



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS

MARCELA VANESSA DIAS DA COSTA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE *Aspergillus* spp. DA SEÇÃO *Terrei*  
PROCEDENTES DA MICOTECA URM DA UFPE**

Recife

2022

MARCELA VANESSA DIAS DA COSTA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE *Aspergillus* spp. DA SEÇÃO *Terrei*  
PROCEDENTES DA MICOTECA URM DA UFPE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Orientadora: Cristina Maria Souza Motta

Coorientador: Layanne de Oliveira Ferro

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Costa, Marcela Vanessa Dias da.

Produção de L-asparaginase de *Aspergillus* spp. da Seção Terrei procedentes da micoteca urm da ufpe. / Marcela Vanessa Dias da Costa. - Recife, 2022.  
27 : il., tab.

Orientador(a): Cristina Maria Souza-Motta

Coorientador(a): Layanne de Oliveira Ferro

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências Ambientais - Bacharelado, 2022.

1. Fungos. 2. Biotecnologia. 3. Enzima. 4. Produção enzimática . 5. Micologia . I. Souza-Motta, Cristina Maria . (Orientação). II. Ferro, Layanne de Oliveira. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARCELA VANESSA DIAS DA COSTA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE DE *Aspergillus* spp. DA SEÇÃO Terrei  
PROCEDENTES DA MICOTECA URM DA UFPE**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Cristina Maria Souza Motta, Professora do Departamento de Micologia da  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Layanne de Oliveira Ferro, Doutoranda em Biologia de Fungos do Departamento de  
Micologia da Universidade Federal de Pernambuco

---

Leticia Francisca da Silva, Doutoranda do Departamento de Micologia da  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Ana Patrícia Sousa Lopes de Pádua, Doutoranda do Departamento de Micologia da  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2022

À mainha, painho que doaram a vida para minha educação e ao grande amor da minha vida, André, que esteve comigo durante toda a graduação e deu sentido à minha vida com as minhas filhas Cecília e Teresa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora das Graças que sempre ouviram minhas orações e intercederam do céu para que eu vivesse esse presente que foi estar esses anos na UFPE da melhor forma possível, toda minha devoção. Sem a minha fé eu não teria alcançado essas vitórias.

Aos meus pais, Vânia Ferreira Dias e José Edeilton da Costa que se doaram tanto para que eu alcançasse tudo, obrigada, sem vocês eu não seria nada. Amo vocês mais que tudo que existe nesse mundo.

Ao amor da minha vida, André Vinicius Melo Couto, meu esposo que acompanhou de perto minha graduação, esteve comigo em cada semana de prova, em cada madrugada de estudo. Amo você, obrigada por tudo que você faz por nós. Te amo sem fim, Vi!

Às minhas filhas, Cecília da Costa Couto e Teresa da Costa Couto que mudaram a minha vida e me mostraram que a vida é boa, que existe inocência, que vale a pena concluir ciclos e me fazem tão feliz e completa. Queria poder dizer em palavras quanto divino é o amor que eu sinto, eu dou a minha vida por vocês.

À minha professora, orientadora e amiga Cristina Maria Souza Motta, por toda confiança que depositou na minha breve estadia na micoteca. Tenho um carinho gigantesco pela senhora. Que Deus possa retribuir tudo que me proporcionou.

Ao Departamento de Micologia que foi quase uma segunda casa durante esses anos, onde vivi momentos maravilhosos e conheci pessoas incríveis. Foi maravilhoso ter vocês nesse capítulo da minha vida!

Aos meus amigos da faculdade Mika, Richard, Elton, Walter, Roberta e Ju Maria por fazerem meus dias felizes, foi um prazer ter vocês nesses dias de aula, nas agonias, alegrias e filas do RU. Amo vocês!

À minha amiga, irmã de alma e comadre Anielly Dayane (Ni) por dividir o apartamento e a vida ao meu lado. Obrigada amiga, a nossa ligação não pode ser dita em palavras. Amo você.

Agradeço a minha amiga, Mônica que ganhei de presente junto com a maternidade, deixando essa fase mais leve. Você contribuiu muito para mim como rede de apoio emocional.

Agradeço ao meu amigo e compadre Léo, que amo de coração por toda rede de apoio e companhia de sempre, você é nossa família. Te amo demais, dindo!

Ao meu amigo Diego Barros (*in memoria*) que me fez viver aventuras inesquecíveis nos pós aulas, por ter tido um coração gigante e mesmo com sua partida dolorosa sem conhecer minhas filhas, eu sei de cada frase que eu ouviria e os pitacos e presentes que receberia. Te amo, Di.

Ao meu amigo Vagner por todas as caronas para Recife, toda diversão aliviando os dias de aula nessa universidade, ter você na minha vida em todos os momentos é muito massa! Te amo.

À Leticia, Ana e Layanne que embarcaram comigo nos experimentos e nessa aventura de conclusão de curso, o apoio de vocês me encorajou a concluir esse ciclo.

