclui quatro fases: indução da remissão da doença, consolidação, manutenção e profilaxia do sistema nervoso central (SNC). O objetivo do tratamento é induzir a remissão completa da doença atingindo o valor de menos de 5% de blastos na medula óssea e restaurando a hematopoiese normal (PUI; EVANS, 2006; JEHA; PUI, 2009).

Apesar de ser um biofármaco bastante utilizado, sabe-se que a ASNase pode apresentar atividade de L-glutaminase (GLUase), demonstrando que apresenta afinidade tanto pelo aminoácido L-asparagina como pelo aminoácido L-glutamina (MILLER, SLASER, BALIS, 1969; DAVIDSON et al., 1977). Tal afinidade reduz os níveis plasmáticos de glutamina em pacientes durante o tratamento, uma vez que ela é convertida em ácido glutâmico e amônia. Pesquisas indicam que o aumento dos efeitos colaterais em pacientes que recebem a enzima durante o tratamento prolongado do câncer deve-se a este fator (POCHEDLY, 1972; NARTA et al., 2007), tendo sido relatados casos de reações imunológicas, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e alterações da coagulação.

As três formas da ASNase terapêuticamente utilizadas são: L-asparaginase nativa e a L-asparaginase peguilada (PEG-asparaginase: possui ligação covalente com um grupo polietilenoglicol) obtidas de *Escherichia coli* e a L-asparaginase obtida por *Erwinia chrysanthemi* (CORTIJO-CASCAJARES; JIMÉNEZ-CEREZ; TEJADA, 2012). Os três tipos possuem o mesmo mecanismo de ação, mas diferem nas suas propriedades farmacocinéticas (RIZZARI et al., 2013).

2.2 PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

Os fungos filamentosos compreendem um grande grupo de organismos de interesse biológico. Muitas espécies produzem metabólitos úteis, como pigmentos, enzimas, vitaminas e antibióticos ao passo que algumas outras espécies são infecciosas e causam doenças em seres humanos, outros animais e plantas. Uma característica importante dos fungos filamentosos é a sua utilização em várias indústrias devido à elevada eficiência na produção de enzimas e apresentam facilidade e rapidez no crescimento e necessitam de espaço reduzido para a produção de enzimas (WU et al., 2006). Entre os exemplos de origem fúngica estão: o antibiótico penicilina, o imunossupressor ciclosporina e o agente hipocolesterolemizante lovastatina (BRAKHAGE; SCHROECKH, 2011).

Os fungos filamentosos apresentam destaque também na produção de L-asparaginase, algumas espécies são conhecidas por produzirem a enzima ASNase, conforme o quadro 1.

Quadro 1. Demonstrativo de espécies de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase

Autor / Ano de publicação	Espécie de fungo filamentoso	Localização da produção da enzima
Gulati; Saxena; Gupta, 1997	<i>Penicillium nigricans</i> ; <i>P. granulatum</i>	--
Gulati; Saxena; Gupta, 1997	<i>Aspergillus terreus</i> ; <i>A. oryzae</i>	--
Sarquis et al., 2004	<i>Aspergillus terreus</i> ; <i>A. taramii</i>	Extracelular
Loureiro et al., 2012	<i>Aspergillus terreus</i>	Extracelular
Tippani; Sivadevuni, 2012	<i>Fusarium</i> sp.	Extracelular
Mohanr; Manonmani, 2013	<i>Cladosporium</i> sp.	Extracelular
Varalakshmi; Raju, 2013	<i>Aspergillus terreus</i>	Extracelular
Patro et al., 2014	<i>Aspergillus flavus</i>	Extracelular

Existem relatos de estudos biotecnológicos de expressão heteróloga da enzima ASNase. Dessa forma o gene de um micro-organismo produtor da enzima pode ser expresso em outro micro-organismo que apresente melhores

características para a indústria, principalmente no fator crescimento, como a levedura *Pichia pastoris* (CORREIA, 2015; DIVINO, 2015).

Para a obtenção de enzimas de uso clínico vários fatores são importantes para resultar em um produto final eficaz, portanto a produção de ASNase é muito influenciada pela composição do meio de cultivo e depende também dos diferentes fatores que envolvem as condições do processo fermentativo como o tipo de incubador, a temperatura, o pH do meio de cultivo, a quantidade do inóculo utilizado, a agitação do processo, além do tempo do processo fermentativo (WEI; LIU, 1998; HYMAVATHI et al., 2009; GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012). A seleção de fungos produtores de enzimas em geral utilizadas nos tratamentos clínicos deve levar em consideração o fato de a espécie não produzir micotoxinas nas condições de cultivo em questão, não ser patogênica ao homem e ser de fácil manipulação genética (RAJASEKARAN; CHANDRASEKARAN; MUTHUSELVAM, 2008).

A fermentação submersa é a técnica mais utilizada para a produção de enzimas, porém as fermentações em estado sólido já foram utilizadas anteriormente para produzir ASNase a partir de fungos filamentosos (ORLANDELLI et al., 2012). A utilização de subprodutos de resíduos agroindustriais foi demonstrado por Zia (2013) na produção de ASNase a partir da espécie *A. niger*. Bem como Loureiro (2010) demonstrou a utilização de cultivo submerso na produção da enzima por *A. terreus*.

2.3 APLICAÇÕES DA ENZIMA L-ASPARAGINASE

2.3.1 Leucemias

Em condições normais, a medula óssea possui um número pequeno de células ainda imaturas. As leucemias estão incluídas em grupo de doenças neoplásicas originadas da multiplicação dessas células imaturas na medula óssea, os blastos. Inicialmente as células pluripotentes hematopoiéticas possuem a capacidade de diferenciação em dois tipos celulares, a linhagem linfóide e a linhagem mieloide (SCHOCH et al., 2001). Nas leucemias essas linhagens imaturas não se diferenciam e conseqüentemente não formam células maduras, que darão origem as células normais do sangue periférico, ocorrendo um acúmulo de células imaturas na medula óssea. Tal fato que justifica, no quadro clínico de leucemia,

achados dessas células, no sangue periférico, no fígado, baço, linfonodos outros órgãos, principalmente dos tecidos mais vascularizados (GREAVES; WIEMELS, 2003; HAMERSCHLAK, 2005; LORENZI, 2005).

As leucemias podem ser classificadas em: linfoide ou mieloide, de acordo com o precursor celular que sofreu malignização ou, aguda ou crônica, de acordo com a fisiopatologia da doença (FOON; TODD, 1986; WANG; DICK, 2005).

Dentre as principais causas para manifestação da doença estão associados fatores ambientais que atuam sobre indivíduos com maior suscetibilidade (CONKRITE, 1987). Sabe-se que a hematopoiese é controlada por genes reguladores e inibidores e quando há um desequilíbrio ocorre um descontrole do crescimento das células hematopoiéticas (VIDEIRA; DEBONI; ARAÚJO, 2002). As alterações hereditárias e as influências do meio ambiente, podem também criar condições predisponentes para o desenvolvimento das leucemias, bem como a exposição a radiação ionizante, ao benzeno, contato com substâncias tóxicas, as infecções, as condições sócio-econômicas são consideradas fatores carcinogênicos (OLIVEIRA; NETO, 2004; LORENZI, 2005; SILVEIRA; ARRAES, 2008).

As leucemias acometem tanto crianças como adultos, sendo uma doença de progressão rápida em que no diagnóstico as células imaturas correspondem a cerca de 20% ou mais da celularidade medular, ocasionando anemia, neutropenia e trombocitopenia (LORENZI, 2005; SILVA et al., 2006). Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 420.310 novos casos de tumores pediátricos. Entre os tipos de câncer infanto-juvenil, a leucemia é o mais comum na maioria das populações (25 a 35%) (INCA, 2016), sendo a leucemia linfoide aguda (LLA) cinco vezes mais frequente representando cerca de 75% de todos os diagnósticos de leucemia na infância quando em comparação com a leucemia mieloide aguda (LMA) (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; ONCIU, 2009). As leucemias agudas correspondem de 15 a 45% das neoplasias malignas diagnosticadas, mais frequentes, em crianças de 2 a 15 anos (CAMARGO et al., 2010), enquanto que as leucemias crônicas são mais raras (CHEOK; LUGTHART; EVANS, 2006).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), para 2016 no Brasil estimam-se 5.540 novos casos de leucemia em homens e 4.530 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,63 casos novos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres.

2.3.1.1 Leucemia linfoide aguda

A leucemia linfoide aguda (LLA) caracteriza-se pela proliferação das células linfoides indiferenciadas que se acumulam na medula óssea, com predomínio da linhagem B em 85% dos casos (BÉNÉ et al., 1995; FARIAS; CASTRO, 2004). O hemograma revela anemia, neutropenia e trombocitopenia com contagem de leucócitos habitualmente elevada com nítido predomínio de blastos além da presença de infiltração leucêmica extra-medular (KEBRIAEI; ANASTAS; LARSON, 2003; LEITE et al., 2007). A medula óssea apresenta-se com infiltração maciça de linfoblastos e intensa hipoplasia eritrocítica, granulocítica e megacariocítica (FARIAS; CASTRO, 2004).

Em geral os sintomas mais frequentes estão correlacionados aos achados celulares durante o diagnóstico. A anemia apresentada pelo paciente causa astenia, mal-estar, redução da tolerância ao exercício e palidez, já a trombocitopenia, causa petéquias, equimoses, epistaxe e sangramento nas fezes ou na urina (KEBRIAEI; ANASTAS; LARSON, 2003; PUI; THIEL, 2009). Geralmente ocorrem manifestações clínicas secundárias que são decorrentes da proliferação de blastos e da infiltração destes em diferentes tecidos como amígdalas, linfonodos, pele, baço e rins (NEHMY et al., 2011). São frequentes também, episódios de febre, perda de massa, suores noturnos e envolvimento do sistema nervoso central e dor nos membros (KEBRIAEI; ANASTAS; LARSON, 2003).

Dentre as causas da LLA estão associadas as interações de vários processos, sendo a alteração genética um dos fatores mais importantes, além da susceptibilidade do hospedeiro, sucessivas alterações cromossômicas e a provável incorporação de informações genéticas virais transmitidas às células progenitoras (GREAVES; WIEMELS, 2003; KEBRIAEI; ANASTAS; LARSON, 2003; CANALLE et al., 2004; BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007).

O diagnóstico e classificação da LLA são realizados de acordo com as características citológicas, citoquímicas, fenotípicas e cariotípicas (EMERECIANO et al., 2004; FARIAS; CASTRO, 2004). A confirmação do diagnóstico se dá apenas após a realização do mielograma, com a análise morfológica complementada pelos exames de imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular, fundamentais para a escolha do esquema terapêutico (CIUDAD et al., 1998; BOROWITZ et al., 2005; DIGIUSEPPE, 2007; COUSTAN-SMITH et al., 2011).

A LLA apresenta maior incidência em menores de 15 anos de idade do sexo masculino predominando em crianças brancas, sendo a neoplasia maligna que corresponde a cerca de 15% a 45% dos casos de tumores malignos infanto-juvenis no Brasil (INCA, 2016). A maior incidência ocorre ainda em portadores de outras afecções, como síndromes de imunodeficiência e distúrbios genéticos (PUI; RELING; DOWNING, 2004; CHEOK; LUGTHART; EVANS, 2006; ADELMAN et al., 2007; LEITE et al., 2007; ONCIU, 2009).

O tratamento da LLA está esquematizado em três fases importantes: indução, consolidação e manutenção, onde são utilizadas drogas de diversos mecanismos de ação. Durante a fase de indução o objetivo é o retorno à hematopoiese normal, levando os pacientes à remissão da doença. Nesta fase estão incluídos uma combinação de quatro agentes antineoplásicos, entre eles, a enzima ASNase. A duração dessa fase inicial do tratamento é de quatro semanas e as taxas de remissão atingidas giram em torno de noventa e cinco por cento (PUI; EVANS, 2006; ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014; QUINTANILLA-FLORES et al., 2014).

Na fase de consolidação os objetivos são a busca por manter a remissão, além de prevenir infiltrações no Sistema Nervoso Central (SNC) e tem duração de cerca de 2 a 8 meses de tratamento onde são administradas altas doses de metrotexato. Seguindo da fase de manutenção com duração de, pelo menos, dois anos para o controle da doença, com a utilização de doses baixas de metrotexato combinado, na grande maioria dos esquemas, com mercaptopurina (JEHA; PUI, 2009).

O maior problema durante o tratamento de neoplasias malignas está no fato de que a dose necessária da quimioterapia para destruir as células malignas tem toxicidade elevada para as células normais, causando inúmeras reações ao paciente, acarretando a procura de tratamentos mais específicos. Levando em consideração que algumas linhagens de células tumorais não são capazes de produzir aminoácidos e dependem das concentrações destes presentes no plasma para a síntese proteica, surgiu uma modalidade de tratamento antitumoral que consiste na redução dos níveis plasmáticos de aminoácidos, comprometendo a síntese proteica das células tumorais, com menor comprometimento de células normais (FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013).

Dessa maneira, a enzima ASNase é capaz de transformar o aminoácido L-asparagina em ácido aspártico (SHRIVASTAVA et al., 2015). Como as células

tumorais, mais especificamente os linfócitos, precisam de alta concentração de asparagina para acompanhar seu rápido crescimento, a enzima será responsável de evitar que o aminoácido esteja livre no plasma para utilização na síntese proteica, fazendo com que as células não se multipliquem (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). O esgotamento extracelular de L-asparagina, inibe a síntese proteica em linfoblastos e induz à apoptose da população de células neoplásicas, o que não ocorre com células normais, que tem a capacidade de produzir o aminoácido asparagina, por meio da asparagina-sintetase (FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013).

Neste contexto a enzima ASNase é uma das mais utilizadas no tratamento da LLA (LOUREIRO, 2010; PIETERS et al., 2011; SAISON et al., 2014). Atualmente, existem três formas da enzima terapeuticamente utilizadas, todas obtidas a partir de cepas bacterianas. Porém, embora esta enzima tenha sido uma das maiores contribuições para o tratamento da LLA, seu uso ainda é limitado devido aos importantes efeitos colaterais (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; GUILLEME et al., 2013; TONG et al., 2014). O estudo da produção de ASNase de origem eucariótica, de fungos filamentosos, pode minimizar tais reações, em função de propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e não acontecem nos seres procarióticos.

2.3.2 L-asparaginase na indústria de alimentos

A acrilamida é um composto considerado potencialmente cancerígeno e neurotóxico em seres humanos, havendo relatos do aparecimento de sintomas como paralisia e formigamento nas mãos e nos pés. Alguns estudos relataram neoplasias malignas em ratos relacionadas a este composto (HENDRIKSEN et al., 2005). Tendo em vista que a acrilamida pode estar presente em elevadas concentrações em alimentos populares e de alto consumo o seu monitoramento e controle em alimentos é questão de grande relevância.

A ocorrência de acrilamida na fumaça de cigarro poderia indicar que esta substância era formada durante a combustão incompleta ou aquecimento de matéria orgânica (BERGMARK, 1997). Sendo confirmada, posteriormente, em estudos in vivo por meio da oferta de ração frita a 200 °C para animais (TAREKE et al., 2000).

A reação de Maillard é responsável pela cor marrom e pelo sabor dos alimentos cozidos, assados e torrados. Esta reação envolve misturas de

aminoácidos e açúcares redutores, submetidas a altas temperaturas, estudos mostraram que a presença de asparagina aumentava significativamente o nível de acrilamida formada, principalmente acima de 120 °C. (MOTTRAM; WEDZICHA; DODSON, 2002; STADLER et al., 2002). Além disso, por meio de experimentos com ^{13}C e ^{15}N marcados, observou-se que átomos de carbono e nitrogênio da molécula de acrilamida eram provenientes dos locais correspondentes da molécula de asparagina (MOTTRAM et al., 2002; STADLER et al., 2002).

A maior parte das tentativas de reduzir os níveis de acrilamida nos alimentos acaba inibindo a reação de Maillard, afetando as propriedades sensoriais dos produtos. Uma alternativa para redução de formação de acrilamida em alimentos é o tratamento com a enzima ASNase, existe no mercado de enzimas um preparado enzimático contendo ASNase extracelular obtidas pela clonagem de *Aspergillus oryzae*, capazes de remover seletivamente a asparagina antes mesmo do processo de aquecimento, reduzindo a toxicidade de certos produtos (HENDRIKSEN et al., 2005).

2.4 RECUPERAÇÃO DE ENZIMAS INTRACELULARES

Os micro-organismos possuem características individuais relacionadas ao funcionamento da maquinaria celular, isso também se refere a localização específica de certas enzimas, dependendo da necessidade específica da utilização dessas nas diversas funções celulares. As enzimas, portanto, podem estar localizadas no periplasma, no citoplasma ou até mesmo no interior de organelas citoplasmáticas, como as mitocôndrias. Segundo Assenjo e colaboradores (1991) o método de extração depende diretamente da enzima de interesse.

A enzima ASNase é relatada como presente no periplasma, como a enzima utilizada para tratamento de LLA, que é obtida da *Escherichia coli* (MASHBURN; WRISTON, 1964; CAMPBELL; MASHBURN, 1969) e também como sendo liberada pelo micro-organismo *A. terreus* no meio de cultura (LOUREIRO, 2010).

Segundo Quines (2015) para recuperar produtos do metabolismo de micro-organismos deve-se levar em consideração a redução das perdas de produto nas diferentes etapas do processo, a obtenção de um produto de elevada pureza e com características físicas e térmicas preservadas e obtenção sustentável do produto,

utilizando-se produtos químicos de baixa toxicidade que não comprometam o meio ambiente.

Diferentes métodos podem ser empregados para liberação de enzimas intracelulares, dos quais dependem a força da parede do micro-organismo, localização dentro da célula, além de características específicas da enzima de interesse, como estabilidade em pH e temperatura, e o uso posterior da enzima (PANDIT; HARRISON; FARKADE, 2005).

Os métodos empregados para lise de células e consequente recuperação de enzimas são: químico, por meio da digestão da parede celular pelo contato direto das células com agentes químicos, como EDTA e solventes orgânicos; físicos, utilizando temperatura e ação mecânica direta nas células, como por congelamento seguido de trituração; e biológicos, pela aplicação de enzimas digestivas da parede celular (QUINES et al., 2015).

Em geral, estudos de recuperação de enzimas envolvem a combinação de métodos entre si, até que seja definida qual a melhor condição de rompimento para recuperação do produto de interesse.

3. REFERÊNCIAS

- ABD EL BAKY, H.H.; EL BAROTY, G.S. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. **Evid Based Complement Alternat Med.** v.2016, p.178-198, 2016.
- ALMEIDA, R.P.C. **Avaliação da produção de l- asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado.** 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília, 2015.
- ASENJO, J.A.; ANDREWS, B.A.; HUANG, R.B. Differential product release (DPR) of proteins from yeast: a new technique for selective product recovery. **Biotechnol. Bioeng.**, v.38, p.977, 1991.
- ASSELIN, B.; WHITIN, J.; COPPOLA, D.; RUPP, I.; SALLAN, S.; COHEN, H. Comparative Pharmacokinetic Studies of Three Asparaginase Preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v.11, p.1780-1786, 1993.
- ADELMAN, A.; GROVES, F.; O'ROURKE, K.; SINHA, D.; HULSEY, T.; LAWSON, A.; WARTENBERG, D.; HOEL, D. Residential mobility and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an ecological study. **British Journal of Cancer**, v.97, p.140 – 144, 2007.
- ANDRADE, A.; BORGES, K.; SILVEIRA, V. Update on the Use of l-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clin Med Insights Oncol**, v.8, p.95-100, 2014.
- AVRAMIS V.I., TIWARI P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylatedASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Int. J. Nanomedicine**, v.3, p.241–254, 2006.
- BÉNÉ, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL), **Leukemia**, v.9, p.1783-1786, 1995.
- BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review **Environmental Health Perspectives**, v.115, p.138-145, 2007.
- BERGMARK, E. Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. **Chemistry Research Toxicology**, Washington, v.10, p.78-84, 1997.
- BOROWITZ, M.; PULLEN, D.; WINICK, N.; MARTIN, P.; BOWMAN, W.; CAMITTA, B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: implications for residual disease detection: a report from the children's oncology group. **Cytometry B Clin Cytom**, v.68, p.18-24, 2005.
- BRAKHAGE, A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genet Biol**, v.48, p.15-22, 2011.
- BROOME, J.D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **Nature**, v.119, p.1114-1115, 1961.

BROOME, J.D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in 75 relation to those of the antilymphoma substance. **J Exp Med** v.118, p.99-120, 1963a.

BROOME, J.D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **J Exp Med**, v.118, p.121–148, 1963b.

BROOME, J.D. Studies on the mechanism of tumor inhibition by L-asparaginase. Effects of the enzyme on asparagine levels in the blood, normal tissues, and 6C3HED lymphomas of mice: differences in asparagine formation and utilization in asparaginase-sensitive and -resistant lymphoma cells. **Journal of Experimental Medicine**, v.127, p.1055-1072, 1968.

BUSHMAN, J.; PALMIERI, D.; WHINNA, H.; CHURCH, F. Insight into the mechanism of asparaginase-induced depletion of antithrombin III in treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, v.24, p.559-565, 2000.

CAMARGO, B.; SANTOS, M.; REBELO, M.; REIS, R.; FERMAN, S.; NORONHA, C.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v.126, p.715-720, 2010.

CAMPBELL, H.A.; MASHBURN, L.T. L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. **Biochemistry**, v.8, p.3768-3775.

CANALLE, R.; BURIM, R.; TONE, L.; TAKAHASHI, C. Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Environmental and Molecular Mutagenesis** v.43, p.100-109, 2004.

CHEOK, M.; LUGTHART, S.; EVANS, W. Pharmacogenomics of acute leukemia. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.46, p.317-353, 2006.

CIUDAD, J.; SAN MIGUEL, J.; LOPEZ-BERGES, M.; VIDRIALES, B.; VALVERDE, B.; OCQUETEAU, M.; MATEOS, G.; CABALLERO, M.; HERNANDEZ, J.; MORO, M.; MATEOS, M.; ORFAO, A. Prognostic value of immunophenotypic detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v.16, p.3774-3781, 1998.

CORREIA, R.C. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP3) em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris***. 82p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2015.

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M.J.; TEJADA, A.H. Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. **Farmácia Hospitalaria**, v.36, p.148-158, 2012.

COUSTAN-SMITH, E.; SONG, G.; CLARK, C.; KEY, L.; LIU, P.; MEHRPOOYA, M.; STOW, P.; SU, X.; SHURTLEFF, S.; PUI, C.; DOWNING, J.; CAMPANA, D. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. **Blood** v.117, p.6267-6276, 2011.