E por fim, minha gratidão a UFPE, pelos anos vividos nessa aventura de ser estudante dessa instituição, foi incrível.

“É justo que muito custe, aquilo que muito vale.”

Santa Teresa D’ávila, 1588

## RESUMO

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, e por isso são utilizadas em diversas aplicações industriais, como nas indústrias alimentícia e farmacêutica. A L-asparaginase é a enzima que realiza a catálise da reação de hidrólise da asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima é caracterizada como agente antineoplásico que vem sendo utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), doença de Hodgkin, linfossarcoma e melanossarcoma, pois seu mecanismo de ação leva a morte das células tumorais. Na indústria alimentícia é utilizada para a redução dos níveis de acrilamida dos alimentos ricos em carboidratos e fritos, pois existe forte correlação entre a formação de acrilamida e a concentração de asparagina livre, onde a redução de asparagina implica em um teor reduzido de acrilamida nos produtos finais. O gênero *Aspergillus* é de grande interesse, não apenas pela aplicação biotecnológica, mas também pela sua importância econômica devido às suas propriedades metabólicas. Este estudo teve como objetivo selecionar fungos do gênero *Aspergillus*, seção *Terrei* depositados na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco, quanto à capacidade de produzir a enzima L-asparaginase em meio sólido e sob fermentação submersa. Para detectar a produção da enzima em meio sólido, 12 isolados de *Aspergillus* foram selecionados utilizando o meio de cultura sólido Ágar Czapek Dox's modificado (ACDM) suplementado com vermelho de fenol. Todas as placas de Petri inoculadas com os fungos foram incubadas durante 120 horas a 30°C. Após esse período, o Índice Enzimático (IE) foi calculado para verificar a capacidade de produção da enzima pelos isolados. Em seguida, foi realizada uma fermentação submersa em meio Czapek Dox's modificado (CDM), com todas cepas testadas anteriormente em meio sólido. Nesta etapa, foi inoculado 1 mL de suspensão de esporos, em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL do meio CDM, sendo incubados em pré-fermentação durante 4 dias, e em fermentação por 5 dias, a 120 rpm numa temperatura de 30 °C. Após esse período, o micélio foi separado do caldo de cultura por filtração, e utilizado para a verificação da atividade enzimática, onde foram

adicionados soluções tampão e cloreto férrico para leitura em espectrofotômetro a 500 nm. Todas as cepas testadas apresentaram um halo de degradação enzimática em meio sólido, os melhores IE (4,5) foram verificados por *A. terreus* URM 5896, *A. terreus* URM 3571 e *A. neoafricanus* URM 5922. Já na fermentação submersa, as cepas apresentaram atividade enzimática entre 0,70 e 2,04 U/g. Outros estudos também verificaram produção de L-asparaginase em cepas do gênero *Aspergillus*. No presente estudo, podemos concluir que isolados de *Aspergillus* seção *Terrei* depositados na Micoteca URM são promissores para a produção da enzima L-asparaginase. *Aspergillus alabamensis* URM 5255 e *A. hortai* URM 5256 apresentaram maior potencial para síntese da L-asparaginase em meio líquido. *A. alabamensis* URM 5255 é indicado para estudos posteriores mais detalhados de produção e otimização desta enzima de importância industrial.

**Palavras-chaves:** Biotecnologia; Enzima intracelular; Fungos filamentosos; Produção enzimática

## ABSTRACT

Enzymes are proteins that act as catalysts for chemical reactions, and therefore are used in various industrial applications, such as in the food and pharmaceutical industries. L-asparaginase is the enzyme that catalyzes the hydrolysis reaction of asparagine into aspartic acid and ammonia. This enzyme is characterized as an antineoplastic agent that has been used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), Hodgkin's disease, lymphosarcoma and myelosarcoma, because its mechanism of action leads to the death of tumor cells. In the food industry, it is used to reduce acrylamide levels in foods rich in carbohydrates and fried foods, as there is a strong correlation between the formation of acrylamide and the concentration of free asparagine, where the reduction of asparagine implies a reduced content of acrylamide in the products final. In this work, different species of filamentous fungi were tested in the production of important metabolites for the industry and obtained positive results. The genus *Aspergillus* is of great interest, not only for its biotechnological application, but also for its economic importance due to its metabolic properties. This study aimed to select fungi of the genus *Aspergillus*, *Terrei*-section deposited at the Micoteca URM of the Federal University of Pernambuco, regarding the ability to produce the enzyme L-asparaginase in solid medium and under submerged fermentation in order to detect the production of the enzyme for 12 *Aspergillus* isolates that were selected using modified Czapek Dox's Agar solid culture medium (DMCA) supplemented with phenol red. All Petri dishes inoculated with the fungi were incubated for 120 hours at 30°C. After this period, the Enzyme Index (EI) was calculated to verify the enzyme production capacity by the isolates. Then, a submerged fermentation was performed in Czapek Dox's modified medium (CDM), with most of the strains tested previously in solid medium. In this step, 1 mL of spore suspension was inoculated into Erlenmeyer flasks containing 50 mL of CDM medium, being incubated in pre-fermentation for 4 days, and in fermentation for 5 days, at 120 rpm at a temperature of 30 °C. After this period, the mycelium was separated from the culture broth by filtration, and used to verify the enzymatic activity

in a spectrophotometer at 500 nm. All strains tested showed a halo of enzymatic degradation in solid medium, with *A. terreus* URM 5896, *A. terreus* URM 3571 and *A. neoafRICANUS* URM 5922 being the best IE (4.5). In the submerged fermentation, the strains showed enzymatic activity between 0.70 and 2.04 U/g. Other studies also verified the production of L-asparaginase in strains of the *Aspergillus* genus. In the present study, we can conclude that isolates of *Aspergillus* section *Terrei* deposited at Micoteca URM are promising for the production of the enzyme L-asparaginase. *A. alabamensis* URM 5255 and *A. hortai* URM 5256 showed greater potential for the synthesis of L-asparaginase in liquid medium, with *A. alabamensis* URM 5255 being indicated for further detailed studies of production and optimization of this enzyme of industrial importance.

**Keywords:** Biotechnology; Filamentous fungi; Intracellular enzyme; Enzyme production

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Resultados da produção de L-asparaginase em meio sólido.....23

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de L-asparaginase (Índice Enzimático = IE) por cepas de *Aspergillus* seção *Terrei* em meio de cultura sólido.....24

Tabela 2 - Atividade enzimática média (U/g) de L-asparaginase produzida por cepas de *Aspergillus* seção *Terrei* em meio de cultura líquido.....25

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1. Enzimas.....	18
2.2 L-asparaginase.....	18
2.3 Gênero <i>Aspergillus</i> e sua importância.....	19
<b>3 METODOLOGIA DO TRABALHO.....</b>	<b>20</b>
3.1 Microorganismos.....	20
3.2 Produção de L-asparaginase em meio líquido.....	20
3.3 Atividade da L-asparaginase.....	21
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>6</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos (Lehninger et al., 2014). A capacidade catalítica das enzimas torna-as adequadas para diversas aplicações industriais, sendo essas proteínas muito utilizadas nas áreas de cosméticos, alimentos, bebidas, têxteis, como também, assim como na indústria farmacêutica (Orlandelli et al., 2012). Além disso, a grande eficiência e especificidade desse grupo de proteínas as torna agentes de grande potencial para uso terapêutico (Lehninger et al., 2014).

A L-asparaginase é uma enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise da asparagina em ácido aspártico e amônia (Nomme et al., 2012). Esta enzima é caracterizada como agente antineoplásico que vem sendo utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA). Além da LLA, tem sido aplicada no tratamento da doença de Hodgkin, leucemia mielocítica aguda, linfossarcoma e melanoossarcoma (Wietchorek et al., 2013). A prática terapêutica mais comum é injetar a enzima livre por via intravenosa, buscando diminuir a concentração sanguínea de asparagina. Sua ação catalítica transforma o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, privando as células malignas do nutriente essencial e inibindo a síntese de proteínas constitutivas, além de proteínas regulatórias fundamentais como as do ciclo celular, e proteínas anti-apoptóticas, resultando em morte celular (Patro & Gupta, 2012). Essas enzimas quando provenientes das bactérias como *Echerichia coli* e *Erwinia corydorandi* possuem atividade antineoplásica contra LLA, todavia, possuem efeitos colaterais para os pacientes como alergias que com o passar do tempo podem neutralizar o efeito da mesma (Richa et al., 2012). Deste modo, busca-se microorganismos eucarióticos para obtenção de uma enzima com menores efeitos adversos e diferentes características que sejam mais vantajosas para a sua aplicação farmacológica (Sarquis et al., 2004).

Além da importância da L-asparaginase para a indústria farmacêutica, há uma crescente demanda desta enzima na indústria alimentícia, para a redução dos níveis de acrilamida dos alimentos ricos em carboidratos e fritos (Kumar et al., 2013). Devido à forte correlação entre a formação de acrilamida e a concentração de asparagina livre, a redução de asparagina nos alimentos implica em um teor reduzido de acrilamida nos produtos finais (Keramat et al., 2011). Os métodos mais eficazes para reduzir a formação de acrilamida são baseados na remoção de precursores como o aminoácido L-asparagina (Fao/Who, 2011). A autoridade europeia em segurança alimentar (EFSA) publicou uma avaliação do risco da presença de acrilamida nos alimentos, no qual concluíram que a ingestão de acrilamida aumenta potencialmente o risco de desenvolvimento de câncer para os consumidores em todos os grupos etários (Efsa, 2015).

Diversas espécies de fungos filamentosos são conhecidas como fontes de compostos bioativos e as pesquisas que destinam-se ao isolamento desses produtos são relevantes em todo o mundo (Sun et al., 2011). Estudos afirmam que diferentes espécies de fungos filamentosos foram testadas na produção de metabólitos de importância para a indústria farmacêutica e obtiveram resultados promissores, incluindo a enzima L-asparaginase (Abreu, 2015; Pádua et al., 2019; Silva et al., 2018).