CRONKITE, E.P. Chemical leukemogenesis: benzene as a model. **Seminars in Hematology**, v.24, p.2-11, 1987.

DAVIDSON, L.; RUSSELL BREAR, D.; WINGARD, P.; HAWKINS, J.; KITTO, B.G. Purification and Properties of an L-Glutaminase-LAsparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. **Journal of Bacteriology**, v.129, p. 1379-1386, 1977.

DEJONG P.J. L-asparaginase production by *Streptomyces griseus*. **Applied & Environmental Microbiology**, v.23, p.1163-1164, 1972.

DHALE, M. A.; MOHAN-KUMARI, H. P. A comparative rapid and sensitive method to screen L-asparaginase producing fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v.102, p. 66-68, 2014.

DIGIUSEPPE, J. Acute Lymphoblastic Leukemia: Diagnosis and Detection of Minimal Residual Disease Following Therapy. **Clinics Laboratory Medicine**, v.27, p.533-549, 2007.

DIVINO, B.S. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris***. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2015.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, p.2734-2739, 2002.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **J Biochem Mol Biol**, v.37, p.387-393, 2004.

EMERENCIANO, M.; BOSSA, Y.; ZANROSSO, C.W.; ALENCAR, D.M.; CAMPOS, M.M.; DOBBIN, J.; CARRIÇO, K.; OLIVEIRA, M.S.P. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, p.183 –189, 2004.

FARIAS, M.G; CASTRO, S.M. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfoides Agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 40, p.91-98, 2004.

FERNANDEZ, C.; CAI, X.; ELOZORY, A.; LIU, C.; PANETTA, J.; JEHA, S.; MOLINELLI, A.; RELLING, M. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with leukemia. **Int J Clin Exp Med**, v.6, p.478-487, 2013.

FOON, K.; TODD, R. Immunologic Classification of Leukemia and Lymphoma. **Blood**, v.68, p.1-31, 1986.

GUILLEME, C.; DELGADO, R.; NAVARRO, J.; AGUIRRE, I.; SOLA, S.; CODINA, J.; SOLER, J.; RAMIREZ, L.; GARICANO, J.; MARTINEZ, B.; LOPES, L. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **An Pediatr (Barc)**, v.79, p.311-329, 2013.

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

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Design of Experiments and Artificial Neural Network Linked Genetic Algorithm for Modeling and Optimization of L-asparaginase Production by

Aspergillus terreus MTCC 1782. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p.50-58, 2011.

GRAHAM, M. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p.1293-1302, 2003.

GREAVES, M.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.639-649, 2003.

HAMERSCHLAK, N. Leucemias: uma doença Potencialmente Curável? **Prática Hospitalar**, v.7, p.13, 2005.

HENDRIKSEN, H. V. et al.. Asparaginase-mediated reduction of acrylamide formation in baked, fried and roasted products. **Journal of Biotechnology**, v.118, p.S135, 2005.

HYMAVATHI, M.; SATHISH, T.; SUBBA RAO, C.; PRAKASHAM, R. Enhancement of L-Asparaginase Production by Isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) Using Response Surface Methodology. **Appl Biochem Biotechnol**, v.159, p.191-198, 2009.

IMADA, A., IGARASI, S., NAKAHAMA, K., ISONO, M. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms, **Journal of General Microbiology**, v.76, p.85-99, 1973.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>, 2016. Acesso em: 29 de setembro de 2016.

JEHA, S.; PUI, C. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematol Oncol Clin N Am**, v.23, p.973-990, 2009.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v.37, p.139-144, 2001.

KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **Scientific World Journal**, v. 2012, p.1-6, 2012.

KEBRIAEI, P.; ANASTAS, J.; LARSON, R. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Pract Res Clin Haematol**, v.15, p.597-621, 2003.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal Experimental Medicine**, v. 98, n., p. 565-581, 1953.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications, **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

LARSON, R.A.; FRETZIN, M. H.; DODGE, R. K.; SCHIFFER, C. A. Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.12, p.660-665, 1998.

LEITE, E.; MUNIZ, M.; AZEVEDO, A.; SOUTO, F.; MAIA, A.; GONDIM, C.; BANDEIRA, F.; MELO, R. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v.7, p.413-421, 2007.

LIMA, M.S.; SANTOS, B.A.C.; SOARES, J.M.M.Q.; LIMA, T.R.A.; SILVA, T.H.L. Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v.5, p.49-53, 2015.

LOUREIRO, C.B. **Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)**. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

LOUREIRO C.B., BORGES K.S., ANDRADE A.F., TONE, L.G., SAID, S. Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-asparaginase Produced by *Aspergillus terreus*: Evaluation *in vitro* of Antineoplastic Activity. **Adv Microb**, v.2, p.138-145, 2012.

LORENZI, T.F. Doenças Proliferativas da Linhagem mieloide. In: LORENZI, TF.; NETO, SW. VERRASTRO, T. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, fisiologia, Patologia e Clínica**. 1 ed.São Paulo: Atheneu, 2005, c.14, p.111- 113.

MASHBURN, L.T.; WRISTON, J.C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Arch Biochem Biophys**, v.105, p.450-452, 1964.

MCCOY, T. A.; MAXWELL, M.; NEUMAN, R.E. The amino acid requirements of the Walker Carcinosarcoma 256 *in vitro*. **Cancer Research**, v.16, p.979-985, 1956.

MOHAN KUMAR, N.S.; MANONMANI, H.K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium sp.* **World J Microbiol Biotechnol**, v.29, p.577-587, 2013.

MOTTRAM, D.S.; WEDZICHA, B.L.; DODSON, A.T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. **Nature**. v.419, p.448-449, 2002.

MULLER, H.; BOSS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.28, p.97-113, 1998.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D.G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.137-148, 2011.

MILLER, H.; SLASER, J.; BALIS, M. Amino acids levels following L-asparaginase aminohydrolase (E.C.3.5.1.1) therapy. **Cancer research**. v.29, p. 183-187, 1969.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.61, p.208-221, 2007.

NEVALAINEN, K.M.H.; TE’O, V.S.J.; BERGQUIST, P.L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.468-474, 2005.

NEHMY, R.; BRITO, A.; MOTA, J.; OLIVEIRA, B. A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Materno-Infantil**, v.11, p.293-299, 2011.

NOMME, J.; SU, Y.; KONRAD, M.; LAVIE, A. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v.51, p.6816-6826, 2012.

OLIVEIRA, B.M, DINIZ, M.S; VIANA, M.B. Leucemias Agudas na Infância. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.14, p.33-39, 2004.

OLIVEIRA, R.A.G.; NETO, A. P. Aplicação da Classificação French-American-British para as Leucemias agudas e Mielodisplásicas. In: OLIVEIRA, R.A.G.; NETO, A. P. **Anemias e Leucemias: Conceitos Básicos e Diagnósticos por Técnicas Laboratoriais**. 1 ed. São Paulo: Roca Ltda, 2004, cap. 12, p.311-357.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, v.23, p.655–674, 2009.

ORLANDELLI, R.; SPECIAN, V.; FELBER, A.; PAMPHILE, J. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, p.97-109, 2012

PANDIT, A.B.; HARRISON, S.; FARKADE, V.D. Heat induced translocation of proteins and enzymes within the cell: an effective way to optimize the microbial cell disruption process. **Biochem. Eng. Journal**, v.23, p.247, 2005.

PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S.P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. **Process Biochemistry**, v.40, p.3569–3575, 2005.

PATRO, K.; BASAK, U.; MOHAPATRA, A.; GUPTA, N. Development of new medium composition for enhanced production of L-Asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of environmental biology**, v.35, p.295-300, 2014.

PIETERS, R.; HUNGER, S.P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C.H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. **Cancer**, v.117, p.238-249, 2011.

POCHEDLY, C. Neurotoxicity due to CNS therapy of leucemia. **Medical pediatric oncology**, v.3, p.101-115, 1972.

PUI, C. H.; RELING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute Lymphoblastic Leukemia. **The new england journal of medicine**, v.350, p.1535-1548, 2004.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v.354, p.166-178, 2006.

PUI, C.; THIEL, E. Central Nervous System Disease in Hematological Malignancies: Historical Perspective and Practical Applications. **Semin Oncol**, v.36, p.S2-S16, 2009.

QUINES, L.K.M; SCHMIDT, M.; ZANFONATO, K.; SCHMIDELL, W.; ARAGÃO, G.M.F. Métodos de extração de poli-hidroxiácido a partir de biomassa bacteriana. **Quim. Nova**, v.38, p. 1207-1218, 2015.

QUINTANILLA-FLORES, D.; FLORES-CABALLERO, M.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, R.; TAMEZ-PÉREZ, H.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, J. Acute Pancreatitis and Diabetic Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Case Rep. Oncol. Med.**, v.2014, p.1-3, 2014.

- RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. **Advanced BioTech.**, v.7, p.19-25, 2008.
- RIZZARI, C.; CONTER, V.; STARÝ, J.; COLOMBINI, A.; MOERICKE, A.; SCHRAPPE, M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Curr. Opin. Oncol.**, v.25, p.1-9, 2013
- SAISON, J.; BERGER, F.; LEBOSSE, F.; AUDOUAL, R.; THOMAS, X.; MICHALLET, M. Hepatomegaly and fever at the time of neutrophil recovery revealing L-asparaginase toxicity in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Am J Case Rep**, v.15, p.13-17, 2014.
- SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v.15, p.224-230, 2011.
- SARQUIS, M.I.M.; OLIVEIRA, E.M.M; SANTOS, A.S.; COSTA, G.L. Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p. 489-492, 2004.
- SCHOBERLE, T.J.; NGUYEN-COLEMAN, C.K.; GREGORY, S. May Plasmids for increased efficiency of vector construction and genetic engineering in filamentous fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.58–59, p.1–9, 2013.
- SCHOCH, C.; HAFERLACH, T.; HAASE, D.; FONATSCH, C.; LOEFFLER, H.; SCHLEGELBERGER, B.; STAIB, P.; SAUERLAND, M.; HEINECKE, A.; BUECHNER, T.; HIDDEMANN, W. Patients with de novo acute myeloid leukaemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. **British Journal of Haematology**, v.112, p.118-126, 2001.
- SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A.; KHURSHID, M.; KALAM, M.; JAIN, S.; SINGHAL, P. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v., p. 2015.
- SILVA, R.R.; RODRIGUES, A.; CABRAL, H. Investigation of Liquid and Solid Fermentation Processes of the Fungus *Aspergillus fumigatus* for Protease Production. **Journal of Biotechnology**, v.150, p.419, Supplement, 2010.
- SILVA, G.C.; PILGER, D.A.; CASTRO, S.M.; WAGNER, S.C. Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Mieloides Agudas. **Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial**, v.42, p.77-84, 2006.
- SILVEIRA, N.A; ARRAES, S.M.A.A. A imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arquivo Mudi - Universidade Federal de Maringá**, v.12, p.5-14, 2008.
- STADLER, R.H.; BLANK, I.; VARGA, N.; ROBERT, F.; HAU, J.; GUY, P.A.; ROBERT, M-C, RIEDIKER, S. Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, v.419, p.449–450, 2002.
- TALLURI, V.; BHAVANA, M.; MAHESH KUMAR, M.; RAJAGOPAL, S. L-asparaginase: An ultimate anti-neoplastic enzyme. **International Letters of Natural Sciences**, v.10, p.23-25, 2014.

TAREKE, E.; RYDBERG, P., KARLSSON, P.; ERIKSSON, S.; TÖRNQVIST, M. Acrylamide: a cooking carcinogen? **Chemistry Research Toxicology**, v.13, n.6, p.517-522, 2000.

THENMOZHI, C.; SANKAR, R; KARUPPIAH, V; SAMPATHKUMAR, P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: optimization by response surface methodology. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, p.486-491, 2011.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.3692-3696, 2012.

TONG, W.; PIETERS, R.; TISSING, W.; VAN DER SLUIS, I. Should we use a desensitization protocol in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase? **Haematologica**, v.99, p.1-32, 2014.

TOSA, T.; SANO, R.; YAMAMOTO, K.; NAKAMURA, M.; ANDO, K.; CHIBATA, I. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. **Applied & Environmental Microbiology**, v.22, p.387-392, 1971.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K.J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v.2, p.121-129, 2013.

VIDEIRA, R.S; DEBONI, M.C.Z; ARAÚJO, C.A.S et al.. Oncogenes e Desenvolvimento do Câncer. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v.6, p.71-76, 2002.

VITOLLO, M. **Biotecnologia Farmacêutica – Aspectos sobre a aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015.

WANG, J.; DICK, J. Cancer stem cells: lessons from leukemia. **Trends in Cell Biology**, v.15, p.494-501, 2005.

WINK, P.L. **Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de Erwinia carotovora subsp. atroseptica em Escherichia coli**. 53 p. Dissertação. Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WEI, D. Z.; LIU, H. Promotion of L-asparaginase production by using n-dodecane. **Biotechnology Techniques**, v.12, p.129-131, 1998.

WU, T.Y.; MOHAMMAD, A.W.; JAHIN, M.D.; ANUAR, N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of prefiltered palm oil mill effluent (POME) as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39 p.1223–1229, 2006.

YELLIN, T.; WRISTON JR, J. Antagonism of Purified Asparaginase from Guinea Pig Serum toward Lymphoma. **Science**, v.151, p.998-1004, 1966.

ZIA, M.; BASHIR, R.; AHMED, I.; IFTIKHAR, T. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation Process. **Jurnal Teknologi** v.62, p.47-51, 2013.

CAPÍTULO I

Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos do bioma Caatinga utilizando fermentação submersa

Produção de L-asparaginase por fungos filamentosos do bioma Caatinga utilizando fermentação submersa

RESUMO

A enzima L-asparaginase (ASNase) é utilizada no tratamento de pacientes diagnosticados com a leucemia linfóide aguda. Os medicamentos utilizados contêm ASNase bacteriana que tem como desvantagem as reações de hipersensibilidade dos pacientes. O estudo da produção de ASNase de origem eucariótica, de fungos filamentosos, pode minimizar tais reações, em função de propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e não acontecem nos seres procarióticos. Esse capítulo teve como objetivo estudar a produção de ASNase por fungos filamentosos isolados do bioma Caatinga no sertão Paraibano. Inicialmente foi realizado um *screening* qualitativo, utilizando meio Czapek Dox modificado e azul de bromotimol como indicador. Na segunda etapa foi realizado um *screening* quantitativo por meio do cultivo dos fungos em etapa pré-fermentativa (biomassa) e etapa fermentativa (L-asparaginase) e determinada a atividade enzimática tanto no meio de cultura (enzima extracelular) como no micélio (enzima intracelular). Após determinação do melhor produtor da enzima, foi feito o perfil cinético de biomassa, consumo de glicose e pH do meio de cultura, determinados os parâmetros cinéticos: velocidade máxima de crescimento (μMax), tempo de duplicação (Td) e fator de conversão de substrato em células (g.g^{-1}) - e perfil cinético de produção enzimática. Conhecendo esses perfis, foi realizada a otimização da produção de biomassa e da ASNase, por meio de planejamento estatístico divididos em três blocos com três repetições do ponto central, otimizando os parâmetros: temperatura, pH e concentração do inóculo. Além disso, foram estudados métodos para recuperação da enzima intracelular por meio do rompimento mecânico do micélio. Dentre os fungos avaliados, quinze foram capazes de produzir a enzima no *screening* qualitativo e no quantitativo, sendo que apenas 9 produziram a enzima intracelular. Observou-se que a produção da enzima intracelular foi maior quando comparada à produção da enzima extracelular. Com destaque para o fungo *Aspergillus terreus* S-18, que produziu $1,53 \text{ U.g}^{-1}$ ($18,3 \text{ U}$ totais) para ASNase e $0,15 \text{ U.g}^{-1}$ para L-glutaminase (GLUase), apresentando relação ASNase/GLUase de 10,5. Considerado como o melhor produtor, este fungo foi selecionado para as etapas seguintes do estudo com a enzima. Nos cálculos dos parâmetros cinéticos o fungo *A. terreus* S-18 apresentou μMax de $0,019 \text{ h}^{-1}$, Td de 36,5 h e fator de conversão de substrato e células, na fase de crescimento de $0,9 \text{ g.g}^{-1}$. Na etapa de otimização os valores ótimos definidos para produção de biomassa foram: pH 5,7 e temperatura de $29 \text{ }^\circ\text{C}$, já para produção da enzima: pH 7,0, inóculo de $3,24\text{E}+07$ esporos. mL^{-1} e temperatura de $29 \text{ }^\circ\text{C}$, resultando em cerca de $3,3 \text{ U.g}^{-1}$ de ASNase e $69,3 \text{ U}$ totais da enzima. Na etapa de recuperação da enzima utilizando pérolas de vidro e vórtex, obteve-se uma média de atividade de ASNase de $0,8 \text{ U.mL}^{-1}$.

Palavras-chave: ASNase; *Aspergillus terreus*; leucemia; cultivo submerso.

L-asparaginase production by filamentous fungi from the Caatinga biome through submerged fermentation

ABSTRACT

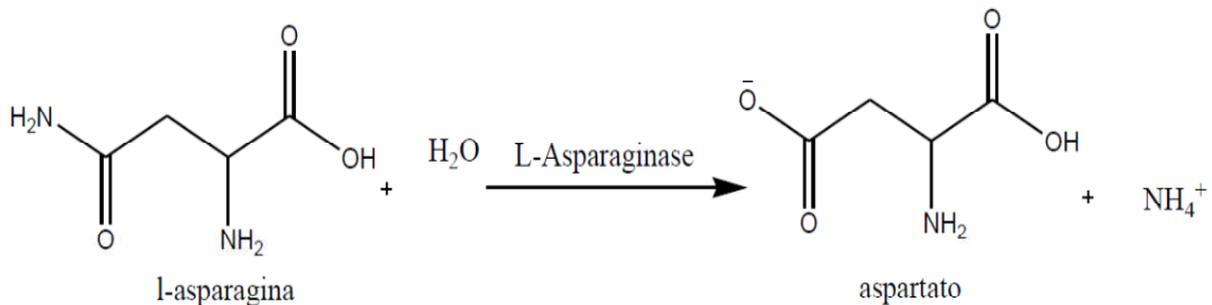
L-asparaginase (ASNase) is used in the treatment of patients diagnosed with acute lymphoid leukemia. The medications used contain bacterial ASNase, which has the disadvantage of patient hypersensitivity reactions. The study of the production of ASNase of eukaryotic origin, of filamentous fungi, can minimize such reactions, due to post-translational properties that occur in these microorganisms and do not occur in prokaryotic beings. This chapter aimed to study the production of ASNase by filamentous fungi. Thirty-two filamentous fungi isolated from the Caatinga biome were used in the Paraibano sertão as well as the production of ASNase by qualitative screening using modified Czapek Dox and bromothymol blue as indicator and quantitative screening through the cultivation of fungi in the pre-fermentative and fermentative stage in modified Czapek Dox medium, and performing the enzymatic activity in both the culture fluid (extracellular enzyme) and in the mycelium (intracellular enzyme) through the L-aspartyl- β -hydroxamic acid (ABA) method. After determination of the best enzyme producer, growth characterization was performed, the kinetic parameters were determined {Maximum growth rate (μ_{Max}), doubling time (Td) and substrate conversion factor in cells (g.g)} and optimization of Biomass and enzyme production, through statistical planning divided into three blocks with three replicates of the central point in two stages of cultivation, optimizing the parameters: temperature, pH and inoculum concentration, besides the intracellular enzyme recovery through the mechanical mycelium. From the total analyzed 15 fungi were able to produce the enzyme in the qualitative and quantitative screening, and only 9 produced the intracellular enzyme in the quantitative screening, it was noticed that the production of intracellular enzyme was higher when compared to the extracellular enzyme. *Aspergillus terreus* S-18 fungus, which produced 1.53 U.g^{-1} (18.3 U total) for ASNase and 0.15 U.g^{-1} for L-glutaminase (GLUase), showed an ASNase/GLUase ratio of 10,5, was select as the best producer and proceeding to the next steps of the enzyme study. The kinetic parameters of *A. terreus* S-18 fungus showed μ_{Max} of 0.019 h^{-1} , Td of 36.5 h and substrate and cell conversion factor, in the growth phase of 0.9 g.g^{-1} . In the optimization of the biomass production and the ASNase enzyme, the optimum values defined for biomass production were: pH 5.7 and temperature of $29 \text{ }^\circ\text{C}$, already for enzyme production: pH 7.0, inoculum of $3.24\text{E}+07 \text{ spores .mL}^{-1}$ and temperature of $29 \text{ }^\circ\text{C}$, resulting in about 3.3 U.g^{-1} of ASNase and 69.3 U total of the enzyme. In the recovery stage of the enzyme the cellular disruption made through glass and vortex beads obtained a mean of ASNase activity of 0.8 U.mL^{-1} . In general, the ASNases produced showed greater selectivity against GLUase activity and may present less toxicity for clinical use.

Keywords: ASNase; *Aspergillus terreus*; Leukemia; Submerged culture.

1. INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (ASNase) é uma enzima terapeuticamente importante em combinação com outros fármacos, é utilizada no tratamento de vários tipos de cânceres hematológicos, tais como leucemia linfocítica aguda (LLA, principalmente em crianças), leucemia mieloide aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, doença de hodgkin, assim como no tratamento de linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (ALMEIDA, 2015). Esta enzima é conhecida por ter propriedades quimioterápicas, já que catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina, sendo esse essencial como fator de crescimento de células tumorais, sendo transformado em aspartato e amônia (SINHA; SINGH; JHA, 2013), como demonstra a Figura 1.

Figura 1. Reação catalisada pela enzima L-asparaginase (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007)



A presença da L-asparagina é essencial para o ciclo normal das células. Na maioria das células humanas o *déficit* endógeno deste aminoácido pode ser compensado pela síntese do ácido aspártico e da glutamina, envolvendo a asparagina sintetase. Esta enzima é ausente em algumas células neoplásicas, particularmente linfoblastos e, assim, com a depleção da asparagina ocorre a apoptose destas células (MÜLLER; BOSS, 1998). Em função disto, na presença de ASNase a célula tumoral estará comprometida com o fator de crescimento e não conseguirá sobreviver (SAVITRI; ASTHANA; AZM, 2002).