O gênero *Aspergillus* é um dos maiores gêneros dentre os fungos filamentosos, geralmente possuem colônias com coloração inicialmente branca, amarela, passando para a cor marrom ou para o negro, apresentando um crescimento rápido e abundante. A taxonomia reconhece mais de 300 espécies do gênero *Aspergillus*. Estas espécies são de grande interesse, não apenas pela aplicação biotecnológica, mas também pela sua importância econômica devido às suas propriedades metabólicas (Amorim, 2011). Diversos trabalhos vêm relatando o potencial enzimático de *Aspergillus* na produção de L-asparaginase como Almeida, 2015; Dhale et al., 2014; Loureiro et al., 2012; Mirsha, 2006; Peshwe, 2015; Sarquis et al., 2004; Santos, 2014; Soares, 2010).

De acordo com Loureiro et al. (2012) e Sarquis et al. (2004), fontes alternativas de L-asparaginase, como os micro-organismos eucarióticos, podem levar a descoberta de uma enzima com menores efeitos adversos. Tendo em vista a importância dos usos da enzima L-asparaginase, se faz necessário mais estudos sobre esta enzima para contribuir nas pesquisas das indústrias farmacológica e alimentícia (JHA et al., 2012). Esta pesquisa teve como objetivo selecionar fungos do gênero *Aspergillus* seção *Terrei* depositados na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco quanto à capacidade de produzir a enzima L-asparaginase em meio sólido e sob fermentação submersa.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Enzimas

As enzimas são proteínas formadas por aminoácidos unidos covalentemente por ligações peptídicas (TORRES, 2001). Sendo biomoléculas protéicas, as enzimas são altamente especializadas e essenciais para realização dos processos bioquímicos, catalisando reações nos sistemas biológicos, apresentando alto grau de especificidade por seu substrato (SOARES et al., 2010). São amplamente utilizadas, apresentando grande importância na pesquisa científica, nos diagnósticos clínicos, na indústria e nos processos biotecnológicos em geral. Podem ser obtidas a partir dos vegetais, animais e microorganismos de origem fúngica ou bacteriana, e podem ser utilizadas para diversas finalidades (LIMA et al., 2001).

“O significativo desenvolvimento dos processos biotecnológicos aumentou a importância das enzimas produzidas por micro-organismos, pois estas enzimas podem substituir as de origem animal e vegetal por apresentarem vantagens, como: o curto tempo de produção, a contínua produção, o processo fermentativo não demanda muito espaço e a possibilidade de utilização de substratos de baixo custo” (MACIEL, 2010).

### 2.2 L-asparaginase

A L-asparaginase é utilizada como agente anticancerígeno para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (VERNA et al., 2007) e também é aplicada no tratamento da leucemia linfocítica crônica, leucemia mielocítica aguda, doença de Hodgkin, melanossarcoma, reticulossarcoma e linfossarcoma (DEVI e AZMI, 2012; LOUREIRO, 2012).

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase E.C.3.5.1.1) é uma enzima utilizada como catalisador na reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia (THEANTANA et al., 2009). No tratamento quimioterápico, a enzima age na remoção da L-asparagina do sangue, privando as células tumorais de serem nutridas, controlando, assim, o crescimento do tumor de forma eficaz, uma vez que é um aminoácido essencial para proliferação de células

malignas (CHOW; TING, 2014). A degradação da L-asparagina bloqueia a síntese proteica, ocasionando a morte celular por apoptose (KEATING et al. 1993). A L-asparaginase é encontrada em vários organismos, como: plantas, animais, leveduras, fungos, bactérias e arqueobactérias (IMADA et al., 1973).

Existe duas fontes clínicas conhecidas de L-asparaginase, a *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (ambas bactérias), estas dão origem aos três tipos de asparaginases que são usadas para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA), duas derivadas de *E. coli*, asparaginase peguillada (PEG-asparaginase) e nativa, e uma derivada de *E. chrysanthemi* a *crisantaspase* (DUVAL et al., 2002; RIZZARI et al., 2013).

Com a administração prolongada da L-asparaginase, alguns anticorpos são produzidos no corpo, provocando efeitos colaterais. Por isso, existe uma necessidade de encontrar organismos com finalidade de obter linhagens que produzam L-asparaginase com rendimento elevado e que reduzem os efeitos colaterais (AMENA et al., 2010). Microrganismos eucarióticos podem produzir L-asparaginase com menores efeitos adversos (SARQUIS et al., 2004; LOUREIRO et al., 2012). De acordo com Patil et al. (2012) a produção de L-asparaginase por fungos é mais promissora que a bacteriana por não causar reação alérgica. Existem estudos relatando a produção da enzima L-asparaginase por fungos e os principais gêneros produtores dessa enzima foram *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Eupenicillium*, *Tallaromyces*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Torulomyces* (THEANTANA et al., 2009; NAGARAJAN et al., 2014).