Há inúmeros trabalhos que relatam a produção da enzima por bactérias (KOTZIA; LABROU, 2006; KENARI; ALEMZADEH; MAGHSODI, 2011; GERVAIS et al., 2013). Os medicamentos comercializados utilizam L-asparaginase de origem

procariótica e a principal desvantagem de seu uso são as reações de hipersensibilidade, muitas vezes fatais (BORKOTAKY; BEZBARUAH, 2002; SALZER et al., 2013). Efeitos colaterais sérios podem surgir do uso terapêutico de ASNase, tais como choque anafilático, urticária e edema, além de alergias brandas, náuseas, anorexia, anemia, entre outros (CAPIZZI, 1993), além do relato da ocorrência de diabetes mellitus transitório pelo uso da enzima (ALVES, C.; CHAVES, C.; SOUZA, M., 2007) Entretanto há vários relatos de micro-organismos eucariotos, tais como leveduras e fungos filamentosos, que também são produtores de ASNase (CARVALHO, 2003; AVRAMIS, 2012; SEN; MANDAL, 2013; VIANA, M.V., 2016).

A ASNase isolada de fungos filamentosos pode apresentar algumas vantagens, dentre elas, ser de origem eucariótica, o que pode minimizar reações de hipersensibilidade em pacientes em tratamento com a enzima em função de propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e não acontecem nos seres procarióticos, os quais são a fonte atual da produção de ASNase comercializada e utilizada nos tratamentos de LLA. Além disso, fungos apresentam a capacidade de crescer em ambientes sob as mais diversas condições, tais como tempo, temperatura, pH e variando os nutrientes do meio de cultura do processo (MUTHULAKSHMI et al., 2011).

É importante ressaltar que alguns dos fungos filamentosos que produzem enzimas de importância clínica, podem também ser produtores de micotoxinas e podem ser cepas patogênicas ao homem. No momento da seleção de fungos produtores de enzimas deve-se levar em consideração esses aspectos, além de que o micro-organismo deve ser de fácil manipulação genética (RAJASEKARAN; CHANDRASEKARAN; MUTHUSELVAM, 2008).

Portanto, utilizar micro-organismos na busca de novas fontes de ASNase, principalmente de origem eucariótica, é extremamente importante, já que é possível utilizar fontes naturais e renováveis e obter maiores quantidades do produto por meio da otimização do processo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Selecionar fungos filamentosos isolados do bioma Caatinga produtores da enzima L-asparaginase (ASNase).

2.2 Objetivos específicos

- Realizar a seleção de fungos filamentosos, quanto a produção de ASNase, por cultivo submerso em agitador rotativo;
- Verificar a produção de ASNase tanto no meio de cultura como no micélio dos fungos filamentosos utilizados;
- Definir entre os fungos filamentosos utilizados o melhor produtor de ASNase por meio da quantificação da enzima ASNase;
- Avaliar o perfil cinético de produção de biomassa, produção da enzima, consumo de substrato e modificação do pH do meio de cultivo e produção de outras enzimas relacionadas (protease e glutaminase);
- Otimizar as condições de cultivo (pH e temperatura) para produção de biomassa;
- Otimizar as condições de cultivo (inóculo, pH e temperatura) para produção de ASNase;
- Definir as melhores condições de rompimento celular para obtenção da ASNase intracelular.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Coleta, isolamento e identificação dos micro-organismos

Foram utilizados 32 fungos filamentosos coletados de fragmentos das raízes e dos caules dos coqueiros, além de regiões superficiais e mais profundas do solo (MACHADO, 2015). A coleta das amostras foi realizada em um coqueiral localizado na região das Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil (Latitude: 6°45'17.57" S; Longitude: 38°7'23.31") (Figura 2).

Figura 2. Local da coleta das amostras das raízes, dos caules, das folhas e dos frutos de coqueiros e do solo do coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, PB, Brasil.

(Fonte: MACHADO, 2015)



Os fungos foram identificados quanto ao gênero pela técnica de microcultivo (RIDDEL, 1950). Do total de 32 fungos, 25 pertencem ao gênero *Aspergillus sp.*, 4 ao gênero *Cladosporium sp.* e 3 não foram identificados por serem fungos não esporulados (MACHADO, 2015).

A identificação específica dos fungos filamentosos utilizados foi realizada pela técnica de biologia molecular com sequenciamento genético, em parceria com a Msc. Suellen Emilliany Feitosa Machado (Tabela 1). As cepas isoladas se encontram em processo de depósito na micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob responsabilidade da curadora Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta.

Tabela 1. Identificação dos fungos filamentosos isolados no coqueiral nas Várzeas de Sousa – PB produtores de ASNase

Fungo	Identificação da cepa
S-3	<i>Aspergillus niger</i>
S-4	NI*
S-6	<i>Aspergillus fumigatus</i>
S-9	<i>Aspergillus terreus</i>
S-11	<i>Aspergillus fischeri</i>
S-12	<i>Paecilomyces varioti</i>
S-13	<i>Aspergillus niger</i>
S-14	<i>Paecilomyces varioti</i>
S-17	NI
S-18	<i>Aspergillus terreus</i>
S-20	<i>Aspergillus niger</i>
S-22	<i>Aspergillus terreus</i>
S-23	<i>Aspergillus terreus</i>
S-27	<i>Aspergillus terreus</i>
S-31	NI*

Legenda: NI – Não identificado. (Fonte: Msc. Suellen Emilliany Feitosa Machado – Doutoranda em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco).

3.2 Seleção de fungos filamentosos pela produção de L-asparaginase

3.2.1 Análise qualitativa da produção de L-asparaginase

Nesta etapa foram utilizados os 32 fungos isolados no coqueiral das Várzeas de Sousa. Foi preparado o Meio Czapek Dox modificado contendo: 6 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄, 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,5 g.L⁻¹ de NaCl, 20 g.L⁻¹ de L-prolina, 2 g.L⁻¹ de glicose, 0,2 g.L⁻¹ de MgSO₄7H₂O, 0,005 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, pH 5,5. Este meio foi suplementado com 0,007% de azul de bromotimol (BTB), inoculado com as culturas testes e incubado a 30 °C por 120 h. Frascos não inoculados foram definidos como controle negativo de produção da ASNase (MAHAJAN et al., 2013). O aumento do pH, influenciado pela liberação de amônia após a degradação do aminoácido L-asparagina pela ASNase produzida, provoca a mudança de coloração no meio de cultura, uma vez que o BTB é amarelo em pH ácido e azul em pH alcalino (MARAJAN et al., 2012).

3.2.2 Análise quantitativa da produção de L-asparaginase

Os fungos filamentosos que apresentaram resultado positivo na análise qualitativa de ASNase foram selecionados para determinação da produção quantitativa da enzima utilizando as condições determinadas por Loreiro (2010) sendo realizadas culturas em meio líquido divididas em duas etapas:

1ª) Etapa pré-fermentativa, que teve por objetivo produzir biomassa micelial. Foram inoculados cerca de 1.10^7 esporos.mL⁻¹ de meio de cultivo em frascos baffled Nalgene® de 250 mL (Figura 3A) contendo 50 mL do meio Czapek Dox modificado, tendo pH ajustado para 8,0 utilizando KOH a 1M, conforme Tabela 1. A cultura foi mantida sob agitação constante (150 rpm) por 96 horas a 30 °C em agitador rotativo (Figura 3B);

Figura 3. (A) Frascos baffled com cultura dos fungos filamentosos. (B) Agitador orbital com controle de temperatura



(A)



(B)

2ª) Na etapa fermentativa, que teve como objetivo a produção de ASNase, o micélio foi filtrado, lavado com água deionizada, reincubado em frascos baffled Nalgene® de 250 mL contendo 50 mL do meio Czapek Dox modificado, tendo pH ajustado para 8,0 utilizando KOH a 1M e incubado nas mesmas condições da etapa anterior. Nesta etapa o meio de cultura esteve ausente de fontes de nitrogênio inorgânico (NH₄NO₃) e teve a concentração de glicose reduzida de 14% (p/v) para 2% (p/v).

Tabela 2. Constituição do meio Czapek Dox utilizado no cultivo pré-fermentativo

Composição	(g)
Glicose	14,000
L-prolina	10,000
KH₂PO₄	0,152
KCl	0,052
MgSO₄.7H₂O	0,052
NH₄NO₃	0,200
ZnSO₄.7H₂O	0,001
FeSO₄.7H₂O	0,001
CuSO₄.7H₂O	0,001
NH₄NO₃	2,000
Água destilada	q.s.p. para 1000mL

Por último, o micélio foi separado por filtração do meio da cultura, ambos foram utilizados para determinação da atividade enzimática de L-asparaginase e L-glutaminase, segundo procedimento detalhado no item 3.2.3 deste capítulo.

Como foi possível perceber utilizou-se como fonte de nitrogênio orgânico o aminoácido L-prolina, segundo Almeida (2015), esse aminoácido quando utilizado em ambas as etapas foi mais eficaz na produção de ASNase quando comparado a outras fontes de nitrogênio orgânico, como a própria L-asparagina.

3.2.3 Determinação da atividade enzimática da L-asparaginase e L-glutaminase

Durante essa etapa do estudo foram utilizados tanto o meio de cultura (mL) como o micélio (g), ambos obtidos após as duas etapas de fermentação indicadas acima, para avaliação da atividade das enzimas extracelular e intracelular, respectivamente.

A determinação da atividade enzimática de ASNase foi avaliada utilizando a método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA), pela quantificação do β -hidroxamato aspártico produzido pela reação da enzima na presença de hidroxilamina (DRAINAS, 1977), tendo o resultado expresso por U.mL⁻¹ para o meio da cultura e U.g⁻¹ para o micélio. Para a avaliação da atividade a mistura de reação foi constituída de 0,6 mL de tampão Tris-HCl (50 mM), pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina (100 mM); 0,2 mL hidroxilamina (1M) e 1 g de micélio de cada cultura ou 1 mL do meio de cada cultura. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, a reação foi

interrompida com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico a 10 %. Para o preparo do branco foi adicionado 0,5 mL de cloreto férrico a 10 % e, posteriormente, 1 g de micélio ou 1 mL de meio da cultura.

O resultado da reação entre β -hidroxamato aspártico e cloreto férrico produz um composto de coloração avermelhada, o β -hidroxamato aspártico férrico, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman) a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol de β -hidroxamato aspártico por minuto. As reações, curva de calibração, determinação da absorbância máxima e os cálculos para determinação quantitativa de ASNase estão descritas no anexo 1. O melhor produtor de ASNase foi definido como o fungo filamentoso capaz de produzir a maior quantidade de U.g^{-1} para atividade intracelular ou U.mL^{-1} para atividade extracelular, dentre as cepas ensaiadas neste estudo.

Para determinação da atividade enzimática de L-glutaminase (GLUase) foi utilizada a mesma técnica descrita acima, substituindo apenas o substrato da reação por L-glutamina (100 mM) (IMADA et al., 1973). A partir deste resultado é possível verificar a relação ASNase/GLUase.

Os resultados foram expressos em U.mL^{-1} para atividade extracelular de ASNase ou GLUase e em U.g^{-1} para atividade intracelular das enzimas.

Para calcular a atividade total produzida ao final o cultivo foi feito o produto da biomassa final pela concentração de ASNase em U.g^{-1} .

3.3 Perfil cinético da etapa pré-fermentativa de *Aspergillus terreus* S-18

3.3.1 Curva de crescimento fúngico

Para determinar a curva de crescimento de *A. terreus* S-18 foi feito o acompanhamento da produção de biomassa na etapa pré-fermentativa durante o período de 144 horas. A biomassa foi verificada a cada 24 horas por meio do método direto determinado pela massa seca obtida. A técnica consistiu em separar a biomassa, após o tempo de cultivo, por meio de filtração, do meio de cultura. A massa obtida na filtração foi levada a estufa a temperatura de aproximadamente 105 °C até que se obtenha massa constante, cerca de 48 h depois (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

3.3.2 Determinação da concentração de glicose e pH no meio

Para determinação de glicose foi utilizado kit Bioliquid®, que se baseia no método enzimático colorimétrico. As amostras, coletadas a cada dia de cultivo, foram previamente diluídas na proporção 1:20 (amostra:água), evitando que o limite máximo de detecção do método não seja ultrapassado. De acordo com as recomendações do kit para a determinação de glicose foi utilizado 10 µL de amostra em 1 mL de reagente, sendo a mistura incubada a 37 °C em banho termorregulado por 10 minutos. A absorbância do teste foi lida em espectrofotômetro (Beckman) no comprimento de onda de 505 nm. A curva de calibração (Anexo 2) foi realizada utilizando concentrações de glicose que variaram de 0,125 a 1,0 g.L⁻¹, os resultados foram expressos levando em consideração as diluições previamente realizadas.

O pH do meio de cultura ao longo do cultivo foi determinado a cada 24 horas de cultivo utilizando pHmetro previamente calibrado com soluções tampão padrão de pH 4,0, 7,0 e 10,0 durante o período de 144 horas.

3.3.3 Cálculos dos parâmetros cinéticos de *Aspergillus terreus* S-18

Para acompanhar a evolução dos valores de concentração de substrato e células foram utilizadas as seguintes equações, segundo (FEITOSA, 2014):

Velocidade máxima de crescimento (h ⁻¹)	$\mu_{Máx} = \text{Coeficiente angular da reta } \ln X \text{ versus tempo}$	Equação 1
Tempo de duplicação (h)	$T_d = \frac{\ln 2}{\mu_{Máx}}$	Equação 2
Conversão de substrato em células (g.g ⁻¹)	$Y_{x/s} = \frac{X_0 - X_f}{S_0 - S_f}$	Equação 3

Onde:

X = concentração de células; S = Concentração de substrato; X₀ = Concentração inicial de células; X_f = Concentração final de células; S₀ = Concentração inicial de substrato; S_f = Concentração final de substrato.

3.4 Perfil cinético da etapa fermentativa de *Aspergillus terreus* S-18

3.4.1 Curva de produção de L-asparaginase e L-glutaminase intracelular

Para determinar a curva de produção das enzimas foi feito acompanhamento da produção de ASNase e GLUase durante a etapa fermentativa durante o período de 144 horas. A cada 24 horas foram coletadas amostras do micélio formado e determinada a atividade enzimática das enzimas por método descrito por Loureiro (2010).

3.4.2 Quantificação da atividade proteolítica intracelular

A atividade proteolítica do micélio foi quantificada seguindo a metodologia adaptada de Charney e Tomarelli (1947) utilizando como substrato a azocaseína. Foram preparados tubos com a adição de 0,1 g de micélio do fungo, 0,15 mL de reagente azocaseína a 0,5 % (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0 incubados a 37 °C por 40 minutos, em banho termorregulado. Após incubação a reação foi interrompida pela adição de 0,15 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 RPM por 10 minutos a 4 °C. Após a centrifugação 0,1 mL do sobrenadante da amostra foram transferidos para uma microplaca e adicionado 0,1 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 0,5 M. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no teste. A intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Molecular Devices) UV-visível a 430 nm. Da mesma forma foram preparados os brancos das amostras, só que foram previamente aquecidos a 100 °C, durante 20 minutos, inativando as proteases presentes nestas amostras para que não houvesse formação de coloração do teste.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir aumento na absorbância de 0,001 por minuto de reação a 430 nm, sendo expressa em U.g⁻¹. O fator de diluição desta reação equivale a 30.

3.5 Otimização da produção de Biomassa e da produção da L-asparaginase de *Aspergillus terreus* S-18 em agitador rotativo

Para otimização da produção de ASNase foram utilizados planejamentos experimentais estatísticos tanto para etapa de produção de biomassa como na etapa

de produção de ASNase. Nesta etapa foi utilizado planejamento experimental composto central, com o objetivo de investigar a influência de três variáveis independentes para produção da enzima: concentração do inóculo, pH, temperatura, sendo que para biomassa foram avaliadas a influência de apenas duas variáveis: pH e temperatura. Estes estudos foram conduzidos em agitador rotativo, sempre em rotação de 150 RPM, em frascos de 250 mL com 50 mL de meio.

As Tabelas 3 e 4 apresentam a matriz de planejamento experimental utilizados no estudo, para otimização da biomassa e produção de ASNase, respectivamente.

Os dados foram analisados por meio dos testes estatísticos do ANOVA, bem como os gráficos gerados a partir dos resultados de otimização.

Tabela 3. Planejamento experimental dividido em três blocos com repetição do ponto central *A. terreus* S-18 para otimização da biomassa

Nº do experimento	pH	T (°C)
1	4,2	25
2	6,2	25
3	8,2	25
4	4,2	30
5	6,2	30
6	8,2	30
7	4,2	35
8	6,2	35
9	8,2	35
10	6,2	30
11	6,2	30
12	6,2	30

Tabela 4. Planejamento experimental dividido em três blocos com repetição do ponto central *A. terreus* S-18 para otimização da produção de ASNase

Nº do experimento	pH	T (°C)	Inóculo
1	6,2	25	1E+06
2	6,2	30	1E+08
3	6,2	35	5,05E+07
4	7,2	25	1E+08
5	7,2	30	5,05E+07
6	7,2	35	1E+06
7	8,2	25	5,05E+07
8	8,2	30	1E+06
9	8,2	35	1E+08
10	7,2	30	5,05E+07
11	7,2	30	5,05E+07
12	7,2	30	5,05E+07

3.6 Ensaios de rompimento celular de *Aspergillus terreus* S-18 para obtenção de L-asparaginase

3.6.1 Condições de cultivo

O *A. terreus* S-18 foi cultivado em frascos tipo blaffer e incubado sob as condições ótimas de produção da enzima. Duas etapas de cultivo foram utilizadas, conforme Loureiro (2010): 1ª) Etapa pré-fermentativa, cerca de 1.10^7 esporos.mL⁻¹ de meio de cultivo Czapek Dox modificado com volume final de 50 mL, com pH 5,7 sendo mantidas sob agitação constante (150 rpm) por 72 h a 29 °C. Em seguida na 2ª etapa (fermentativa) o micélio obtido na 1ª etapa foi filtrado, lavado com água destilada estéril e reincubado em frascos contendo 50 mL de meio Czapek Dox modificado, com pH 7,0 e mantidas sob agitação constante (150 rpm) por 96 h a 29 °C, estando ausente nesta etapa as fontes de nitrogênio inorgânico.

Por último, o micélio foi separado por filtração e a atividade enzimática da ASNase foi avaliada utilizando a massa micelial produzida que foi utilizada para os ensaios de extração.

3.6.2 Rompimento celular utilizando pérolas de vidro e vórtex

Para a realização dos ensaios de rompimento celular foi utilizada metodologia adaptada de Numanoğlu e Sungur (2004), nos quais foram utilizados tubos falcon de 50 mL, contendo 3 g de micélio obtidos como descrito acima, onde foram acrescentados 6 mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,6, 60 µL de coquetel inibidor de proteases P8215 Sigma®, adicionados imediatamente antes do início da ruptura. Para cada mL de suspensão foram utilizados 1 g de pérolas de vidro, que foram submetidas a banho de ácido, mantendo espaço suficiente no tubo para formação do vórtex.

O período de agitação em vórtex (Vixar) foi de 45 s seguidos com intervalos de 20 s de banho de gelo (NaCl a 33% p/v), sendo a temperatura controlada para que não ultrapassasse 10 °C. Ao longo dos ciclos de rompimento foram retiradas alíquotas do volume total da extração, que foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos a 4 °C, sendo recuperado o sobrenadante em que foram monitorados os seguintes parâmetros: a) atividade de ASNase e b) quantificação de proteínas totais.

3.6.3 Rompimento celular utilizando congelamento seguido por trituração

Foram utilizados tubos falcon de 50 mL, contendo 3 g de micélio que foram submetidos ao congelamento em ultrafreezer (-80 °C) *overnight*. Após esta etapa o micélio congelado foi submetido a trituração manual utilizando gral e pistilo.

Após a trituração foram acrescentados 6 mL de tampão Tris-HCl 50mM (pH 8,6) e 60 µL de coquetel inibidor de proteases P8215 Sigma®. O volume obtido foi transferido para um Becker e submetido a agitação manual sob banho de gelo durante 10 min.

O volume total da extração foi centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos a 4 °C, a fim de separar o micélio rompido do líquido de extração, sendo recuperado o sobrenadante onde foram monitorados os seguinte parâmetros: a) atividade de ASNase de acordo com o item 3.2.3 e b) quantificação de proteínas totais.

3.6.4 Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais, nas amostras de extrato bruto da enzima, foi realizada por meio do método do ácido bicinconínico (BCA). Neste método o sulfato de cobre a 4 % (p/v) foi adicionado ao ácido bicinconínico na proporção de 1:50, resultando no reagente BCA. Foram misturados 50 μL da amostra em 1,0 mL de reagente BCA e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 562 nm logo após a incubação. A curva de calibração (Anexo 2) do método foi realizada utilizando albumina bovina (Sigma®) em diversas concentrações de 0,02 a 0,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ que são respectivamente, o limite mínimo e o limite máximo de detecção do método do BCA.

A partir desse resultado foi possível calcular a atividade específica de ASNase no extrato bruto de enzimas após o rompimento celular. A atividade específica é o resultado da razão entre a quantidade de $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ e a quantidade de proteínas totais ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo o resultado expresso em $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$.

3.6.5 Eletroforese SDS-PAGE

As amostras foram analisadas por SDS-PAGE. As amostras foram aplicadas sob condições redutoras de acordo com Laemmli (1970), em gel de poliacrilamida a 12%. A corrida eletroforética foi realizada utilizando o sistema vertical (Bio-Rad). Foram utilizados marcadores de proteína (proteína Precision Plus, BioRad). Após a corrida os géis foram corados em Coomassie Blue seguido de tratamento com descorante Coomassie, sendo possível observar as bandas formadas.

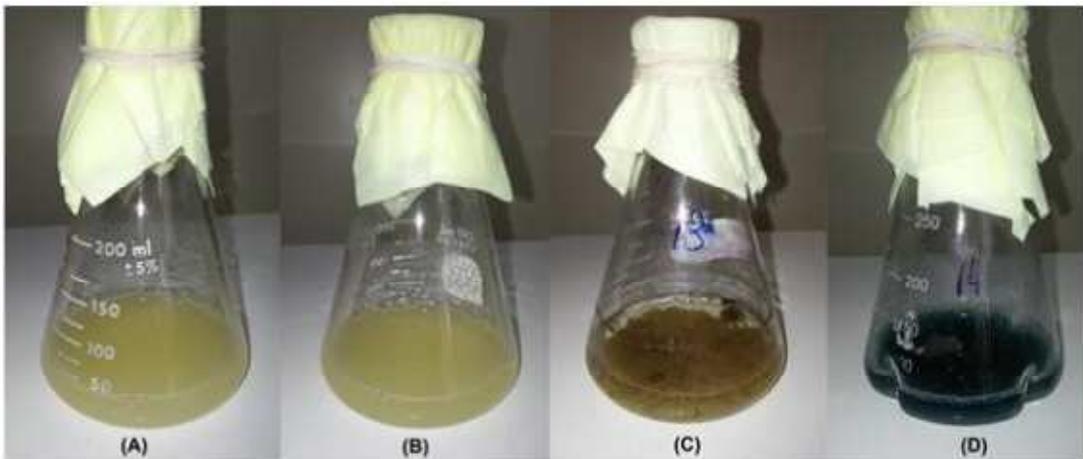
3.7 Análise estatística

Todos os dados foram obtidos em triplicata e analisados por meio dos testes estatísticos do ANOVA. Os gráficos de otimização foram gerados pelo software Statistica. Para a construção dos demais gráficos foi utilizado o software Origin Pro 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De um total de 32 fungos filamentosos utilizados neste estudo, 15 (quinze) fungos apresentaram-se como produtores de ASNase após análise em etapa qualitativa (Figura 4).

Figura 4. Determinação da atividade qualitativa da produção de L-asparaginase. (A) Meio não inoculado (controle 1); (B) Meio inoculado sem prolina (controle 2); (C) Fungo não produtor de L-asparaginase; (D) Fungo produtor de L-asparaginase (Meio tornou-se azul)



O uso de azul de bromotimol (BTB) como indicador qualitativo de produção de ASNase mostrou-se eficiente, assim como relatado por Marajan e colaboradores (2013), que demonstraram atividade qualitativa da enzima testando, entre outros micro-organismos, a espécie *Aspergillus niger*. Segundo Vianna (2016) foi possível verificar atividade enzimática de ASNase em teste qualitativo, em 101 cepas de fungos filamentosos, dentre essas o gênero de destaque foi o *Aspergillus* sp. Após a avaliação da produção qualitativa de ASNase e tendo sido identificados os fungos produtores da enzima, foi realizada a análise da produção quantitativa, utilizando tanto o meio de cultura como o micélio formado durante a etapa fermentativa (96 h de cultivo).

Na etapa quantitativa de produção de ASNase foi possível observar que tanto micélio, em forma de pellets, como o meio de cultura, apresentaram atividade após o período de fermentação. Porém a atividade observada no micélio foi maior que a

atividade encontrada no meio, indicando que os fungos selecionados são melhores produtores de ASNase intracelular.

Na atividade enzimática da ASNase proveniente do meio de cultura é possível verificar que, mesmo com o uso de inibidores de proteases durante a etapa fermentativa (96 h), a produção de extracelular da ASNase (Tabela 5) foi inferior à produção intracelular (Tabela 6). Em estudo semelhante, Vianna (2016) identificou que cepas de *Aspergillus sp.* não produziram ASNase no meio de cultura mesmo tendo apresentado atividade no *screening* qualitativo.

Tabela 5. Resultado da avaliação quantitativa da atividade das enzimas extracelulares: L-asparaginase e L-glutaminase

Fungos	Identificação da cepa	Atividade L-asparaginase (U.mL ⁻¹)	Atividade L-Glutaminase (U.mL ⁻¹)
S-3	<i>Aspergillus niger</i>	0,15	-
S-4	NI*	0,11	-
S-6	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,13	-
S-9	<i>Aspergillus terreus</i>	0,15	0,30
S-11	<i>Aspergillus fischeri</i>	0,11	-
S-12	<i>Paecilomyces varioti</i>	0,07	-
S-13	<i>Aspergillus niger</i>	0,09	0,11
S-14	<i>Paecilomyces varioti</i>	0,14	0,12
S-17	NI*	0,09	-
S-18	<i>Aspergillus terreus</i>	0,10	0,21
S-20	<i>Aspergillus niger</i>	0,05	0,22
S-22	<i>Aspergillus terreus</i>	0,10	0,06
S-23	<i>Aspergillus terreus</i>	0,20	0,10
S-27	<i>Aspergillus terreus</i>	0,10	0,02
S-31	NI*	0,30	0,15

*NI: Não identificado

Estudos anteriores demonstraram que diferentes cepas fúngicas mostraram produção de ASNase, utilizando o meio de cultura, também em concentrações relativamente baixas de atividade enzimática quando comparadas com a atividade intracelular, utilizando o método do AHA para determinação da atividade enzimática. Almeida (2015) analisou diferentes cepas fúngicas e obteve níveis de produção da enzima que variaram de 0,019 e 0,610 U.mL⁻¹, assim como Theantana e colaboradores (2007) que obtiveram níveis de produção de ASNase entre 0,014 e 1,530 U.mL⁻¹ para cepas fúngicas endofíticas. Além de estudo publicado por Loureiro

(2010) que obteve um resultado de 0,254 U.mL⁻¹, utilizando cepa de *A. terreus* para produção da enzima.

Vale ressaltar que Krishnapura e Belur (2016) também demonstraram atividade extracelular de ASNase, maiores quando comparado com este estudo, como que obtiveram níveis de produção de ASNase entre 54,17 e 155,93 U.mL⁻¹, para cepas de fungos filamentosos endofíticos. No entanto, tal estudo foi utilizado o método de Nesslerização para a determinação de atividade enzimática de ASNase, esse método se baseia na liberação de íons amônia (NH₄) pela asparagina, diferenciando do método utilizado neste estudo.

O fato é que cada cepa possui características próprias de produção da enzima, já que é importante considerar que diferentes fatores ambientais como temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio podem afetar diretamente o metabolismo dos fungos filamentosos, sendo que a produção de metabólitos primários e secundários podem contribuir para adaptações evolutivas de cada espécie em determinado habitat (CALVO et al., 2012; ESPOSITO E AZEVEDO, 2010).

Tabela 6. Resultado da avaliação quantitativa das enzimas intracelulares: L-asparaginase, L-glutaminase e protease

Fungos	Atividade L-asparaginase (U.g⁻¹)	Atividade L-Glutaminase (U.g⁻¹)	Relação ASNase/GLUase*	Atividade protease (U.g⁻¹)
S-6	0,23	0,15	1,53	22,35
S-14	0,24	0,21	1,14	25,11
S-17	0,30	0,50	0,60	8,57
S-18	1,58	0,15	10,2	2,56
S-20	1,20	0,20	6,00	11,90
S-22	1,00	0,13	7,69	8,35
S-23	1,10	0,40	2,75	10,14
S-27	0,47	0,12	3,91	21,20
S-31	0,70	0,25	2,80	13,90

Cultivos realizados em agitador rotativo, meio Czapek Dox modificado, pH 8,0, a 30°C, por 96 horas.

A atividade da ASNase no micélio variou entre 0,23 a 1,58 U.g⁻¹ com destaque para o fungo S-18 que se apresentou como o melhor produtor da enzima (Tabela 6) e foi identificado como a espécie *Aspergillus terreus*. Segundo Almeida (2015) foram encontrados genes descritos para a produção da enzima ASNase para as espécies *A. terreus*, no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). A identificação das demais espécies dos fungos filamentosos utilizados e que apresentaram atividade enzimática intracelular e/ou extracelular encontram-se na Tabela 5. Observa-se que a maioria pertence ao gênero *Aspergillus* sp. e a espécie *A. terreus*.

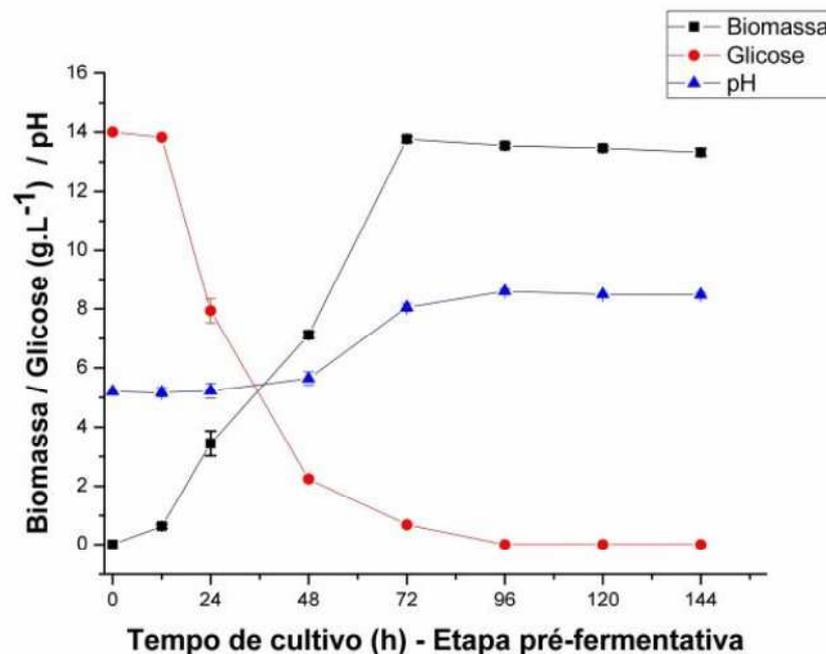
Sabendo que certas ASNases podem apresentar atividade de L-glutaminase (GLUase) (MILLER, SLASER, BALIS, 1969; DAVIDSON et al., 1977) também foi realizada a avaliação da capacidade de hidrólise da glutamina, uma vez que a capacidade de ASNases agirem como GLUase aumentando os efeitos colaterais em pacientes que recebem a enzima durante o tratamento prolongado do câncer (POCHEDLY, 1972). As ASNases produzidas apresentaram baixa atividade como GLUase. Além disso, ao calcular a relação ASNase/GLUase observou-se o indicativo da preferência catalítica da enzima, quanto maior essa relação maior será a preferência pelo substrato asparagina (Tabela 6).

Os dados apontam que o fungo *A. terreus* S-18 apresentou a melhor relação ASNase/GLUase dentre os fungos testados, significando que a quantificação de ASNase foi maior que a de GLUase, além de apresentar outras características também importantes como: a quantidade maior de U.g⁻¹ de ASNase e apresentou a menor produção de proteases (2,56 U.g⁻¹), que são parâmetros importantes quando se visa a produção em escala industrial. De acordo com Papagianni (2004) o sucesso da produção de metabólitos por fungos requer o conhecimento das características de cada micro-organismo e de cada cepa estudada.

Assim, os estudos subsequentes foram realizados visando a obtenção da enzima intracelular, seguido de estudos de rompimento celular para liberação da enzima. Inicialmente foi determinado o perfil cinético dos parâmetros, biomassa, consumo de glicose e pH do meio de cultura durante a etapa pré-fermentativa e o perfil cinético de produção da ASNase, GLUase e proteases nas condições estabelecidas (pH 8,0 e temperatura 30 °C), conforme Figura 5.

Observou-se que o fungo *A. terreus* S-18 apresentou maior crescimento até as 72 h. Após 96 h percebeu-se que a biomassa permaneceu estabilizada até as 144 h de cultivo da etapa pré-fermentativa (Figura 5).

Figura 5. Perfil cinético de biomassa, consumo de glicose e pH em função o tempo (h) de cultivo na etapa pré-fermentativa. Média \pm desvio padrão dos ensaios em triplicata. ANOVA $p < 0,05$

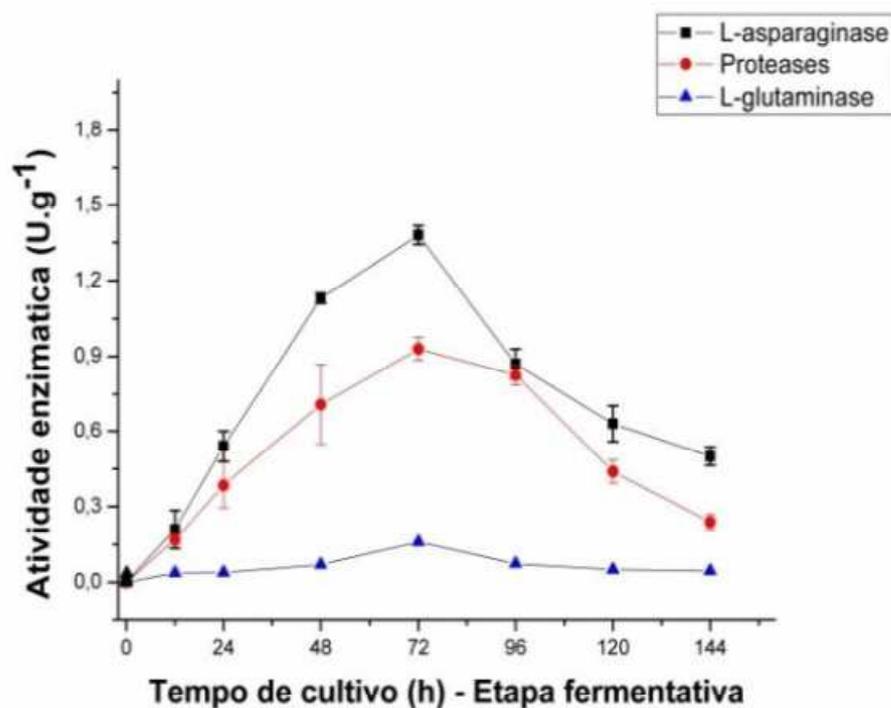


Verificou-se que, para se obter concentração máxima de biomassa na etapa pré-fermentativa, em torno de 14 g.L⁻¹, deve-se manter o inóculo em incubação no período de 72 h a 96 h. Resultados semelhantes foram encontrados em trabalho realizado por Sarquis e colaboradores (2004), em que o fungo *A. terreus* apresentou maior concentração de biomassa no período de 72 h a 96 h, utilizando o meio Czapek Dox modificado, da mesma forma que foi utilizado neste estudo.

Ao calcular os parâmetros cinéticos do consumo de substrato e crescimento observou-se que a velocidade máxima de crescimento (μ_{Max}) foi de 0,019 h⁻¹, com tempo de duplicação de 36,5 h. Como fator de conversão de substrato em células obteve-se o valor de 0,9 g.g⁻¹, ou seja, cerca de 90% do substrato foi convertido em células.

No perfil cinético de produção das enzimas, na etapa fermentativa, é possível verificar que a produção ASNase apresentou aumento até as 72 h de cultivo, no qual foi demonstrado o pico máximo de produção e, em seguida, um declínio gradual após 96 h até o período final analisado (144 h) (Figura 6), sendo o mesmo perfil de produção encontrado por Sarquis e colaboradores (2004) com aumento linear da produção até as primeiras 72 h de cultivo, até cerca de $1,3 \text{ U.g}^{-1}$ de ASNase. Levando em consideração a produção de biomassa, que foi de 14 g.L^{-1} , e a produção de ASNase foi de $1,3 \text{ U.g}^{-1}$, é possível concluir que a atividade total de ASNase, que corresponde ao rendimento total do produto, foi de 18,2 U totais.

Figura 6. Acompanhamento cinético do perfil de produção das enzimas pelo fungo *A. terreus* S-18 – Etapa fermentativa. ANOVA $p < 0,05$



Verificou-se que no período de cultivo de 0 a 72 h a produção de ASNase e proteases seguiu o mesmo perfil, porém no tempo de cultivo de 96 h a produção de ASNase e proteases passaram a estar bem próximas. A diminuição da produção de ASNase pode estar relacionada a produção de proteases, no período entre 72 a 96 h, que degradam as enzimas estudadas (ASNase e GLUase). As proteases podem ser definidas como enzimas que catalisam a clivagem de ligações hidrolíticas dentro

das proteínas, liberando peptídeos e/ou aminoácidos, dessa forma as enzimas perdem sua atividade (THERON; DIVOL, 2014).

Observou-se ainda que a produção de GLUase obedece ao mesmo perfil da produção de ASNase, porém obtendo valores significativamente menores de atividade. Vale ressaltar ainda que a atividade de GLUase foi feita em micélio, e não se trata da enzima purificada, não sendo possível definir que se tratam de duas enzimas diferentes ou apenas da ASNase que apresenta também atividade de GLUase (Figura 7).

Após definir os perfis cinéticos do crescimento fúngico e produção da enzima, foi realizado o estudo de otimização da produção de biomassa e da produção de ASNase.

Os valores de biomassa encontrados no planejamento experimental definido encontram-se na Tabela 6 e estão expressos em concentrações de g.L^{-1} .

Tabela 7. Valores de biomassa obtida no modelo do planejamento experimental para otimização da produção da biomassa do fungo *A. terreus* S-18

Nº experimentos	pH	T (°C)	Biomassa (g.L^{-1})
1	4,2	25	16,20
2	6,2	25	18,32
3	8,2	25	12,66
4	4,2	30	19,58
5	6,2	30	20,98
6	8,2	30	15,14
7	4,2	35	14,40
8	6,2	35	15,88
9	8,2	35	13,12
10	6,2	30	21,00
11	6,2	30	20,92
12	6,2	30	20,84

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada aos resultados experimentais empregando-se a soma dos quadrados dos resíduos como estimativa do erro experimental. Houve formação mínima de resíduos quando em comparação aos

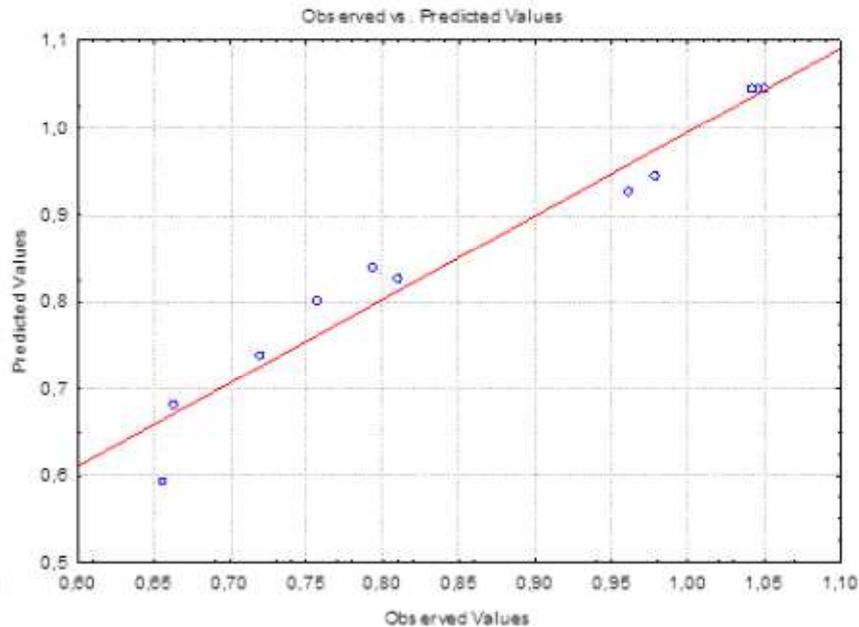
valores previstos pelo modelo e os valores encontrados nos experimentos (Quadro 1).

Quadro 1. Valores dos resíduos obtidos na otimização da produção de biomassa pelo fungo *A. terreus* S-18. Comparação dos valores previstos pelo modelo do planejamento experimental e os valores obtidos no experimento

Nº do Experiment	Valor observado no experimento (g)	Valor predito no Planejamento (g)	Resíduos obtidos
1	0,810000	0,826167	-0,016167
2	0,961000	0,926000	0,035000
3	0,663000	0,681833	-0,018833
4	0,979000	0,944667	0,034333
5	1,049000	1,044500	0,004500
6	0,757000	0,800333	-0,043333
7	0,720000	0,738167	-0,018167
8	0,794000	0,838000	-0,044000
9	0,656000	0,593833	0,062167
10	1,050000	1,044500	0,005500
11	1,046000	1,044500	0,001500
12	1,042000	1,044500	-0,002500

A dispersão entre os valores observados e os valores preditos, no modelo para a variável resposta biomassa, para um limite de confiança de 95% encontram-se na Figura 7. Percebe-se graficamente que houve uma pequena dispersão entre os valores preditos e dos valores experimentais, indicando uma boa qualidade de ajuste ao modelo.

Figura 7. Distribuição dos valores obtidos na otimização da produção da biomassa.
Valores preditos e observados na otimização da biomassa



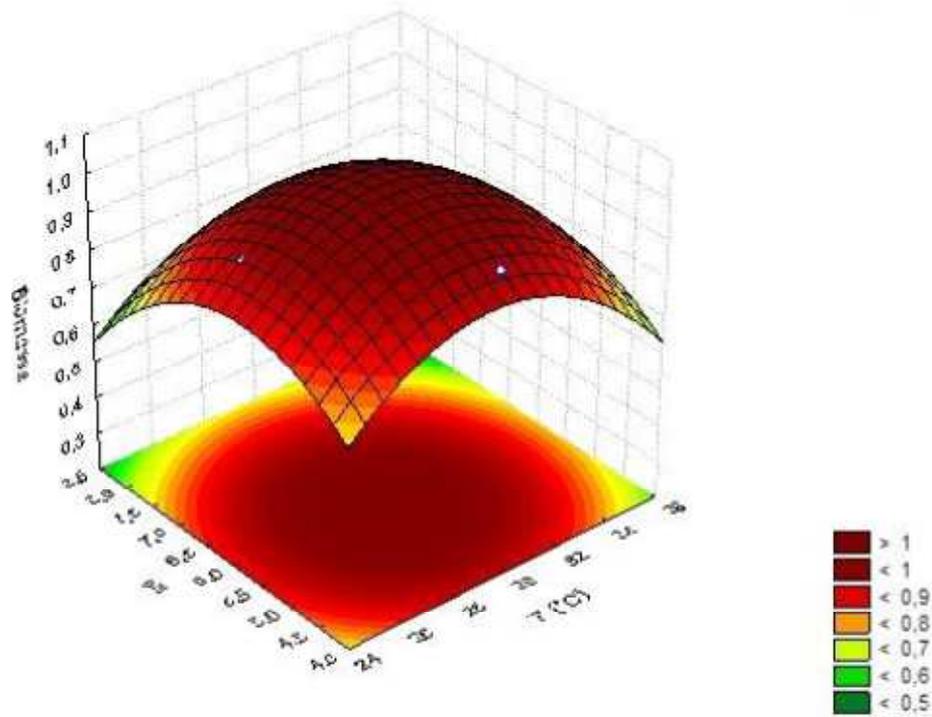
Para a produção de biomassa, os dois parâmetros analisados (pH e temperatura) tiveram um valor de p inferior a 0,05, indicando que apresentam influência na produção de biomassa. O modelo é bem ajustado a análise experimental, uma vez que explica cerca de 95,0% da variabilidade na biomassa (Quadro 2).