### 2.3 Gênero *Aspergillus* e sua importância

As espécies de *Aspergillus* estão entre os fungos mais diversos do mundo. Eles não são muito seletivos às condições abióticas de crescimento, podendo assim, crescer ao longo de uma grande escala de temperaturas e uma umidade relativamente baixa. Além disso, a nutrição dessas espécies se dá numa grande diversidade de substratos (BENNETT, 2010).

Muitas espécies de *Aspergillus* são utilizadas para obtenção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos, este gênero em particular, tem sido utilizado com muito sucesso para a produção de asparaginase, por exemplo, L-asparaginases fúngicas de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* recombinantes são utilizados na indústria de alimentos para reduzir os níveis de acrilamida formada em alguns alimentos (PEDRESCHI et al., 2011; PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008).

Nos últimos anos, devido ao aumento na demanda de L-asparaginase e o interesse em suas aplicações, fungos eucarióticos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, têm sido investigados como fontes desta enzima (DANGE; PESHWE, 2015; MISHRA, 2006; SARQUIS et al., 2004; SONIYAMBY et al., 2011; VIJAY; JAYA RAJU, 2015; WADE; ROBINSON; PHILLIPS, 1971).

### 3 METODOLOGIA DO TRABALHO

#### 3.1 Microorganismos

As culturas de fungos utilizadas neste trabalho foram procedentes da Micoteca URM, do Departamento de Micologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco. Para seleção quanto à produção da enzima L-asparaginase, foram utilizadas 12 culturas de *Aspergillus* seção *Terrei*, sendo três linhagens de *Aspergillus neoafrikanus*, três de *A. hortai*, uma de *A. alabamensis* e cinco de *A. terreus*.

#### 3.2 Produção de L-asparaginase em meio sólido

A L-asparaginase foi produzida em meio Czapek Dox's modificado (CDM) (Gulati et al., 1997). Este meio é composto por Ágar (10,0 g/L) L-asparagina (10,0 g/L), glicose (2,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,52 g/L),  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L), pH 6,2. Adicionadas a placas de petri

#### 3.3 Produção de L-asparaginase em meio líquido

A L-asparaginase foi produzida em meio Czapek Dox's modificado (CDM) (Gulati et al., 1997). Este meio é composto por L-asparagina (10,0 g/L), glicose (2,0 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,52 g/L),  $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L), pH 6,2. Na pré-fermentação foram utilizados 50 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), nesta etapa o meio difere do descrito anteriormente pelo aumento da quantidade de glicose (14,0 g/L) e acréscimo do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,0 g/L). Estes frascos foram inoculados com 1 mL de suspensão de esporos e incubados a 30°C, a 120 rpm por 96 horas. Após o período de incubação, todas as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e o micélio foi utilizado na etapa de fermentação.

Na fermentação, o micélio obtido na pré-fermentação foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM. Em seguida, estes frascos foram incubados a 30°C, a 120 rpm por 120 horas. Após o período de incubação, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1. O micélio obtido foi utilizado para quantificar a atividade enzimática (Loureiro et al., 2012 modificado).

### 3.4 Atividade da L-asparaginase

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Drainas et al. (1977) modificado. A solução para determinação da atividade foi composta de 1,5 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL solução de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL solução de hidroxilamina pH 7,0 (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica. Foi adicionado o tampão Tris-HCl na biomassa de cada cultura, a qual foi agitada no vórtex. Foram adicionadas nas amostras as soluções de L-asparagina e hidroxilamina.

As amostras e os brancos (biomassa e Tris-HCl) foram incubados por 30 minutos a 37 °C e 150 rpm. Posteriormente, foi adicionado à mistura, 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl [10% (w/v) de FeCl<sub>3</sub>, mais ácido tricloroacético a 5% (p/v) em 0.66 mM de HCl].

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade de microrganismos é um fator importante para busca por produtos naturais e, portanto, no desenvolvimento de novas drogas (Siqueira et al., 2008). Os diversos estudos já publicados sobre a atividade da L-asparaginase em meio sólido com fungos filamentosos, destacaram a grande importância de estudos com novas espécies para verificar sua capacidade de produzir a enzima antileucêmica L-asparaginase (Lapmak et al., 2010). O ensaio em placa de Petri é considerado vantajoso porque é um método rápido em que a produção de L-asparaginase pode ser visualizada diretamente do halo e a zona de atividade enzimática pode ser calculada (Arima et al., 1972; De Jong, 1972). Segundo Gulati et al. (1997), há uma correlação direta entre o diâmetro do halo rosa em torno da colônia e a atividade enzimática produzida em meio líquido. A detecção da capacidade de produção desta enzima em meio sólido é frequentemente utilizada quando há um grande número de isolados (Dhale & Mohan-Kumari, 2014).

Todos os isolados utilizados neste estudo apresentaram halo de degradação enzimática (figura 1), com índice enzimático variando de 2,0 a 4,5, como mostrado na tabela 1. Sendo *Aspergillus terreus* URM 3571, *A. terreus* URM 5896 e *A. neoafrikanus* URM 5922 os melhores produtores de L-asparaginase. Segundo Thirunavukkarasu et al. (2011), fungos do gênero *Aspergillus* são em geral indicados como produtores de L-asparaginase. Em seu estudo, entre os gêneros fúngicos testados, cepas de *Aspergillus* apresentaram capacidade de produzir L-asparaginase. Gulati et al. (1997), considerou *A. oryzae*, como bom produtor de L-asparaginase, apresentando um índice enzimático de 1,08. No entanto, neste estudo foram verificados índices enzimáticos maiores do que o encontrado por esses autores.

Sarquis et al. (2004) analisaram em sua pesquisa 26 culturas de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, e verificaram que apenas espécies de *Aspergillus* produziam um halo enzimático. Santos et al. (2015) testaram 14 cepas de *Aspergillus*, e verificaram um índice enzimático de 3,34 em *A.*

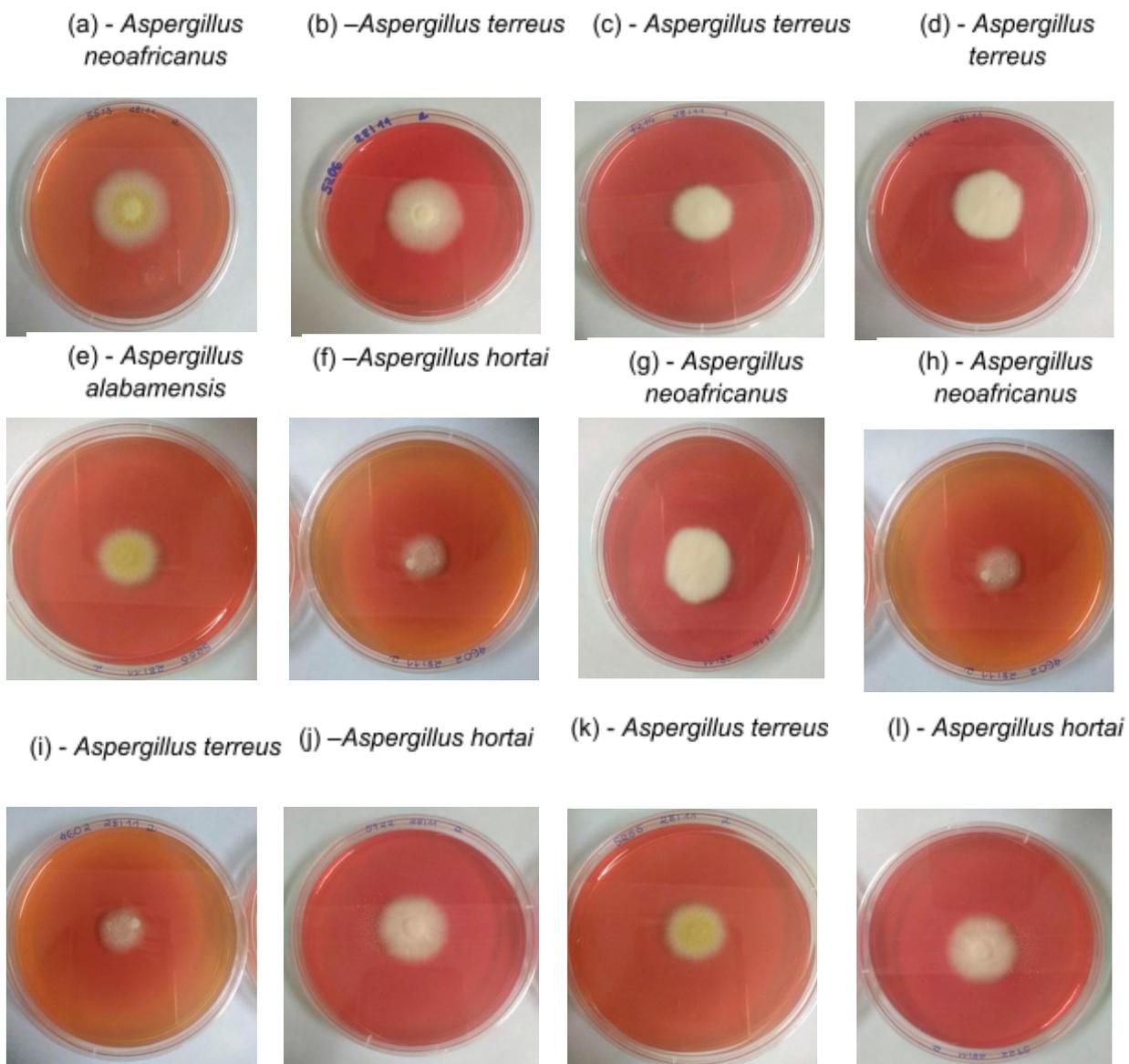
*terreus*. Este resultado se assemelha à média dos índices enzimáticos do atual estudo, que variou entre 2,4 e 4,5 entre os isolados, indicando que *Aspergillus* é um gênero promissor para produção de L-asparaginase.