Quadro 2. Análise da variância para biomassa. ANOVA, R-sqr=0,96009;
Adj:0,93729

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F-calc	Valor-P
(1)T (°C)(L)	0,011616	0,011616	899,303	0,000081
T (°C)(Q)	0,070417	0,070417	5451,613	0,000005
(2)pH (L)	0,018400	0,018400	1424,520	0,000041
pH (Q)	0,078891	0,078891	6107,665	0,000005
Erro no ajuste	0,011049	0,002762	213,844	0,000515
Erro puro	0,000039	0,000013		
Total SS	0,277822			

A Figura 8 representa a superfície de resposta para verificar a influência do pH e temperatura (°C) do meio de cultura sobre a produção de biomassa.

Figura 8. Influência da temperatura e pH na biomassa produzida pelo fungo *A. terreus* S-18



Os dados experimentais, representados pelos pontos sob a malha da superfície de resposta, apresentam concordância com os valores previstos, justificando o uso do modelo para fins de determinação de condições ótimas de produção da biomassa pelo fungo *A. terreus* S-18.

Segundo este planejamento experimental e análise de variância, as melhores condições para produção de biomassa seriam: temperatura de 29,32 °C e pH 5,78 (Tabela 8).

Tabela 8. Valores ótimos dos parâmetros analisados para produção de biomassa de *A. terreus* S-18. ANOVA ($p < 0,05$)

	Valores mínimos analisados	Valores ótimos	Valores máximos observados
T (°C)	25,00000	29,32308	35,00000
pH	4,20000	5,78043	8,20000

A partir deste planejamento foi possível otimizar a produção de biomassa de cerca de 13 g.L^{-1} , nas condições iniciais de estudo (pH 8,0 e temperatura $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$), para $20,98 \text{ g.L}^{-1}$ nas condições ótimas encontradas por meio do planejamento experimental. Dessa forma é possível passar da etapa pré-fermentativa para a etapa fermentativa com uma quantidade maior de micélio (pellets), possibilitando que a etapa fermentativa obtenha um melhor rendimento na produção da ASNase no volume total de micélio produzido.

Simultaneamente a determinação das condições ótimas de produção de biomassa pelo fungo *A. terreus* S-18, foram realizados experimentos de otimização da produção da enzima ASNase pelo mesmo fungo. Os valores de ASNase obtidos no modelo do planejamento experimental proposto encontram-se na Tabela 9 e foram expressos pela média em concentrações de U.g^{-1} .

Tabela 9. Valores de L-asparaginase obtida no modelo do planejamento experimental para otimização da produção de L-asparaginase do *A. terreus* S-18

Nº do experimento	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	Inóculo (esporos.mL $^{-1}$)	L-asparaginase (U.g $^{-1}$)
1	6,2	25	1E+06	2,15
2	6,2	30	1E+08	2,95
3	6,2	35	5,05E+07	1,20
4	7,2	25	1E+08	2,34
5	7,2	30	5,05E+07	3,30
6	7,2	35	1E+06	1,52
7	8,2	25	5,05E+07	2,03
8	8,2	30	1E+06	2,47
9	8,2	35	1E+08	1,13
10	7,2	30	5,05E+07	3,21
11	7,2	30	5,05E+07	3,24
12	7,2	30	5,05E+07	3,12

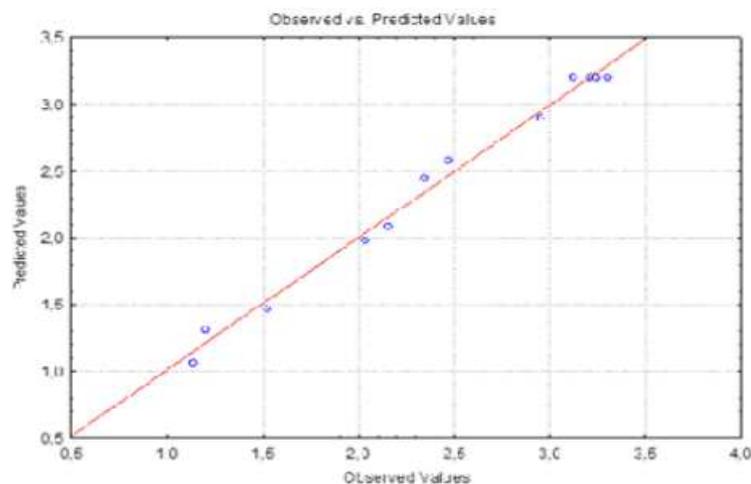
Assim como para a otimização da produção de biomassa, foi feita análise de variância dos resultados experimentais pela soma dos quadrados dos resíduos como estimativa do erro experimental obtido na otimização da produção de ASNase. Verifica-se que neste caso também houve formação mínima de resíduos quando comparados aos valores preditos pelo modelo e aos valores encontrados nos experimentos (Quadro 3).

Quadro 3. Valores dos resíduos obtidos na otimização da produção de L-asparaginase pelo *A. terreus* S-18. Comparação dos valores previstos pelo modelo do planejamento experimental e os valores obtidos no experimento

Nº do experimento	Valor observado no experimento (g)	Valor predito no planejamento (g)	Resíduos Obtidos
1	2,150000	2,085333	0,064667
2	2,950000	2,900667	0,049333
3	1,200000	1,314000	-0,114000
4	2,340000	2,454000	-0,114000
5	3,300000	3,201333	0,098667
6	1,520000	1,470667	0,049333
7	2,030000	1,980667	0,049333
8	2,470000	2,584000	-0,114000
9	1,130000	1,065333	0,064667
10	3,210000	3,201333	0,008667
11	3,240000	3,201333	0,038667
12	3,120000	3,201333	-0,081333

A demonstração da distribuição dos valores preditos e dos valores observados encontra-se graficamente expresso na Figura 9. É possível verificar que para otimização da produção de ASNase os valores experimentais demonstraram-se bem ajustados ao modelo experimental definido, uma vez que segue linearmente os valores previstos.

Figura 9. Valores preditos e observados na otimização da produção de L-asparaginase intracelular pelo fungo *A. terreus* S-18



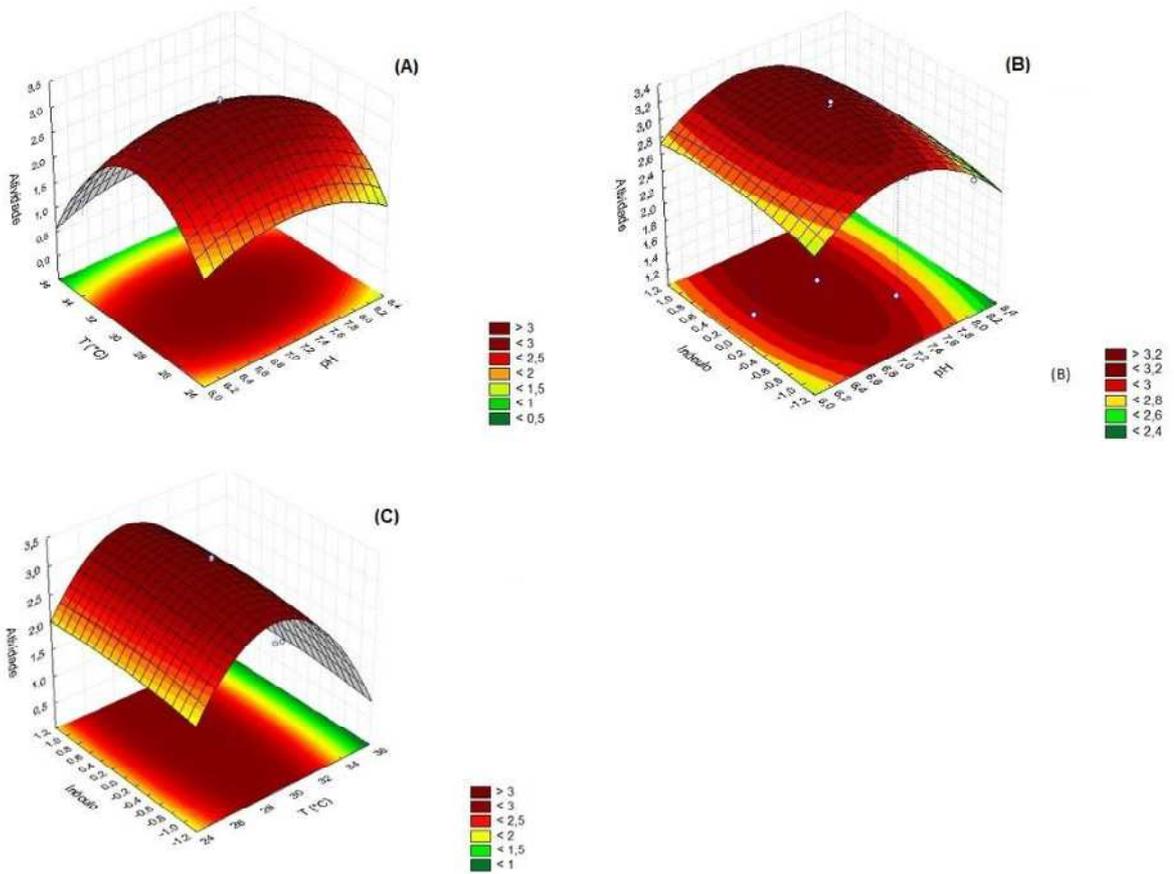
Para produção de ASNase, os três parâmetros testados (pH, temperatura e concentração de inóculo) tiveram um valor de p inferior a 0,05, indicando que apresentam influência na produção de biomassa com um nível de confiança de 95,0%. O modelo é bem ajustado, a análise experimental, uma vez que explica cerca de 95,0% da variabilidade na biomassa (Quadro 4).

Quadro 4. Análise da variância para produção de L-asparaginase. ANOVA. R-sqr=0,98967; Adj:0,97728

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F-calc	Valor-P
(1)pH (L)	0,133780	0,133780	23,7830	0,016480
pH (Q)	0,374423	0,374423	66,5640	0,003851
(2)T (°C)(L)	1,188150	1,188150	211,2267	0,000706
T (°C)(Q)	3,404723	3,404723	605,2840	0,000147
(3)Inóculo (L)	0,013067	0,013067	2,3230	0,224872
Inóculo (Q)	0,012960	0,012960	2,3040	0,226332
Erro no ajuste	0,055698	0,027849	4,9510	0,112124
Erro puro	0,016875	0,005625		
Total SS	7,026167			

As superfícies de resposta representam a interação entre os parâmetros de otimização, pH, temperatura (°C) e concentração do inóculo, utilizados na produção da enzima. Observa-se na Figura 10A a interação entre o pH e a temperatura (°C) sobre a resposta da atividade enzimática. Na Figura 10B vê-se a interação entre concentração de inóculo e pH e na Figura 10C a interação entre o inóculo e a temperatura (°C), indicando juntamente com a análise de variância pelo valor de p (quadro 4) que os três parâmetros possuem influência na produção da enzima.

Figura 10. Influência das variáveis na otimização da produção de L-asparaginase de *A. terreus* S-18. (A) Influência do pH e temperatura (°C); (B) Influência de pH e inóculo; (C) Influência de inóculo e temperatura (°C). ANOVA (R-sqr=0,98967; Adj:0,97728)



Segundo este planejamento experimental e análise de variância, as melhores condições para produção de ASNase seriam: temperatura de 29,05 °C, pH 7,06 e inóculo de 3,24E+07 (Tabela 10).

Tabela 10. Valores ótimos dos parâmetros analisados para produção de L-asparaginase

	Valores mínimos analisados	Valores ótimos	Valores máximos observados
pH	6,20000	7,05573	8,20000
T (°C)	25,00000	29,04670	35,00000
Inóculo	-1,00000	0,32407	1,00000

A partir deste planejamento foi possível otimizar a produção de ASNase de $1,58 \text{ U.g}^{-1}$, nas condições iniciais de estudo (pH 8,0 e temperatura $30 \text{ }^\circ\text{C}$), para cerca de $3,3 \text{ U.g}^{-1}$ nas condições ótimas encontradas por meio do planejamento experimental. Praticamente duplicando a atividade enzimática intracelular de ASNase do fungo *A. terreus* S-18.

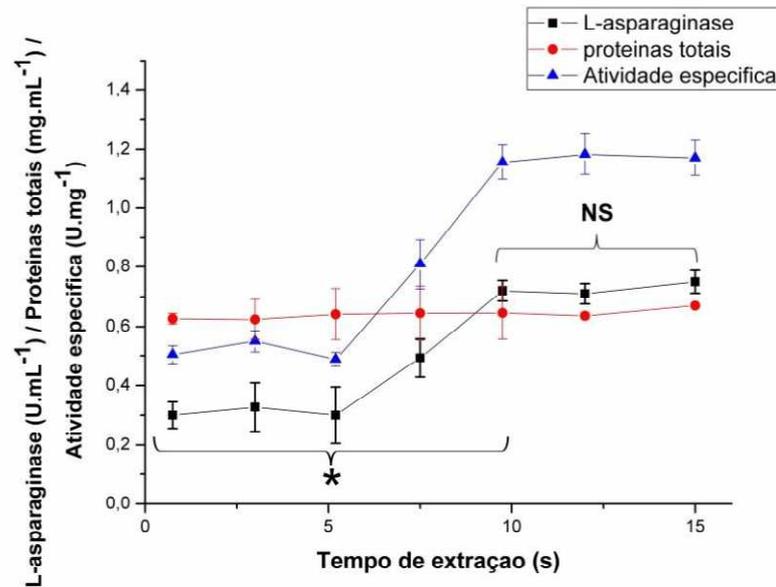
Pesquisas anteriores relatam diferenças dos parâmetros de temperaturas e pH para produção da enzima, garantindo uma produção eficaz. Loureiro (2010) relatou estudos utilizando cepa padrão de *A. terreus* (MMC 31) em que a temperatura ótima de produção foi de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ com pH de 9,5, já Varalakshmi e Raju (2013) verificaram que a temperatura ótima para cepa de *A. terreus* (MTCC 1782) teve como temperatura ideal de produção $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH de 8,0. Dessa maneira é possível verificar que mesmo sendo da mesma espécie diferentes cepas podem gerar enzimas que se comportam de forma diferenciada quanto a temperatura, pH ótimos sendo necessário estudos de investigação quanto as enzimas produzidas em cada caso.

Dessa forma, realizando o cultivo de *A. terreus* S-18 nas condições ótimas encontradas neste estudo, teremos produção de 21 g de biomassa e de $3,3 \text{ U.g}^{-1}$ de ASNase, resultando em uma atividade total de 69,3 U totais de ASNase, que nos estudos iniciais correspondia a 18,2 U totais de ASNase.

A partir da determinação das condições ótimas de produção de biomassa seguida pela produção da enzima foi necessário realizar ensaios de rompimento, uma vez que se trata de ASNase intracelular.

Os dados obtidos no rompimento celular para obtenção de ASNase, utilizando pérolas de vidro e vórtex (Figura 11) demonstraram que o método foi eficaz na liberação da enzima, verificado pelo aumento da atividade enzimática ao longo do tempo de rompimento.

Figura 11. Atividade de L-asparaginase, proteínas totais e atividade específica a partir do rompimento celular do fungo *A. terreus* S-18, utilizando pérolas de vidro e vórtex. *: ANOVA seguida pelo teste *T-student* com $p < 0,05$, NS: ANOVA seguida de teste t-student com $p > 0,05$, não há significância estatística entre os dados

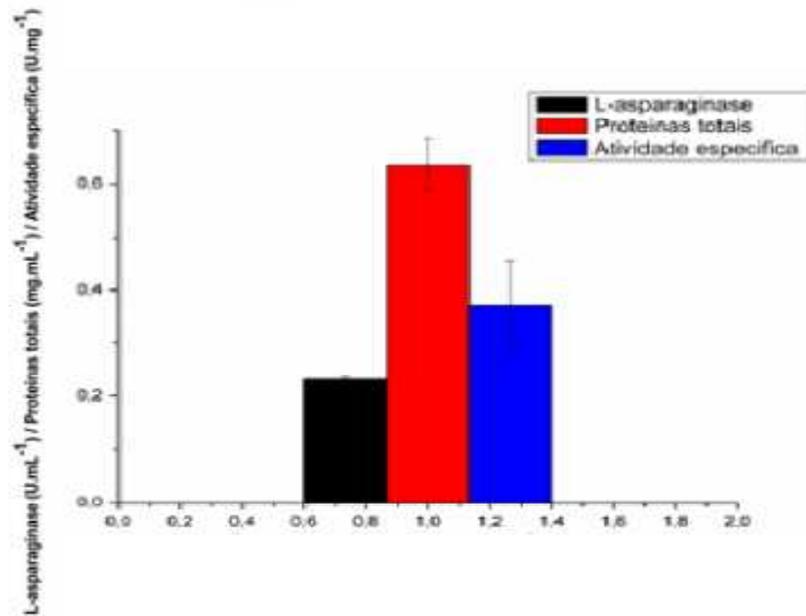


Foi possível ainda verificar, por meio da análise de variância seguida pelo teste *t-student*, que o tempo necessário de rompimento para este método foi de 10 minutos em vórtex, em intervalos de 45/45 s de ciclos de banho de gelo e vórtex, obtendo-se cerca de 0,8 U.mL⁻¹ de atividade enzimática de ASNase. Não houve diferença estatística entre os tempos de 10 e 15 minutos, significando que os ensaios de rompimento com pérolas de vidro e vórtex podem ser concluídos em 10 minutos de agitação, conforme a Figura 11.

A concentração de proteínas totais nessa metodologia de rompimento variou de 0,54 a 0,67 mg.mL⁻¹ ao longo do tempo total de rompimento, podendo ser dessa forma calculada a atividade específica da ASNase liberada durante o processo de rompimento. A atividade específica (concentração de U de atividade enzimática por mg de proteínas totais) está diretamente relacionada a pureza da amostra (BECKER, CALDWELL E ZACHGO, 1996).

Já os dados para rompimento por congelamento seguido de trituração foi possível verificar uma quantidade menor de atividade enzimática de ASNase, cerca de 0,2 U mL⁻¹ (Figura 12).

Figura 12. Atividade de L-asparaginase, proteínas totais e atividade específica a partir do rompimento celular do fungo *A. terreus* S-18, utilizando congelamento seguido de trituração



Na comparação dos dois métodos de rompimento celular (Tabela 11), o método de pérolas de vidro e vórtex mostrou-se mais eficiente em extrair a enzima ASNase do que o congelamento seguido de trituração. Apesar de apresentar uma quantidade de unidades menor, cerca de $0,23 \text{ U.mL}^{-1}$, o congelamento seguido de trituração demonstrou uma maior facilidade de adequação em experimentos de bancada, sendo simples, rápido, prático e com poucos custos.

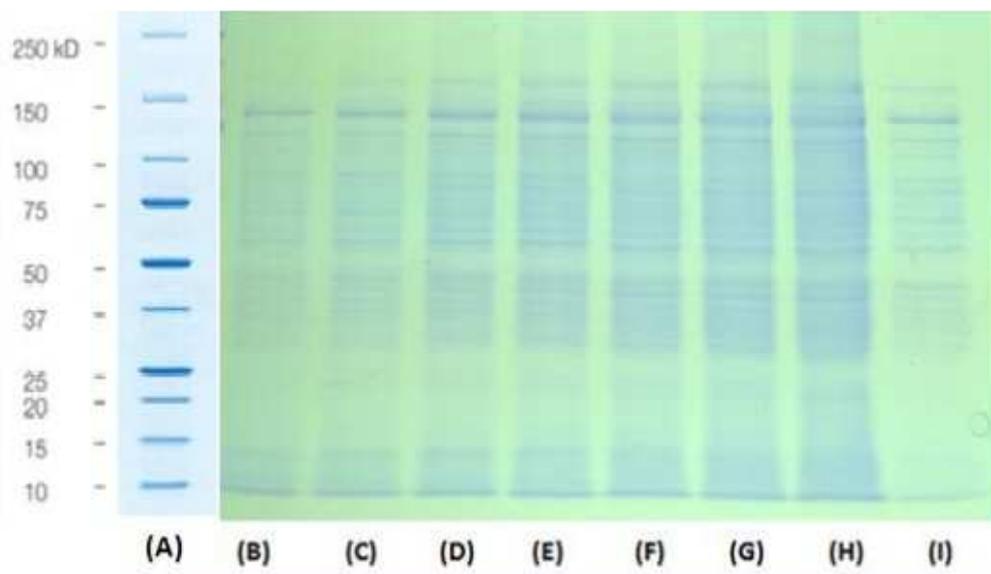
Tabela 11. Comparação dos resultados obtidos pelos métodos de rompimento celular

Método de rompimento	Atividade enzimática (U.mL^{-1})	Atividade enzimática total* (U)	Proteínas totais (mg.mL^{-1})	Atividade específica (U.mg^{-1})
Rompimento celular por pérolas de vidro (10 min)	0,75	4,5	0,67	1,12
Rompimento celular por congelamento ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) seguido de trituração	0,23	1,38	0,54	0,43

*A atividade enzimática total foi obtida multiplicando-se pelo volume total (6 mL) de tampão utilizado no rompimento.

O perfil das proteínas liberadas pelo rompimento de *A. terreus* S-18 encontra-se na Figura 13. Ao longo do tempo de rompimento (0,75 a 15 minutos) utilizando pérolas de vidro e vórtex representados pelas letras de B a H (Figura 13), é possível perceber um aumento da tonalidade das bandas formadas pelas proteínas extraídas, indicando aumento da concentração ao longo do tempo, demonstrando concordância com a dosagem de proteínas totais, onde se obteve aumento gradual da concentração de 0,54 a 0,67 mg.mL⁻¹ no período de rompimento.

Figura 13. Eletroforese de proteínas a partir do rompimento celular do fungo *A. terreus* S-18. (A) Massa molar de referência; (B) a (H) tempo de rompimento utilizando pérolas de vidro e vórtex (0,75 a 15 minutos), (I) rompimento por congelamento seguido por trituração



O perfil de proteínas obtidas pelo método de trituração está em concordância com o tempo inicial de rompimento por pérolas de vidro quando em comparação com o perfil de eletroforese e a dosagem de proteínas por BCA, ambas as dosagens apresentaram praticamente a mesma dosagem de proteínas totais, cerca de 0,54 mg.mL⁻¹.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste capítulo permitem concluir que:

- O Bioma Caatinga revelou-se como uma fonte rica de micro-organismos, tornando possível a obtenção de mais de 32 fungos filamentosos. Sendo que 15 fungos isolados foram capazes de produzir a enzima L-asparaginase extracelular e 9 fungos produziram a enzima intracelular, sendo a maior parte do gênero *Aspergillus* sp.
- Na análise quantitativa houve destaque para o fungo *Aspergillus terreus* S-18 que produziu $1,53 \text{ U.g}^{-1}$, demonstrando que houve maior produção intracelular da enzima L-asparaginase.
- *Aspergillus terreus* S-18, demonstrou melhor produção de biomassa (g) nas condições ótimas de pH 5,7 e temperatura $29 \text{ }^\circ\text{C}$, e para produção da enzima L-asparaginase (U.g^{-1}) as melhores condições foram de pH 7,0, temperatura $29 \text{ }^\circ\text{C}$ e inóculo $3,24\text{E}+07$. Isso permite concluir que cada cepa fúngica, mesmo sendo da mesma espécie, possui características tanto de crescimento como de produção diferentes, sendo necessário o estudo individual de cada micro-organismo para determinado produto;
- Durante os estudos de otimização foi possível praticamente dobrar a quantidade de ASNase produzida de $1,5 \text{ U.g}^{-1}$ para $3,3 \text{ U.g}^{-1}$. Em unidades totais de ASNase produzida pela biomassa final obtida corresponde a 18,2 U totais no estudo inicial para 69,8 U totais de ASNase no cultivo otimizado.
- Os estudos de rompimento realizados neste trabalho permitem concluir que a utilização de pérolas de vidro e vórtex foi capaz de extrair uma quantidade maior de enzima L-asparaginase (U.mL^{-1}), quando comparado ao método de congelamento ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) seguido por trituração. O perfil eletroforético das proteínas extraídas por ambos os métodos apresentaram concordância entre si.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.C. **Avaliação da produção de L-asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado**. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília, 2015.
- ALVES, C.; CHAVES, C.; SOUZA, M. Transient diabetes mellitus related to L-asparaginase therapy. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, p.635-638, 2007.
- AVRAMIS, V. I., TIWARI P. N. Asparaginase (native ASNase or pegylatedASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Int. J. Nanomedicine**, v.3, p.241–254, 2006.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance, **Anticancer Research**, v.32, p. 2423-2437, 2012.
- BECKER, J.M.; CALDWELL, G.A.; ZACHGO, E.A. β -Galactosidase purification, in Biotechnology a laboratory couser. **Academic Press**, p. 141, 1996.
- BORKOTAKY, B.; BEZBARUAH, R. L. Production and properties of asparaginase from a new *Erwinia* sp. **Folia Microbiologica**, v.47, p.473–476, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Documento de referência para a Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 24p. Brasília, 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/microbiologia/mod_7_2004.pdf> Acesso em 12 de janeiro de 2015.
- CALVO, A.; WILSON, R.; BOK, J.; KELLER, N. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.66, p.447-459, 2002.
- CAPIZZI, R. “Asparaginase”. **Cancer Medicine**. p. 796-805, 1993.
- CARVALHO, I. F. **Produção, purificação e caracterização da enzima L-asparaginase de *Aspergillus nidulans***: Programa de pós-graduação em Biotecnologia. 2003. 81 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Química de Araraquara , Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.
- CHARNEY, J., TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, v.171, p.501-505, 1947.
- DAVIDSON, L.; RUSSELL BREAR, D.; WINGARD, P.; HAWKINS, J.; KITTO, B.G. Purification and Properties of an L-Glutaminase-LAsparaginase from *Pseudomonas acidovorans*. **Journal of Bacteriology**, v.129, p. 1379-1386, 1977.
- DRAINAS, C.; PATEMAN, J.A. L-asparaginase activity in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochemical Society Transactions**, v.41, p.1365-1371, 1977.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul-EDUCS. 2010. 638 p.
- FEITOSA, V.A. **Produção de fragmento recombinante de anticorpo em *Pichia pastoris***. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2014.

GERVAIS, D.; ALLISON, N.; JENNINGS, A.; JONES, S.; MARKS, T. Validation of a 30-year-old process for the manufacture of L-asparaginase from *Erwinia chrysanthemi*. **Bioprocess and biosystems engineering**, v.36, p.453-460, 2013.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v.76, p.85-89, 1973.

KENARI, S.L.D.; ALEMZADEH, I.; MAGHSODI, V. Production of L-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, 315-321, 2011.

KIDD, J.G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal Experimental Medicine**, v.98, n., p.565-581, 1953.

KOTZIA, G.A.; LABROU, N.E. L-Asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. **J Biotechnol.**, v.127, p.657-669, 2006

KRISHNAPURA, P.R.; BELUR, P.D. Isolation and screening of endophytes from the rhizomes of some Zingiberaceae plants for L-asparaginase production. **Prep Biochem Biotechnol.** v.46, p.281-287, 2016.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

MACHADO, S.E.F. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados no Semiárido da Paraíba e na Antártida.** 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual da Paraíba, 2015.

MAHAJAN, R.V.; SARAN, S.; KAMESWARAN, K.; KUMAR, V.; SAXENA R.K. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity: optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresour Technol**, v.125, p.11–16, 2012.

MAHAJAN, R.V; SARAN S.; SAXENA, R.K.; SRIVASTAVA, A.K. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiol Lett.** v.341, p.122-126, 2013.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.137-148, 2011.

MILLER, H.; SLASER, J.; BALIS, M. Amino acids levels following L-asparaginase aminohydrolase (E.C.3.5.1.1) therapy. **Cancer research.** v.29, p. 183-187, 1969.

MULLER, H.; BOSS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97-113, 1998.

NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.61, p.208-221, 2007.

- NUMANOĞLU, Y.; SUNGUR, S. β -Galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose–gelatin carrier system. **Process Biochemistry**, v.39, p.705-711, 2004.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolism production in submerge mycelial process. **Biotechnol Adv**, v.22, p.189-259, 2004.
- POCHEDLY, C. Neurotoxicity due to CNS therapy of leucemia. **Medical pediatric oncology**, v.3, p.101-115, 1972.
- RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. **Advanced BioTech**, v.7, p.19-25, 2008.
- RIDDEL, R.W. Permanente stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycology**, v.42, p.265-270, 1950.
- SALZER, W. L.; ASSELIN, B.; SUPKO, J. G.; DEVIDAS, M.; KAISER, N. A.; PLOURDE, P.; WINICK, N. J.; REAMAN, G. H.; RAETZ, E.; CARROL, W. L.; HUNGER, S. P. *Erwinia* asparaginase achieves therapeutic activity after pegaspargase allergy: a report from the Children's Oncology Group, **Blood**, v.122, p.507-514, 2013.
- SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.
- SAVITRI, A.N.; ASTHANA, N.; AZMI, W. Microbial L-Asparaginase: A potent antitumor enzyme. **Ind. J. Biotech.**, v.2, p.184-194, 2003.
- SEN, K.; MANDAL, M. Second generation liposomal cancer therapeutics: Transition from laboratory to clinic. **International Journal of Pharmaceutics**, v.448, p.28-43, 2013.
- SINHA, R.; SINGH, H,R.; JHA, S.K. Microbial L-Asparaginase: present and future prospective. **Int J Innov Res Sci Eng Technol.**, v.2, p.7031-7051, 2013.
- THERON, L.W.; DIVOL, B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.98, p.8853–8868, 2014.
- THEANTANA, T.; HYDE, K.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from thai medicinal plants. **KMITL Sci. Tech. J.**, v.7, p.13-18, 2007.
- VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v.2, p.121-129, 2013.
- VIANA, M. V. **Fungos de solos da Antártica: prospecção de L-asparaginase e protease e caracterização taxonômica**: Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas. 2016. 86 f. Mestrado (Microbiologia aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, São Carlos.

CAPÍTULO II

Influência do inóculo de *Aspergillus terreus* (S-18) em Biorreator para produção de L-asparaginase

Influência do inóculo de *Aspergillus terreus* (S-18) em Biorreator para produção de L-asparaginase

RESUMO

A elucidação dos processos fermentativos e o desenvolvimento da biotecnologia possibilitou o aprimoramento de processos para produção de produtos de interesse comercial. O advento do uso de biorreatores e processos fermentativos assépticos permitiu obter um rendimento elevado dos produtos de alto valor agregado, por meio do conhecimento das características de cada micro-organismo e do controle maior de importantes parâmetros de crescimento. Produtos de interesse como antibióticos, vacinas, anticorpos e enzimas passaram a ser produzidos em escala industrial, a partir da fermentação utilizando micro-organismos, com destaque para a enzima L-asparaginase (ASNase), utilizada em terapias antineoplásicas de cânceres hematológicos. O objetivo deste capítulo foi verificar a influência do inóculo de *Aspergillus terreus* S-18 em biorreator adaptado para *air-lift* na produção de ASNase. Inicialmente foi determinado o coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio, por meio do método dinâmico, utilizando sensor de oxigênio previamente calibrado e água destilada na temperatura de 30 °C. Para determinar a influência da forma de inocular o meio de cultura para produção da L-ASNase, os experimentos foram realizados em duas etapas: pré-fermentativa (produção de biomassa: 29 °C e pH 5,7) e fermentativa (produção de L-ASNase: 29 °C e pH 7,0). Foram avaliados dois tipos de inóculo: no Cultivo C1 foram utilizados $3,24E+07$ esporos.mL⁻¹ os quais foram inoculados diretamente nos 5 L de meio de cultura (Fase Pré-fermentativa) e após o período de 96 h foi ajustada a concentração de glicose e prolina equivalente a etapa Fermentativa do processo; no Cultivo C2 foi utilizado pré-inóculo obtido pela inserção de $3,24E+07$ esporos.mL⁻¹ em 5 L de meio e incubados em agitador rotativo para produção dos *pellets* (96 h), os quais foram transferidos assepticamente para o biorreator para a etapa fermentativa e incubado por 96 h. Foi determinada a atividade enzimática de ASNase, tanto do meio de cultura como do micélio obtido ao longo dos dias da etapa fermentativa por meio do método do ácido L-aspartil-β-hidroxâmico (ABA). Foi realizada ainda a biomassa estimada, pelo método de massa seco, ao longo dos dias de cultivo além da determinação do pH do meio de cultura. O coeficiente de transferência volumétrica (k_La) obtido nesse estudo foi de 10,4 h⁻¹. Foi possível observar que no cultivo C1, apesar do fungo *A. terreus* ter apresentado uma produção de biomassa de 40,231 g nos 5 L de cultivo, não produziu L-ASNase intracelular/extracelular. No cultivo C2 foi observada atividade de cerca de 2,5 U.g⁻¹, sendo a biomassa final de 43,891 g para 5 L de meio resultando em 109,7 U totais de ASNase. No Cultivo C2 também não foi observada atividade no meio de cultura (enzima extracelular). Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que a etapa de pré-inóculo (produção inicial de *pellets*) foi crucial para a produção da enzima de interesse. São necessários novos estudos de otimização das condições de crescimento de *A. terreus* S-18 em escala de biorreator, avaliando concentração de indutor (prolina), valores diferentes de pH e K_La .

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*; L-asparaginase; Biorreator *air-lift*.

Influence of *Aspergillus terreus* (S-18) inoculum on Bioreactor for L-asparaginase production

ABSTRACT

The elucidation of fermentation processes and the development of biotechnology, it was possible to develop processes for the production of products of commercial interest. The advent of the use of bioreactors and aseptic fermentation processes allowed to obtain a high yield of the products of commercial interest, through the knowledge of the characteristics of each microorganism, through greater control of the important parameters of growth. Products of interest such as antibiotics, vaccines, antibodies and enzymes started to be produced on an industrial scale, from the fermentation using microorganisms, with emphasis on the enzyme L-asparaginase (ASNase), used in antineoplastic therapies for hematological cancers. The objective of this chapter was to verify the influence of the inoculum of *Aspergillus terreus* S-18 in an *air-lift* adapted bioreactor in the production of ASNase. Initially, the volumetric oxygen transfer coefficient was determined through the dynamic method using a previously calibrated oxygen sensor and distilled water at a temperature of 30 °C. To determine the influence on inoculation, an air-lift (adapted) bioreactor with a working volume of 5 L was used in modified Czapek Dox medium in two stages: pre-fermentative (29 °C and pH 5.7) and fermentative (29 °C and pH 7.0) for ASNase production. Two types of inoculum were used in Cultivation C1, using $3,24\text{E}+07$ spores.mL⁻¹ inoculated directly in the 5 L culture medium in the pre-fermentative phase, after the 96 h period the glucose concentration was adjusted and Proline equivalent to the fermentative stage of the process, pre-inoculum obtained by the inoculation of $3,24\text{E}+07$ spores.mL⁻¹ in 5 L of medium and incubated in a pre-fermentative rotary shaker in C2 culture (Cultivation C2) (96 h), after the incubation period the mycelium (pellets) were aseptically transferred to the bioreactor in the fermentation stage and incubated for 96 h. The enzymatic activity of ASNase was determined from both the culture fluid and the mycelium obtained over the days of fermentative step by the L-aspartyl- β -hydroxamic acid (ABA) method. The estimated biomass, by the dry weight, was also carried out along the days of cultivation besides the determination of the pH of the culture fluid. The volumetric transfer coefficient (kLa) obtained in this study was 10.4 h^{-1} . It was possible to observe that C1 culture, *A. terreus* fungus did not produce intracellular or even extracellular ASNase, the final biomass obtained in that culture was 40.231 g in the 5 L total culture. In C 2 culture activity of about 2.5 U.g^{-1} was observed, with 109.7 total U of ASNase, but no activity was observed in the culture fluid. The total biomass formed was 43.891 g for the total volume of medium used. Further studies are needed to optimize the growth conditions of *A. terreus* S-18 on a bioreactor scale.

Keywords: *Aspergillus terreus*; L-asparaginase; Bioreactor *air-lift*.

1. INTRODUÇÃO

Segundo Vitolo (2015), “a Biotecnologia é um conjunto de tecnologias que utilizam células, organelas celulares e moléculas biológicas, visando solucionar problemas, bem como desenvolver e/ou melhorar produtos de interesse econômico”. Portanto a Biotecnologia vem sendo utilizada há milênios pelo homem, que fazia uso de micro-organismos para realização de fermentações, mesmo sem saber de sua existência, como na produção de cerveja, pão, vinho e queijo.

Com o advento da Biotecnologia e a elucidação dos processos fermentativos, foi possível desenvolver processos para a produção de produtos de interesse comercial, como etanol, ácido acético, acetona e butanol (VITOLLO, 2015). A partir da década de 40, durante a Segunda Guerra Mundial, foram desenvolvidos processos fermentativos realizados em condições assépticas, pela grande demanda da produção de antibióticos (MCNEIL; HARVEY, 2008), sendo possível aplicar as técnicas também na produção de vacinas, anticorpos, enzimas, aminoácidos (CHISTI; MOO-YOUNG, 2002; VITOLLO, 2015), graças ao cultivo asséptico de culturas de cepas microbianas puras. Dessa maneira pode-se obter produtos de qualidade e maior aplicabilidade, principalmente na área da medicina, no meio ambiente e na agropecuária (VITOLLO, 2015).

Neste contexto, para a produção em escala industrial de produtos resultantes do metabolismo de micro-organismos, os biorreatores com tanques de cultura agitados (STR - *stirred tank bioreactor*) ou biorreatores *air-lift*, caracterizam-se no cenário atual como o método mais utilizado para cultivo de fungos filamentosos (VITOLLO, 2015), a fim de se obter um rendimento elevado dos produtos de interesse por meio do conhecimento das características de cada micro-organismo, do controle dos parâmetros importantes de crescimento, como temperatura, pH, agitação e aeração, além do volume maior de células e meio líquido utilizados quando comparados com o cultivo em shaker utilizando frascos.

Os biorreatores tipo STR “*stirred tank bioreactor*” (Figura 1a) são biorreatores de agitação mecânica que diferem dos biorreatores *air-lifts* (Figura 1b), que são agitados pneumáticamente. Nos biorreatores *air-lift* a mistura do meio é feito pela injeção de ar ou gás comprimido pela base do biorreator. Geralmente esses tipos de biorreatores são cilíndricos para que as bolhas de ar permaneçam o maior tempo

possível no meio. Os biorreatores tipo *air-lift* geram menos estresse ao micro-organismo cultivado (CHISTI; MOO-YOUNG, 2002; ZHONG, 2011).

Figura 1. Esquema de Biorreator STR (a) e Biorretor *air-lift* (b) (Fonte: MAINARDI, 2015)



Quando as células estão suspensas em um meio líquido, temos cultivo submerso, já quando os micro-organismos crescem em partículas sólidas, chamamos de cultivo sólido. Biorreatores quando utilizados em cultivo submerso geralmente têm três fases distintas: gasosa, líquida e micro-organismos suspensos no líquido, e necessitam de uma correta mistura para eficiente transferência de massa e calor (CHISTI; MOO-YOUNG, 2002; ERICKSON, 2011).

O cultivo sólido tem sido relatado como superior ao cultivo líquido, uma vez que simula o ambiente natural dos micro-organismos, em especial dos fungos filamentosos, porém os custos com a purificação posterior dos produtos passam a ser mais elevados, além de problemas para sua aplicação industrial, relacionados as diferenças de temperatura, substrato e oxigênio, que são parâmetros difíceis de controlar na quantidade reduzida de água livre (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). Dessa forma o cultivo submerso serve como alternativa ao cultivo sólido.

A utilização de tais cultivos em biorreatores, permite a produção de inúmeros produtos de interesse, em larga escala, com destaque na produção de biofármacos com aplicabilidade na medicina tanto humana como veterinária. Neste cenário, existe uma enzima de destaque, produzida por micro-organismos com aplicação na terapia antineoplásica, a enzima L-asparaginase (ASNase).

A enzima ASNase pertence a classe das hidrolases e é responsável pela degradação do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia (NARTA et al., 2007). Esta enzima pode ser utilizada no tratamento de certos tipos

de câncer hematológicos, com destaque para a leucemia linfóide aguda, juntamente com outros quimioterápicos, o que gerou a busca pela produção em larga escala dessa enzima.

Estudos demonstraram que gêneros e espécies de micro-organismos, como bactérias e leveduras, vêm sendo estudadas ao longo dos anos como fonte de L-asparaginase (ASNase) (TOSA et al., 1971; DEJONG, 1972; EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004; THENMOZHI et al., 2011). Os fungos filamentosos apresentam destaque também na produção de ASNase (SARQUIS, 2002; TIPPANI; SIVADEVUNI, 2012; PATRO et al., 2014), sendo que a espécie mais conhecida por produzir a enzima é o *Aspergillus terreus* (SARQUIS, 2002; VARALAKSHMI; RAJU, 2013; ALMEIDA, 2015).

A ASNase isolada de fungos filamentosos pode apresentar algumas vantagens, dentre elas, ser de origem eucariótica, o que pode minimizar reações de hipersensibilidade em pacientes em tratamento com a enzima em função de propriedades pós-traducionais que ocorrem nestes micro-organismos e não acontecem nos seres procarióticos, os quais são a fonte atual da produção de ASNase comercializada e utilizada nos tratamentos de LLA (LARSON, 1998; AVRAMIS E TIWARI, 2006).

Além disso, fungos apresentam a capacidade de crescer em ambientes sob as mais diversas condições, tais como tempo, temperatura, pH e variando os nutrientes do meio de cultura do processo (MUTHULAKSHMI et al., 2011). Tais condições influenciam diretamente a germinação dos esporos, crescimento e formação dos produtos sendo importantes para o processo resultando em um bom crescimento e elevados rendimentos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a influência do inóculo da cepa *Aspergillus terreus* (S-18) produtora de L-asparaginase em cultivo em biorreator de 7 L, adaptado para *air-lift*.

2.2 Objetivos específicos

- Calcular o coeficiente de transferência volumétrica (k_La) de estudo;
- Realizar cultivo em biorreator utilizando esporos como inóculo direto na etapa pré-fermentativa;
- Realizar cultivo em biorreator utilizando micélio em forma de pellets, obtido em cultivo de fase pré-fermentativa em agitador rotativo na etapa fermentativa;
- Determinar a atividade de L-asparaginase ($U.g^{-1}$) ao longo de 96 horas de cultivo na etapa fermentativa;
- Determinar a produção de biomassa ($g.mL^{-1}$) e pH do meio de cultura ao longo de 96 horas de cultivo;
- Verificar qual a melhor forma de inocular o fungo filamentososo no biorreator utilizado para produção de L-asparaginase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo e condições de cultivo

Utilizou-se cepa de *Aspergillus terreus* (S-18) definida como o melhor produtora de ASNase em estudo preliminar de seleção de fungos filamentosos isolados do bioma Caatinga, em um coqueiral localizado na região das Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil (Latitude: 6°45'17.57" S; Longitude: 38°7'23.31").

As condições de cultivo, inóculo, pH do meio de cultura e temperatura de incubação, utilizadas nesta etapa do estudo foram definidas de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de otimização em agitador rotativo, utilizando o melhor produtor que foi definido pela quantificação da enzima de acordo com o item 3.2.3 do capítulo I.

O meio de cultura utilizado foi o Czapek Dox modificado, preparado tanto para a etapa pré-fermentativa como para etapa fermentativa (Loureiro, 2010), de acordo com o item 3.2.2 do capítulo I, sendo o pH da primeira etapa de 5,2 e da segunda etapa 7,0, utilizando a mesma temperatura para ambas as etapas 29 °C.

3.2 Biorreator utilizado e cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La})

Utilizou-se o biorreator com capacidade para 7 L (New Bruswink Scientific), que passou por adaptações, onde foram retiradas as pás de agitação e inserido no corpo do biorreator um cilindro de aço inox que permitiu um movimento de circulação das bolhas de ar ao longo do volume completo, utilizado também em trabalho realizado por Mainardi (2015). O volume de trabalho utilizado foi de 5 L de meio de cultivo. Foi também acoplado um banho termorregulado com circulação de água para manter a temperatura controlada durante o processo fermentativo (96 horas de etapa pré-fermentativa e 96 horas de etapa fermentativa) fazendo com que o biorreator apresentasse comportamento de um biorreator air-lift, sendo o tipo ideal para cultivo de fungos filamentosos (Figura 2).

Figura 2. Biorreator adaptado para *air-lift*



Para calcular o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi utilizado o método dinâmico de acordo com Wise (1951) e Riet (1979), que utiliza a medição, por meio de eletrodo, da concentração de oxigênio dissolvido na água. O biorreator foi preenchido com 5 L de água destilada e foi utilizada a temperatura de 30 °C sob pressão atmosférica.