Quanto à produção da enzima L-asparaginase em fermentação submersa, as 12 cepas selecionadas em meio sólido, também foram testadas quanto a produção da enzima em meio de cultura líquido, no entanto, *A. hortai* URM 4602 e *A. neoafricanus* URM 6197 não produziram biomassa suficiente após o período de fermentação, o que impossibilitou a verificação da sua atividade enzimática. Os valores de atividade enzimática variaram entre 0,70 U/g e 2,04 U/g (Tabela 2). Sendo *A. alabamensis* URM 5255 (2,04 U/g) o isolado que obteve o melhor desempenho de produção da enzima, seguido por *A. hortai* URM 5256 (1,45 U/g).

Santos et al. (2015) em seu estudo sobre endófitos na produção de L-asparaginase extracelular, analisaram o potencial de 14 isolados de *Aspergillus*, e verificaram que 9 apresentaram atividade enzimática (6,66 a 29,02 U/mL), sendo *A. terreus* o melhor produtor; o que difere do atual estudo onde o isolado com melhor resultado foi *A. alabamensis*.

Em sua pesquisa, Almeida (2015) obteve uma atividade enzimática de 0,089 U/mL em *A. terreus*. No presente estudo, isolados de *A. terreus* apresentaram um desempenho melhor, variando de 0,70 U/g a 1,27 U/g, entretanto, vale ressaltar que a metodologia utilizada na pesquisa citada, para determinação da atividade enzimática, não foi a mesma deste trabalho.

Semelhante a metodologia deste estudo, Rocha et al. (2019) testaram uma cepa de *A. terreus*, e obtiveram uma atividade de 1,58 U/g, sendo este resultado maior do que o obtido para as cepas de *A. terreus* neste trabalho. No entanto, o resultado deste estudo para a cepa *A. alabamensis* URM 5255 foi maior do que o resultado de Rocha et al. (2019) para *A. terreus*.

Figura 1 – Produção de L-asparaginase em meio sólido por espécies de *Aspergillus* seção *Terrei*

Fonte: A autora (2019)

Tabela 1 - Produção de L-asparaginase (Índice Enzimático = IE) por cepas de *Aspergillus* seção *Terrei* em meio de cultura sólido.

URM	Isolado	IE
3571	<i>Aspergillus terreus</i>	4,5
4602	<i>Aspergillus hortai</i>	3,5
5255	<i>Aspergillus alabamensis</i>	4,5
5256	<i>Aspergillus hortai</i>	2,6
5279	<i>Aspergillus hortai</i>	3,6
5513	<i>Aspergillus neoafrikanus</i>	2,0
5606	<i>Aspergillus terreus</i>	2,6
5896	<i>Aspergillus terreus</i>	4,5
5922	<i>Aspergillus neoafrikanus</i>	4,5
6197	<i>Aspergillus neoafrikanus</i>	2,0
6614	<i>Aspergillus terreus</i>	2,8
7214	<i>Aspergillus terreus</i>	3,6

Fonte: A autora (2019)

Tabela 2 - Atividade enzimática média (U/g) de L-asparaginase produzida por cepas de *Aspergillus* seção *Terrei* em meio de cultura líquido.

URM	Isolado	Atividade Enzimática Média (U/g) $\pm$ dp*
3571	<i>Aspergillus terreus</i>	0,86 $\pm$ 0,06
5255	<i>Aspergillus alabamensis</i>	2,04 $\pm$ 0,06
5256	<i>Aspergillus hortai</i>	1,45 $\pm$ 0,10
5279	<i>Aspergillus hortai</i>	0,84 $\pm$ 0,03
5513	<i>Aspergillus neoafrikanus</i>	1,08 $\pm$ 0,13
5606	<i>Aspergillus terreus</i>	1,23 $\pm$ 0,54
5896	<i>Aspergillus terreus</i>	0,70 $\pm$ 0,03

<b>URM</b>	<b>Isolado</b>	<b>Atividade Enzimática Média (U/g) <math>\pm</math> dp*</b>
5922	<i>Aspergillus neoafrikanus</i>	0,79 $\pm$ 0,06
6614	<i>Aspergillus terreus</i>	1,01 $\pm$ 0,08
7214	<i>Aspergillus terreus</i>	1,27 $\pm$ 0,21

\*dp= desvio padrão

Fonte: A autora (2019)