Para iniciar a medição dos valores de concentração de oxigênio, inicialmente foi ajustada a vazão de aeração para 0,5 vvm, que foi o único parâmetro ajustado, uma vez que não foi utilizada frequência de agitação. Esta vazão foi observada durante o estudo como sendo a maior vazão possível que evitasse que os esporos e/ou micélio utilizados nos cultivos permanecessem em movimentação adequada evitando que chegassem a tampa do biorreator. Após ajuste deste parâmetro foi inserido nitrogênio no líquido com objetivo de eliminar o oxigênio já dissolvido na água, atingindo 0% com medição com eletrodo previamente calibrado. Em seguida foi feita aeração até que a concentração de oxigênio dissolvido atingisse 100% de saturação.

Dessa forma foi possível acompanhar ao longo do tempo, em intervalos de 5 segundos (s), as concentrações de oxigênio dissolvido na água. De acordo com Pirt (1975) o balanço de massa na fase líquida é dado pela equação:

$$\frac{dC}{dt} = KLa (C_s - C) \quad \text{Equação 1}$$

onde:

C_s = a quantidade de oxigênio dissolvido na saturação (100%); C = quantidade de oxigênio dissolvido em função do tempo (s).

Integrando a equação e plotando a curva $\ln(C_s - C)$ em função do tempo (s) obtém-se uma reta cujo coeficiente angular equivale ao valor de $k_L a$ (s^{-1}). Como o intervalo de tempo utilizado foi dado em s^{-1} foi necessário realizar conversão para h^{-1} .

3.3 Cultivo em biorreator utilizando esporos

Neste cultivo 1 (C1) foi utilizado como inóculo esporos obtidos do fungo filamentoso crescido em ágar batata dextrose (BDA), de até 5 dias, na concentração de $3,24E+07$ esporos/mL. Estes foram diretamente inoculados no biorreator, cotendo um volume de trabalho final de 5 L de meio de cultivo, na etapa pré-fermentativa (pH 5,7 e temperatura $29\text{ }^{\circ}\text{C}$), a fim de verificar o comportamento do fungo no que se refere à produção de biomassa e de L-asparaginase. Após 96 h de cultivo na etapa pré-fermentativa a concentração de prolina foi ajustada para 10 g.L^{-1} e glicose para 2 g.L^{-1} dando início ao que foi denominado de etapa fermentativa. Além disso, o pH foi ajustado para 7,0 e temperatura mantida em $29\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Não foram recolhidas amostras na etapa pré-fermentativa, uma vez que o objetivo de tal etapa foi apenas a produção de biomassa que seguiu para a etapa fermentativa, que teve como objetivo a produção da enzima. Durante a etapa fermentativa foi acompanhada a produção da enzima ao longo de 4 dias (96 h), utilizando tanto o meio de cultura como o micélio produzido.

3.4 Cultivo em biorreator utilizando micélio obtido em agitador rotativo

No cultivo 2 (C2) foi utilizada concentração de esporos igual a definida no item anterior, sendo que na etapa pré-fermentativa foram inoculados $3,24E+07$ esporos/mL em 5 L de meio de cultivo pH 5,7 e incubados em agitador rotativo a 150 rpm a 29 °C durante 96 h, a fim de obter a mesma biomassa do cultivo C1, na forma de micélio em *pellets* (Figura 3).

Figura 3. Micélio em forma de *pellets*, característica de fermentações submersas com rotação



A biomassa final foi filtrada e transferida assepticamente em câmara de fluxo laminar, para o biorreator contendo meio de cultivo já ajustado para a etapa fermentativa com 96 horas de cultivo: volume final de trabalho para 5 L com temperatura de 29 °C e pH 7,0. Nesse cultivo também não foram recolhidas amostras na etapa pré-fermentativa para determinação da atividade enzimática de ASNase.

3.5 Determinação da atividade enzimática de L-asparaginase

Foram utilizados tanto o meio de cultura (mL) como o micélio (g), obtidos após as etapas Fermentativas, para avaliação da atividade da enzima extracelular e intracelular, respectivamente.

A determinação da atividade enzimática de ASNase foi avaliada utilizando a método do ácido L-aspartil- β -hidroxâmico (AHA), pela quantificação do β -hidroxamato aspártico produzido na reação da enzima por meio da presença de

hidroxilamina (DRAINAS, 1977), tendo resultado expresso por U/mL para o meio da cultura e U/mg para o micélio. Para a avaliação da atividade a mistura de reação foi constituída de 0,6 mL de tampão Tris-HCl (50 mM), pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina (100 mM); 0,2 mL hidroxilamina (1M) e 1 g de micélio de cada cultura ou 1 mL do meio de cada cultura. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 30 minutos sob agitação constante (150 rpm). Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico a 10 %. Para o preparo do branco foi adicionado 0,5 mL de cloreto férrico a 10 % e, posteriormente, 1 g de micélio ou 1 mL de meio da cultura.

O resultado da reação entre β -hidroxamato aspártico e cloreto férrico produz um composto de coloração avermelhada, o β -hidroxamato aspártico férrico, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman) a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μ mol de β -hidroxamato aspártico por minuto. As reações, curva de calibração, determinação da absorbância máxima e os cálculos para determinação quantitativa de ASNase estão descritas no anexo 1. Os resultados foram expressos em $U \cdot mL^{-1}$ para atividade extracelular de ASNase ou GLUase e em $U \cdot g^{-1}$ para atividade intracelular das enzimas.

3.6 Estimativa de biomassa e pH do meio de cultivo

No cultivo C1 foi possível verificar apenas a biomassa final do cultivo após as duas etapas (pre-fermentativa e fermentativa). A biomassa final do cultivo foi medida pelo método do massa seco em papel de filtro, por meio da secagem em estufa a 60 °C, até atingir massa constante.

No cultivo C2 foi possível verificar a biomassa ao longo da etapa fermentativa que foi realizada em biorreator, por meio da amostragem, pelo método do massa seco em papel de filtro.

Para os dois cultivos foi realizada a medição do pH do meio ao longo das 96 h de cultivo da fase fermentativa. Os dados de biomassa do cultivo C2 e pH do meio de ambos os cultivos se encontram em análise estatística e dessa forma ainda não foram incluídos nos resultados deste capítulo.

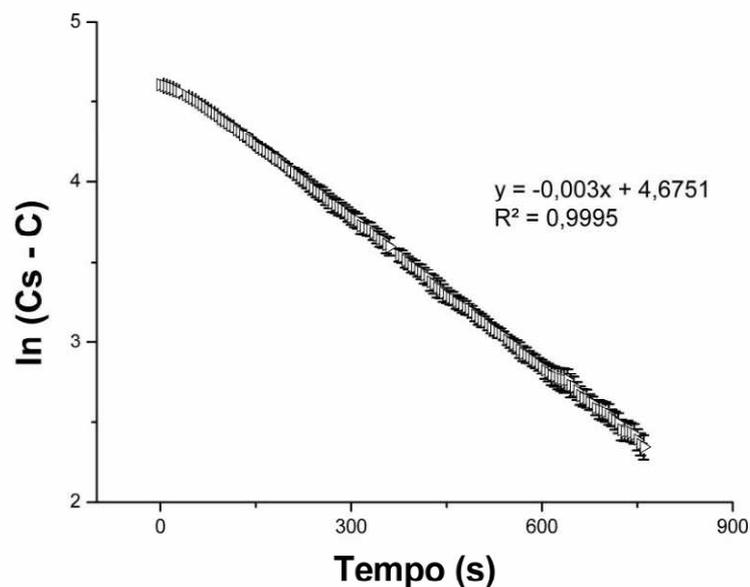
3.7 Análise estatística

Todos os dados, obtidos em triplicata, foram analisados por meio dos testes estatísticos do ANOVA e a equação da reta foi gerada pelo software Microsoft® Excel 2010. Para construção dos gráficos foi utilizado o software Origin Pro 8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados obtidos pelos experimentos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio encontram-se plotados no gráfico representado pela Figura 4, bem como a equação da reta.

Figura 4. Gráfico para cálculo de $k_{L,a}$. Cultivo em biorreator adaptado para air-lift utilizando vazão de 0,5 vvm de oxigênio e temperatura de 30 °C



O coeficiente angular da reta corresponde ao valor de $k_{L,a}$, em s^{-1} , obtido no experimento com vazão de 0,5 vvm de oxigênio, sendo que temos um $k_{L,a}$ de $0,003 s^{-1}$. Para obter o valor de $k_{L,a}$ em h^{-1} foi preciso conversão da unidade obtida no experimento em s^{-1} para h^{-1} , obtendo o valor de $k_{L,a}$ de $10,6 h^{-1}$. Esse valor é influenciado por fatores como: viscosidade do meio, tamanho das bolhas de ar, tempo de permanência das bolhas de ar, agitação (no caso de biorreatores tipo STR) e aeração (GARCIA-OCHOA; GOMEZ et al., 2009).

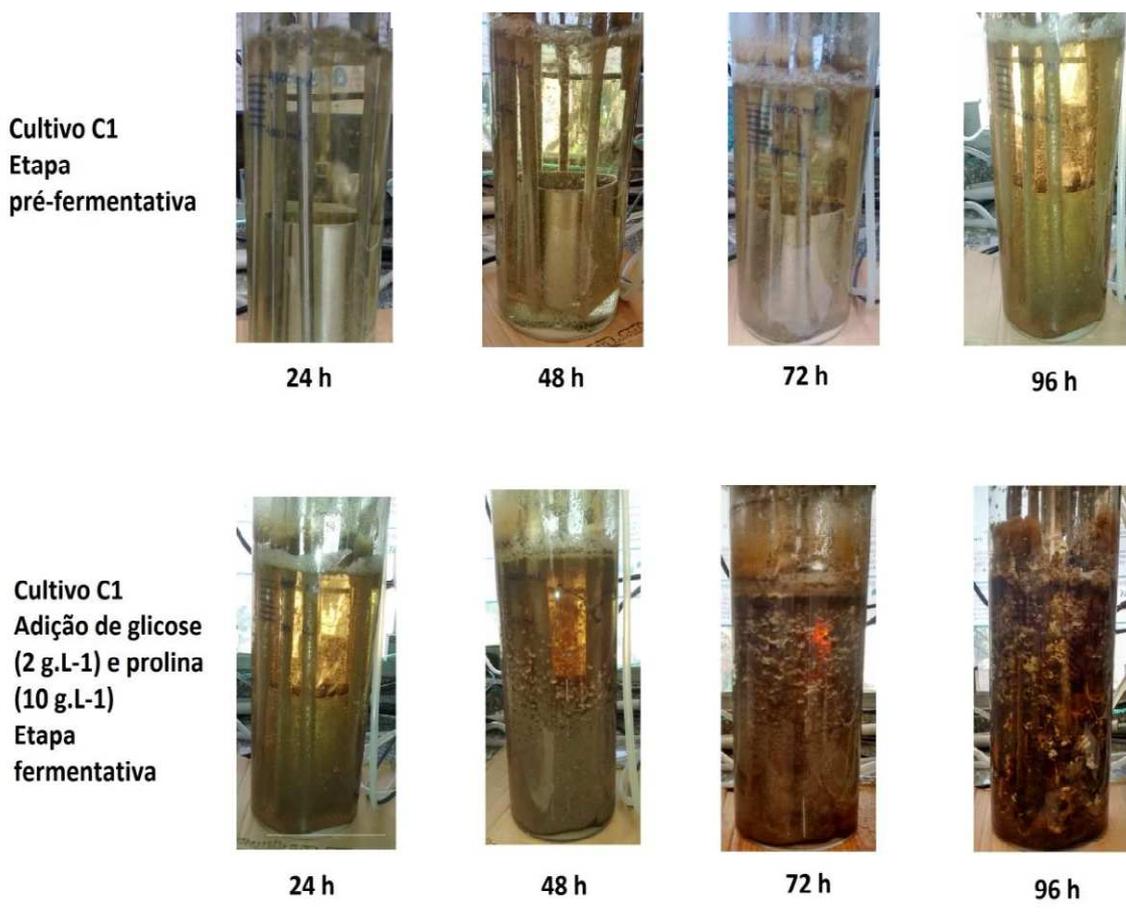
Em estudo realizado por Mainardi (2015) utilizando o fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi obtido um $k_{L,a}$ de $17,2 h^{-1}$, utilizando biorreator STR e 1,0 vvm de oxigênio. Sousa (2015) realizou estudos em biorreator STR com o fungo *Aspergillus foetidus* utilizando $k_{L,a}$ de $11,16 h^{-1}$.

A produtividade do sistema que precisam de altas taxas de aeração está diretamente relacionado a capacidade de aeração do biorreator. Essa capacidade é

influenciada diretamente com a forma do biorreator, o fluxo de ar, viscosidade do meio e uso de antiespumantes (ERAZO; CARDENAS, 2001).

A utilização direta de esporos para o cultivo C1 encontra-se ilustrado pela Figura 5, evidenciando o aspecto do cultivo ao longo dos dias nas duas etapas realizadas, tanto pré-fermentativa como na fermentativa para produção de ASNase. Vale ressaltar, que foi realizada alimentação do biorreator, de glicose (2 g.L^{-1}) e de prolina (10 g.L^{-1}), após a etapa pré-fermentativa para que a concentração desses reagentes estivessem em acordo com a etapa fermentativa, além do ajuste de pH para 7,0.

Figura 5. Cultivo C1 em biorreator adaptado para air-lift utilizando vazão de 0,5 vvm de oxigênio. Meio Czapek Dox modificado pH 5,7 (etapa pré-fermentativa); pH 7,0 (etapa fermentativa). Temperatura de 29 °C



Verifica-se que não foi possível obter micélio em forma de pellets, como foi descrito nos experimentos em agitador rotativo em cultivos em frascos tipo blaffer

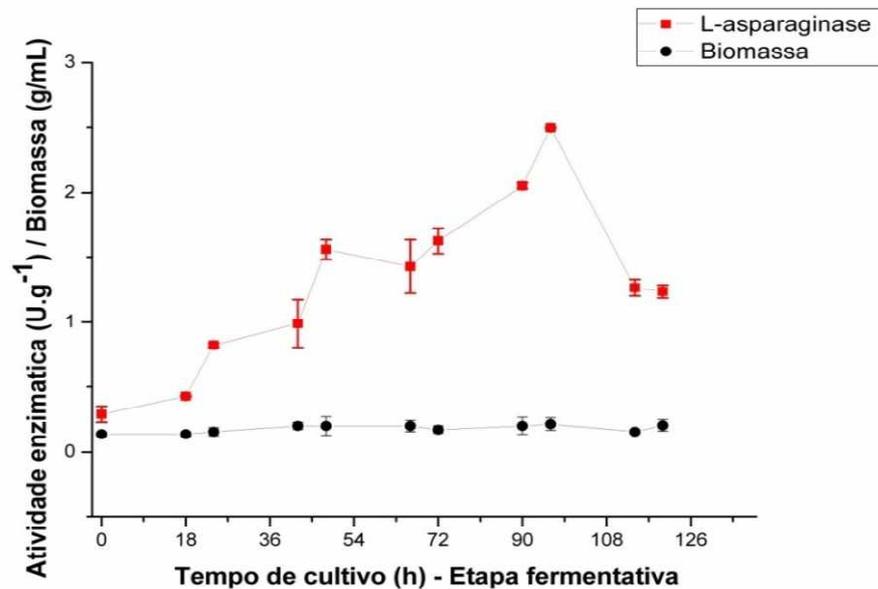
Nalgene®, observado no capítulo I deste trabalho. O micélio obtido no cultivo ficou aderido nas paredes do biorreator e não permitiu o fluxo contínuo da massa micelial ao longo do cultivo.

Ao término da etapa pré-fermentativa (após 4 dias) iniciou-se a etapa fermentativa na qual foram recolhidas, assepticamente, amostras tanto do micélio quanto do meio de cultura para realização da atividade enzimática de ASNase. Utilizando a inserção direta de esporos no biorreator não foram encontrados indícios de atividade enzimática nos cultivos realizados em triplicata. Diferentemente do Cultivo C2 que utilizou *pellets* na etapa Fermentativa, o micélio aderido à parede e demais partes constituintes do biorreator cresceu de forma maciça e espessa. Assim, uma das possíveis explicações pela ausência de atividade enzimática seria ao fato de que a transferência de oxigênio, temperatura e/ou nutrientes para o interior das células microbianas tornou-se dificultada devido à espessura/diâmetro da massa micelial. Baskar e Sahadevan (2012) relataram em seus estudos presença de atividade de ASNase extracelular produzida por *A. terreus*, utilizando inóculo com esporos diretamente no biorreator, de cerca de $44,38 \text{ U.mL}^{-1}$, reforçando o fato de que mesmo sendo um fungo da mesma espécie, diferentes cepas podem demonstrar comportamentos diferentes de produção da ASNase. A biomassa final obtida em C1 foi de 40,231 g nos 5 L de cultivo total.

No que se refere ao cultivo C2, foi possível verificar que ao longo da etapa fermentativa o cultivo em biorreator apresentou algumas características semelhantes ao cultivo em agitador rotativo (shaker), onde o micélio apresentou atividade enzimática para ASNase, atividade essa que não foi observada no meio de cultura.

Os resultados de atividade enzimática de ASNase para o cultivo C2 podem ser verificados na Figura 6.

Figura 6. Acompanhamento do perfil de produção de L-asparaginase e biomassa de *A. terreus* S-18 no cultivo C2 em biorreator – Etapa fermentativa



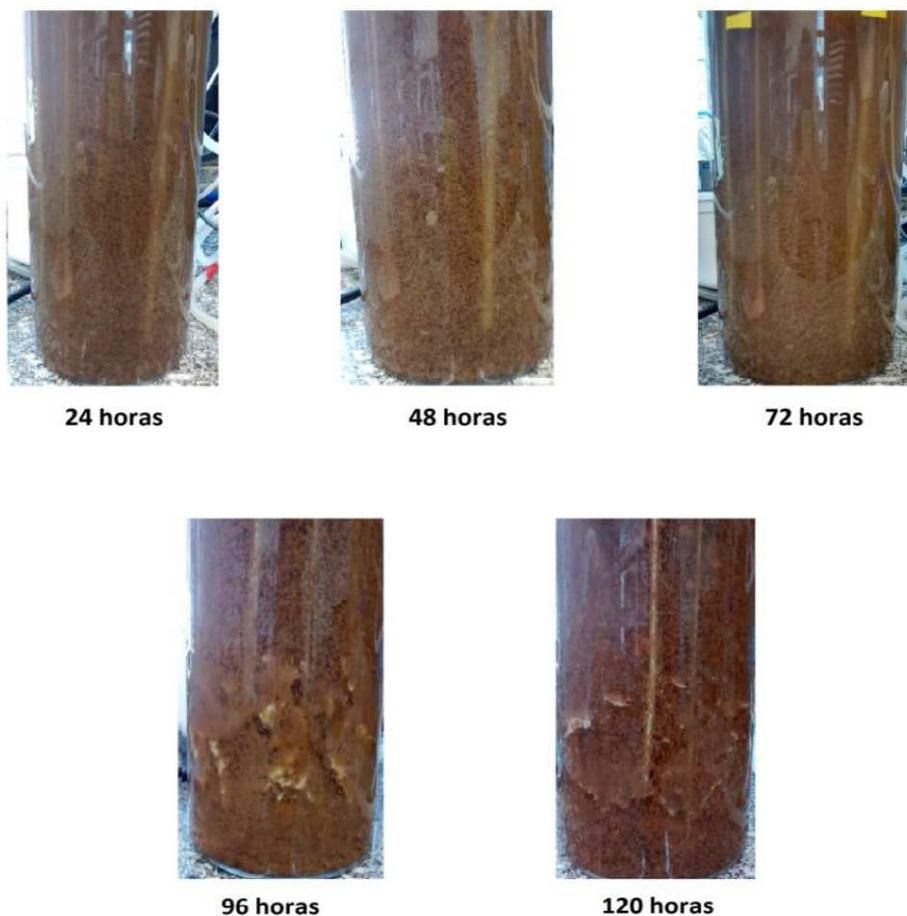
É possível observar que a atividade de ASNase aumentou ao longo dos dias de cultivo na etapa fermentativa no biorreator, tendo em 96 horas seu pico máximo de atividade, com cerca de 2,5 U.g⁻¹. Observou-se ainda uma redução da atividade enzimática de ASNase em relação ao cultivo nas condições ótimas realizado em shaker com *A. terreus* S-18, que foi de cerca de 3,3 U.g⁻¹, quando comparado aos resultados obtidos no Capítulo I deste trabalho. No entanto, não foi observada atividade no meio de cultura obtido na fermentação. A diminuição da atividade enzimática neste caso se deve ao fato de que um cultivo pode modificar suas características de resposta, na produção dos produtos de interesse, quando realizado em escalas diferentes (VITOLLO, 2015), como foi observado neste estudo. Sendo necessário então a realização de estudos de otimização em biorreator para *A. terreus* S-18, visando a maior produção da enzima.

Verificou-se que a biomassa permaneceu constante ao longo dos dias de cultivo, sendo que ao final do cultivo foi possível verificar produção de 43,891 g em 5 litros de meio de cultura, demonstrando compatibilidade com a produção de biomassa do cultivo C1. Dessa forma a produção total de ASNase no cultivo C2, em 96 horas de processo fermentativo, levando em consideração o volume total do biorreator e de biomassa obtida, foi de 109,7 U totais de ASNase, quando que em

experimento realizado, nas condições ótimas, em agitador rotativo esta atividade total foi correspondente a 69,3 U totais de ASNase.

A Figura 7 representa o cultivo C2 a cada 24 horas de corridas do processo fermentativo.

Figura 7. Cultivo C2 em biorreator adaptado para air-lift utilizando vazão de 0,5 vvm de oxigênio. Meio Czapek Dox modificado pH 7,0 (etapa fermentativa). Temperatura de 29 °C



Percebeu-se que no cultivo C2 ao longo das primeiras 72 horas de etapa fermentativa, o micélio inoculado não apresentou mudança na integridade física dos pellets, porém após 96 horas de cultivo, foi observado que os pellets diminuíram de tamanho e passaram a se agregar. Nota-se que o micélio passou a crescer nas paredes do biorreator, o que indica que os esporos do fungo ensaiado foram liberados e passaram a crescer no cultivo.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste capítulo permitem concluir que:

- O valor de k_{La} obtido neste estudo foi compatível com estudos anteriores utilizando fungos filamentosos, e ainda se mostrou satisfatório para a produção da enzima ASNase (Cultivo C2);
- O cultivo C1 em biorreator tipo air-lift, utilizando $3,24E+07$ esporos.mL⁻¹ como inóculo, não foi eficiente em produzir a enzima L-asparaginase intracelular nem mesmo a enzima extracelular;
- O cultivo C1 não demonstrou eficiência em produzir micélio em forma de pellets, forma a qual foi atribuída atividade da enzima L-asparaginase, tanto em cultivo em agitador rotativo como no cultivo C2 em biorreator tipo air-lift;
- O cultivo C2 em biorreator tipo air lift, utilizando pré-inóculo em forma de pellets, obtido em agitador rotativo, demonstrou-se eficiente na produção da enzima L-asparaginase intracelular, mas não demonstrou produção da enzima extracelular;
- O rendimento total da produção de L-asparaginase em biorreator no cultivo C2 foi de cerca de 109,7 U totais, em comparação com o cultivo otimizado em agitador rotativo o total de unidade foi de 69,3 U;
- Recomenda-se novos estudos de otimização da produção da enzima ASNase em biorreator, visando uma maior produção da enzima.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.P.C. **Avaliação da produção de L- asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado.** 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de Brasília, 2015.
- AVRAMIS, V.I.; TIWARI P.N. Asparaginase (native ASNase or pegylatedASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Int. J. Nanomedicine**, v.3, p.241–254, 2006.
- BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**. v.7, p.212-220, 2012.
- CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Bioreactors. **Encyclopedia of physical science and technology**. v.2 ,p.247-271, 2002.
- DEJONG P.J. L-asparaginase production by *Streptomyces griseus*. **Applied & Environmental Microbiology**, v.23, p.1163-1164, 1972.
- EL-BESSOUMY, A.A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **J Biochem Mol Biol**, v.37, p.387-393, 2004.
- ERAZO, R.E.; CÁRDENAS, J.L.R. Determinación experimental del coeficiente de transferencia de oxígeno (k_{la}) en un biorreactor batch. **Revista peruana de química e ingeniería química**, v.4, 2001.
- ERICKSON, L.E. Bioreactors for Commodity Products. **Comprehensive Biotechnology**. v.3, p.653-658; 2011.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v.27, p.153-176, 2009.
- LARSON, R.A.; FRETZIN, M.H.; DODGE, R. K.; SCHIFFER, C. A. Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v.12, p.660–665, 1998.
- MAINARDI, P.H. **Produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada.** 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista, 2015.
- MCNEIL, B.; HARVEY, L. Practical Fermentation Technology. **John Wiley & Sons**. 2008.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation. *Springer Science & Business Media*. 2006
- MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D.G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v.4, p.137-148, 2011.
- NARTA, U.K.; KANWAR, S.S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.61, p.208-221, 2007.

PATRO, K.; BASAK, U.; MOHAPATRA, A.; GUPTA, N. Development of new medium composition for enhanced production of L-Asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of environmental biology**, v.35, p.295-300, 2014.

PIRT S.J. **Principles of Microbe and Cell Cultivation**. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne: Blackwell Scientific Publications, 1975.

RIET, K.V. Review of Measuring Methods and Results in nonviscous gas-liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. **Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development**. v.18, p.357-364; 1979.

SARQUIS, M.I.M.; OLIVEIRA, E.M.M; SANTOS, A.S.; COSTA, G.L. Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p. 489-492, 2004.

SOUZA, P.M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isoaldos do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 125p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2015.

THENMOZHI, C.; SANKAR, R.; KARUPPIAH, V; SAMPATHKUMAR, P. L-asparaginase production by mangrove derived *Bacillus cereus* MAB5: optimization by response surface methodology. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.4, p.486-491, 2011.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p.3692-3696, 2012.

TOSA, T.; SANO, R.; YAMAMOTO, K.; NAKAMURA, M.; ANDO, K.; CHIBATA, I. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. **Applied & Environmental Microbiology**, v.22, p.387-392, 1971.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K.J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v.2, p.121-129, 2013.

VITOLO, M. **Biotecnologia Farmacêutica – Aspectos sobre a aplicação industrial**. São Paulo: Blucher, 2015.

Wise, W.S. The measurement of the aeration of culture media. **Journal of General Microbiology**, 5:167-177, 1951.

ZHONG, J.J. Bioreactor Engineering. **Comprehensive Biotechnology**, v.3, p.653-658, 2011.

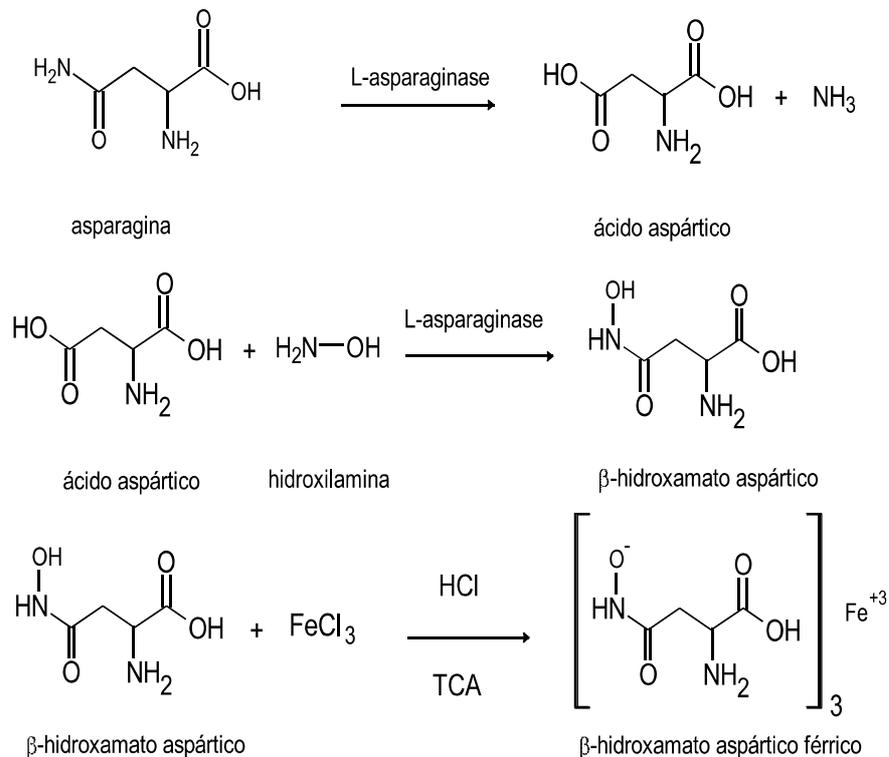
ANEXOS

ANEXO 1

PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE ASPARAGINASE PELO MÉTODO DO ÁCIDO L-ASPARTIL-β-HIDROXÂMICO (AHA).

A atividade de Asparaginase pode ser determinada pela quantificação do β-hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminólise efetuada também pela enzima ASNase na presença de hidroxilamina.

Figura 1. Mecanismo de reação da asparagina com hidroxilamina mediado pela ASNase para a formação do complexo β-hidroxamato aspártico férrico



Preparação das soluções.

Solução Tris-HCl 50 mM	Pesar 3.035 g de Tris-HCl em 500 mL de água destilada. Ajustar o pH para 8,6 com HCl 1M.
Solução 0,1 M de asparagina	Pesar 0,66 g em 50 mL de água destilada.
Solução de hidroxilamina (1M)	<p><i>Solução A.</i> Solução estoque de cloridrato de hidroxilamina (2 M). Esta solução deve ser mantida a 5° C.</p> <p><i>Solução B.</i> Solução estoque de hidróxido de sódio (2 M).</p> <p><i>Solução 1 M de hidroxilamina.</i> Misturar a solução A com solução B na proporção de 12 mL de A com 10 mL de B a mistura final tem um pH perto de 7,0, adicionar 2mL de H₂O destilada para levar a concentração final de hidroxilamina a 1M. Esta solução de hidroxilamina neutralizada é instável, portanto, deve-se prepará-la (neutralizada) no momento do uso.</p>
Solução de Cloreto Férrico / TCA / HCl	<p><i>Solução C.</i> Pesar 10g de Cloreto férrico e dissolver em 100 mL de água destilada.</p> <p><i>Solução D.</i> Preparar 100 mL de uma solução de HCl na concentração de 0,66 M (2,4 mL em 100 mL). Nesta solução adicionar 5,0 g de TCA.</p> <p>Mistura a solução C e D e guardar em frasco escuro na geladeira a 5° C.</p>

Construção da curva padrão.

Solução padrão de β -hidroxâmato aspártico 5 mM. Pesar 7,4 mg do padrão e completar para 10 mL de água mili-Q usando balão volumétrico a concentração desta solução e 5mM (Tabela 1). Construir a curva padrão como é descrito a seguir na Tabela 2.

Tabela 1. Cálculo de concentração de β -hidroxâmato aspártico utilizado para a construção das curvas padrão

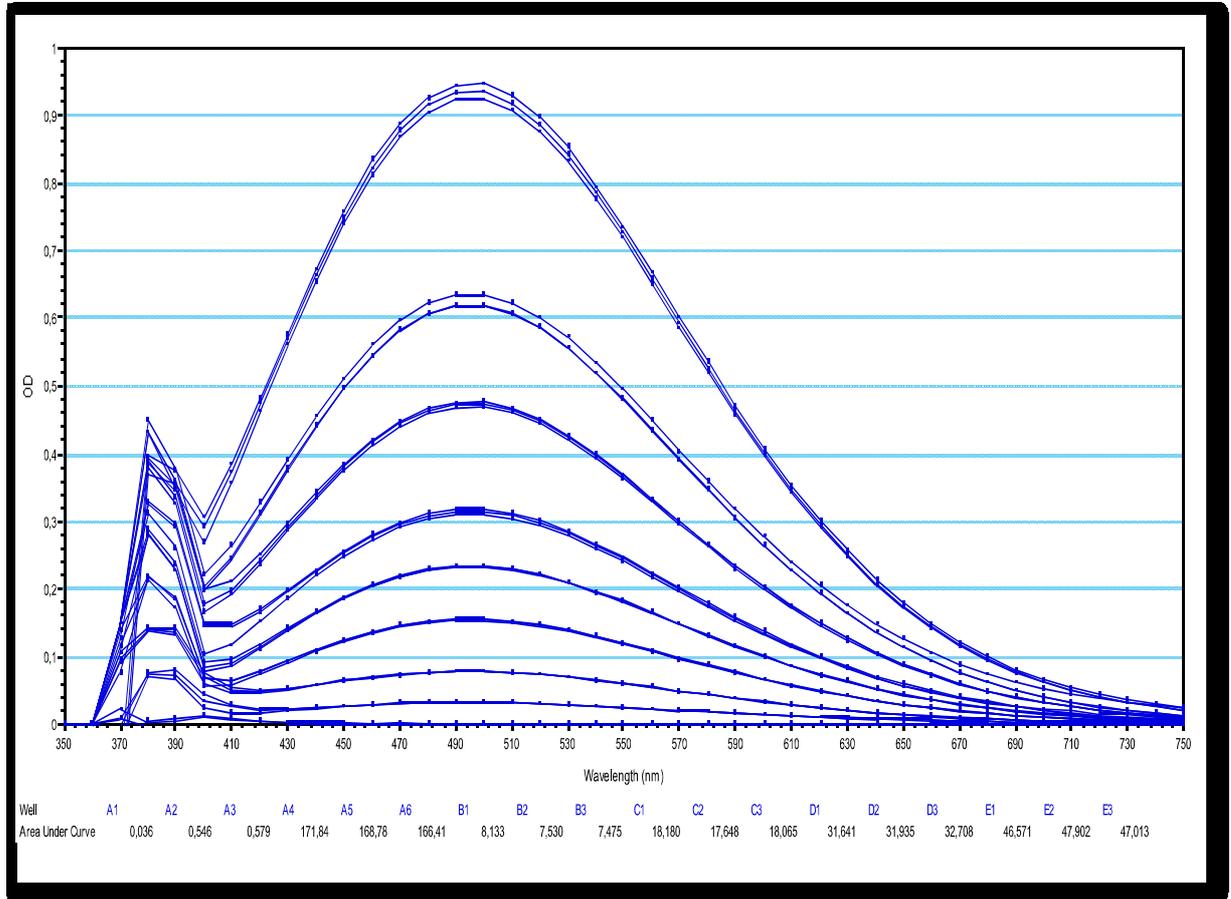
β- HIDROXAMATO ASPÁRTICO	
Gramas pesadas (g)	0,0074
massa molecular(g/mol)	148,12
Moles	0,00005
μ mol	50,0
Concentração (mM) em 10 mL	5

Tabela 2. Preparação das soluções padrão para o método de β -hidroxâmato aspártico

Solução padrão	Moles μmol	β-hidroxâmato aspártico 5 mM (μL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mM) (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0,0	0	2,000	0,50
Padrão 1	0,1	20	1,980	0,50
Padrão 2	0,25	50	1,950	0,50
Padrão 3	0,50	100	1,900	0,50
Padrão 4	0,75	150	1,850	0,50
Padrão 5	1,0	200	1,800	0,50
Padrão 6	1,5	300	1,700	0,50
Padrão 7	2,0	400	1,600	0,50
Padrão 8	3,0	600	1,400	0,50

Espectro UV do β -hidroxâmato aspártico.

Figura 2. Espectro UV- Vis (350 -750 nm) do β -hidroxamato aspártico

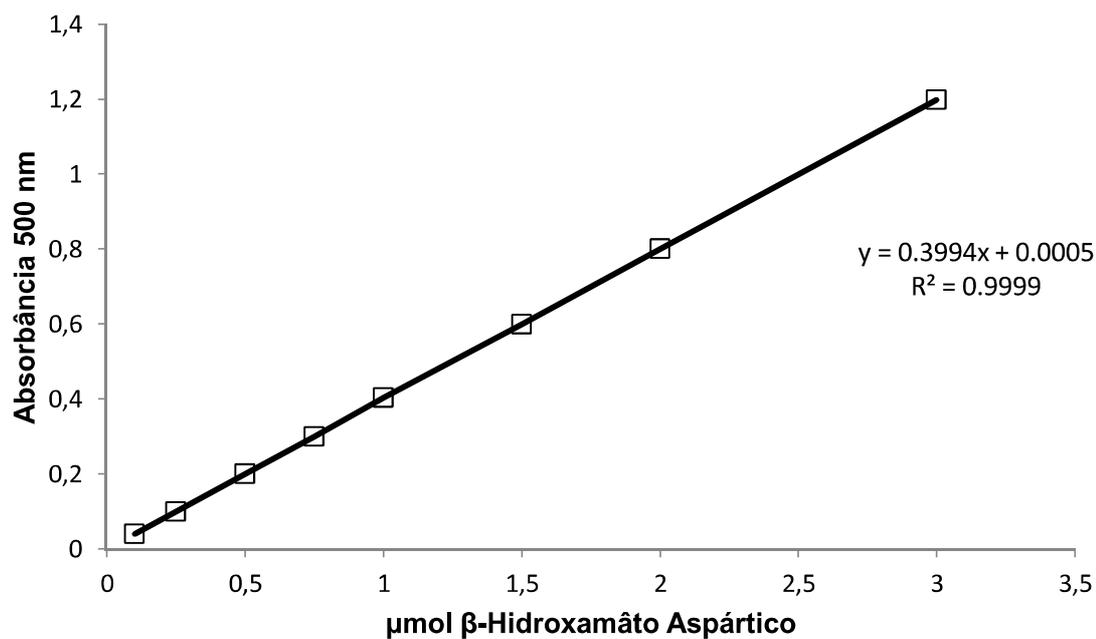


Pode-se observar por meio da varredura UV-visível que o β -hidroxamato aspártico, apresenta absorbância máxima aos 500 nm, e é neste comprimento de onda que se trabalhou para a construção da curva padrão.

Tabela 3. Curva padrão empregada para a quantificação da atividade de ASNase pelo método de AHA

Solução padrão	μmols	A1	x_{A1} — x_{branco}	A2	x_{A2} — x_{branco}	$x_{\text{média}} (A1,A2)$
Branco	0	0,0607		0,0617		
1	0,1	0,1000	0,0393	0,1030	0,0413	0,0403
2	0,25	0,1590	0,0983	0,1627	0,1010	0,0997
3	0,5	0,2580	0,1973	0,2633	0,2016	0,1995
4	0,75	0,3593	0,2986	0,3630	0,3013	0,3000
5	1	0,4610	0,4003	0,4667	0,4050	0,4027
6	1,5	0,6533	0,5926	0,6657	0,6040	0,5983
7	2	0,8553	0,7946	0,8680	0,8063	0,8005
8	3	1,2497	1,1890	1,2683	1,2066	1,1978

Figura 3. Curva padrão em μmolar de β -hidroxamato aspártico pH 8,6, tampão Tris-HCl 50 mM



Procedimento de quantificação de ASNase pelo método de AHA.

Reação Enzimática	
Amostra	Branco
1,5 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)	1,5 mL Tris HCl pH 8,6 (20 mM)
0,2 mL L-asparagina (100 mM)	0,2 mL L-asparagina (100 mM)
0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)	0,2 mL hidroxilamina pH 7,0 (1 M)
0,1 g do micélio	↓
↓	Incubar 37° C por 30 minutos a 200 rpm
Incubar 37° C por 30 minutos a 200 rpm	↓
↓	Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl
Adicionar 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl	↓
↓	Adicionar 0,1 g do micélio
↓	↓
Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos	Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos
↓	↓
Ler o sobrenadante a 500 nm.	Ler o sobrenadante a 500 nm.

A reação entre o hidroxamato aspártico produzido e o FeCl₃ produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm. Uma unidade de ASNase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol β-hidroxâmico aspártico por minuto por mililitro (U/mL).

Cálculos.

Cálculo de μmol de β -hidroxâmato aspártico a partir da curva padrão.

$$y = 0,3994 x$$

$$\mu\text{mol } \beta - \text{hidroxamato aspártico} = \frac{\text{Absorbância}}{0,3994}$$

Cálculo de U/mL de ASNase.

	Fatores
$\mu\text{mol } \beta$ -hidroxamato aspártico produzidos	$\frac{\text{Absorbância}}{0,3994}$
Volume da amostra	0,1 g
Tempo da reação	30 min

$$\frac{U}{\text{mL}} \text{ de ASPase} = \frac{\mu\text{mol } \beta - \text{hidroxamato aspártico}}{\text{volume de amostra} \times \text{tempo da reação}}$$

$$\frac{U}{\text{mL}} \text{ de ASPase} = \frac{\mu\text{mol } \beta - \text{hidroxamato aspártico}}{0,1 \text{ g} \times 30 \text{ min}}$$

*Sempre levar em conta as diluições feitas com anterioridade se for o caso.

Calcular o número de unidades de ASNase por mg de proteínas totais.

$$U \text{ mg} = \frac{U \text{ mL de Asparaginase}}{\text{mg} \text{ mL proteínas totais}}$$

ANEXO 2

Determinação de curvas de calibração para dosagem de glicose e proteínas totais

Curva de calibração para determinação de glicose no meio de cultivo Czapek Dox modificado pH 8,0

Foi preparado meio de cultivo Czapek Dox modificado pH 8,0 com concentração de glicose de 14 g/L e por meio de diluições sucessivas obteve-se as concentrações contidas na Tabela 1.

Foram determinadas as concentrações menores que constam na Tabela 1, buscando permanecer na faixa de detecção do método colorimétrico enzimático utilizado pelo kit bioliquid®.

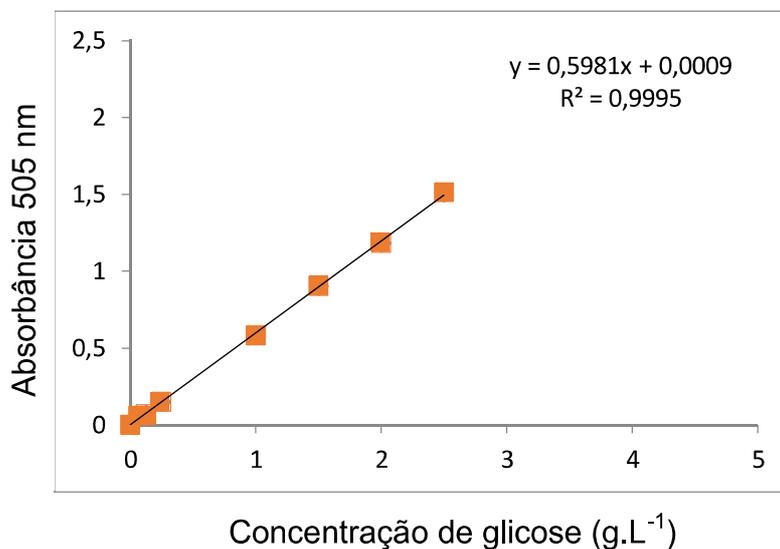
Tabela 1. Concentrações de glicose (g/L) e absorvância obtida em espectrofotômetro a 505 nm

Concentração de glicose (g/L)	Absorvância
0	0,0009
0,065	0,0602
0,125	0,0685
0,25	0,1483
1	0,5823
1,5	0,902

A partir destes dados foi possível plotar o gráfico 1, gerado por meio do software Microsoft® Excel 2010, onde o valor de R, permite verificar que existe confiabilidade na equação da reta, permitindo calcular a concentração de glicose por meio da mesma, conforme equação abaixo:

$$Glicose = \frac{Absorvância - 0,0009}{0,5981}$$

Figura 1. Curva de calibração para determinação de glicose em meio de cultivo Czapek Dox modificado pH 8,0



Para determinação da glicose nas amostras de meio de cultivo foi preciso realizar diluição da amostra de 1:20, permitindo que o método permanecesse dentro dos limites de detecção, sendo realizado ajuste posterior na dosagem de acordo com o fator de diluição.

Curva de calibração para determinação de proteínas totais no extrato bruto após rompimento celular do fungo *Aspergillus terreus* S-18

Para determinar curva de calibração para dosagem de proteínas totais no extrato bruto foi utilizado o método de ácido bicinconínico (BCA) Sigma® e como padrão concentrações de albumina conforme Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de albumina (mg/mL) e absorbância obtida em espectrofotômetro a 562 nm

Concentração de albumina (mg/mL)	Absorbância
200	0,176867
400	0,365067
600	0,558067
800	0,719133
1000	0,870535

A partir destes dados foi possível plotar o gráfico 1, gerado por meio do software Microsoft® Excel 2010, onde o valor de R, permite verificar que existe confiabilidade na equação da reta, permitindo calcular a concentração de glicose por meio da mesma, conforme equação abaixo:

$$Proteínas = \frac{Absorbância - 0,0155}{0,0009}$$

Figura 2. Curva de calibração para determinação de proteínas totais no extrato bruto obtido por meio do rompimento celular de *Aspergillus terreus* S-18