## 5 CONCLUSÕES

Espécies de *Aspergillus* da seção *Terrei* da Micoteca URM são capazes de produzir a enzima L-asparaginase tanto em meio sólido quanto em meio líquido. O processo de seleção de espécies produtoras da enzima mostrou-se importante durante o estudo, pois se pode observar a possível mudança de comportamento dos isolados em diferentes condições, possibilitando a verificação do melhor isolado e a variação da produção enzimática nas condições diferentes (meios de cultura sólido e líquido) em que foram submetidos. Os isolados *A. alabamensis* URM 5255 e *A. hortai* URM 5256 apresentam maior habilidade para síntese da L-asparaginase em meio líquido, sendo *A. alabamensis* URM 5255 indicado para estudos mais detalhados de produção e otimização desta enzima de importância industrial.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, J. A. S.; Rovida, A. F. S.; Pamphile, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista **UNINGÁ Review** - Vol.21,1, pp.55-59.
- Almeida, R. P. C. 2015. Avaliação da Produção de L- asparaginase por Fungos Isolados do Bioma Cerrado. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de Brasília, Brasília.
- Amorim, G. M. 2011. Fermentação de farelo de cacau por *Aspergillus niger* para obtenção de lipase e biomassa para alimentação animal. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.
- Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., Tamura, G. 1972. Production of extracellular Lasparaginases by microorganisms. **Agric Biol Chem** 36: 356-361.
- Dhale, M.K. Puttananjaiah M. K. H. 2014. A comparative rapid and sensitive method to screen L-asparaginase producing fungi. **Jornal of Microbiological Methods**. Vol 102, Pages 66-68.
- Drainas, C., Kinghorn, J. R., Pateman, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, v.98, n.2, p.493–501, 1977.
- EFSA - European Food Safety Authority, 2015. *Acrylamide*. <<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150604>>. Acessado em: 25 de Janeiro de 2018.
- FAO JECFA. 2011. Acrylamide. In: Safety Evaluation of Certain Contaminants in Foods / prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/ 63. *Food and Agriculture Organization/World Health Organization*. **Monographs** 8.
- Gulati, R., Saxena, R. K., Gupta, R. 1997. A rapid plate assay for screening Lasparaginase producing micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 24, 23-26.
- JHA, S. K. et al. 2012. Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v.3, n.9, p.3076 -3090.
- Keramat, J. 2011. Arylamide in baking products: a review article. *Food and Bioprocess Technology, Chicago*, v.4, n.4, p.530-543.

Kumar, N. S. M.; Ramasamy, R.; Manonmani, H. K. 2013. Production and optimization of L-Asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 43: 150-158.

Lapmak, K., Lumyong, S., Thongkuntha, S., Wongputtisin, P., Sardud, U. 2010. Lasparaginase production by *Bipolaris* sp. BR438 isolated from brown rice in Thailand. *Chinag Mai J. Sci*; 37: 160–164.

Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2014. *Princípios de Bioquímica*. Sarvier. São Paulo.

Loureiro, C. B. et al. 2012. Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. *Advances in Microbiology*, v.2, n2, p. 138-145.

Mishra, A. 2006. Production of L-Asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.135, n.1, p.33-42.

Nomme, J. et al. 2012. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. *Biochemistry*, v.51, n.34, p. 6816-6826.

Orlandelli, R.; Specian, V.; Felber, A.; Pamphile, 2012. J. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. *Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.3, p.97-109.

Pádua A. P. S. L, et al.2018. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. *Acta Bot Bras*.

Peshwe, S. Dange, V. 2015. Purification and Biochemical Characterization of L-Asparaginase from *Aspergillus niger* and Evaluation of Its Antineoplastic Activity. *International Journal of Science and Research*.

Patro, K. R., Gupta, N. 2012. Extraction, purification and characterization of L-Asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *Biology Research* 3, 30-34.

Richa, J., Zaidi, K. U. Yogita V., Saxena P., 2012. L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *People's Journal of Scientific Research*. v. 5

Rocha, W. R. V.; Costa-Silva, T. A.; Agamez-Montalvo, G. S.; Feitosa, V. A.; Machado, S. E. F.; Souza- Lima, G. M.; Pessoa-Jr, A.; Alves, H. S. 2018. Screening

and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. *Journal of Applied Microbiology*.

Santos, M. G. 2015. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma floresta tropical seca no Nordeste do Brasil. *Gaia Scientia*. v9.

Sarquis, M. I. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., Costa, G. L. 2004. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*99:489-492.

Silva et al., 2018. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for l-asparaginase production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v9.

Siqueira V. M. De. 2008. Fungos endofíticos de folhas e caule de *Lippia sidoides* Cham. E avaliação da atividade antimicrobiana. Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação Mestrado. Recife

Soares, I. A., Flores, A. C., Zanettin, L., Pin, H. K., Mendonça, M. M., Barcelos, R. P., Trevisol, L. R., Carvalho, R. D., Schauren, D., Rocha, C. L. M. S. C, Baroni, S. 2010. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentososo *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 30: 700-705.

Sun, R.; Gao, Y.; Shen, K.; Xu, Y.; Wang, C.; Liu, H.; Dong, J. 2011. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. *Phytochemistry Letters*, v.4, n.2, p.101-105.

Theatana, T. et al. 2009. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, p. 1-8.

Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Murali,T.S., Ravishankar, J.P., Gummadi, S.N. 2011. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. **Mycosphere** 2:147–155.

Wietchorek, P. J. A. G.; Buzato, J. B.; Menegat, F. B, Celligoi, M. A. P. C. 2013. Assessment of *Zymomonas mobilis* and *Erwinia herbicola* for the anti leukaemia asparaginase production. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.1, p.31.