



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

NATÁLIA JULIANE ARAÚJO DE SANT'ANA ALBUQUERQUE GALVÃO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ESTOCADOS NA MICOTECA URM, UFPE**

Recife
2023

NATÁLIA JULIANE ARAÚJO DE SANT'ANA ALBUQUERQUE GALVÃO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ESTOCADOS NA MICOTECA URM, UFPE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biologia de Fungos, da
Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre
em Biologia de Fungos. Área de
concentração: Micologia aplicada.

Orientador: Dr. André Luiz C. M de A. Santiago
Coorientadora: Dra. Cristina Maria de Souza-Motta

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISB

Galvão, Natália Juliane Araújo de Sant'Ana Albuquerque

Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos filamentosos estocados na Micoteca URM, UFPE / Natália Juliane Araújo de Sant'Ana Albuquerque Galvão – 2023.

48 f. : il., fig., tab.

Orientador: André Luiz C.M. de A. Santiago

Coorientadora: Cristina Maria de Souza-Motta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2023.

Inclui referências.

1. Fungos filamentosos 2. Enzimas 3. Biomassa I. Santiago, André Luiz C.M. de A. (orient.) II. Souza-Motta, Cristina Maria de (coorient.) III. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -058

NATÁLIA JULIANE ARAÚJO DE SANT'ANA ALBUQUERQUE GALVÃO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS
FILAMENTOSOS ESTOCADOS NA MICOTECA URM, UFPE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 28 / 02 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luiz C. M de A. Santiago
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE)

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Thalita Camila Nascimento
Universidade Federal do Ceará

*Dedico a minha mãe, Geane, e
a minha filha, Maria Clara.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, amor incondicional e misericórdia infinita.

À Virgem Maria, a quem pertenço inteiramente, que é minha mãe, amiga e intercessora.

Aos meus pais, Geane e Eugênio, por serem meu exemplo de honestidade, perseverança e caridade, e por todo amor, paciência e incentivo.

Ao meu esposo, Rodrigo, pela compreensão, carinho e apoio.

A todos os meus familiares, que torcem pelo meu sucesso profissional.

Aos meus amigos e colegas, especialmente à Letícia e Ana, por toda ajuda na parte experimental.

Ao meu orientador, professor Dr. André Luiz Cabral Monteiro de Azevedo Santiago, pela paciência, ensinamentos e por contribuir para o meu aperfeiçoamento profissional.

À professora Dra. Cristina Maria de Souza Motta, minha coorientadora, pela disponibilidade e toda contribuição neste trabalho.

Ao professor Dr. Gualberto S. A. Montalvo, pela enorme ajuda nas análises estatísticas.

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia de Fungos, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e por suas contribuições para esse trabalho.

Aos técnicos do Departamento de Micologia que sempre ajudaram na realização da pesquisa.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade de fazer o curso.

RESUMO

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase) promove a hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima é utilizada atualmente para o tratamento de leucemias, principalmente da Leucemia Linfóide Aguda (LLA), e, na indústria de alimentos, para minimizar a formação de acrilamida. Estudos demonstraram que fungos filamentosos são produtores de L-asparaginase e que é possível otimizar a produção dessa enzima através de modificações no meio de cultura e na concentração do inóculo. Diante disto, este estudo teve como objetivos verificar a produção de L-asparaginase por 35 fungos filamentosos, estocados na Micoteca URM/UFPE, através da fermentação submersa e melhorar essa produção modificando-se as variáveis pH, quantidade de inóculo e concentração de L-asparagina. *Aspergillus recifensis* URM 6628 apresentou a maior produção de L-asparaginase, sendo selecionado para investigação das melhores condições de produção dessa enzima. Com o auxílio de análises estatísticas, foi verificado que uma melhor produção da L-asparaginase poderia ser alcançada com as seguintes condições experimentais: pH 5,0, quantidade de inóculo 0,5g e concentração de L-asparagina de 0,4%. Constatou-se que a utilização de baixas concentrações de L-asparagina e inóculo favorece a produção da L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628 e que a quantidade de inóculo e a concentração de L-asparagina foram variáveis estatisticamente significativas para a produção dessa enzima, não tendo sido verificado o mesmo para o pH. Com este estudo, foi possível constatar que *A. recifensis* URM 6628 é uma potencial fonte de L-asparaginase, a qual pode ser utilizada em benefício das indústrias alimentícia e farmacêutica. Considerando que diferentes microrganismos podem necessitar de variadas condições para a produção dessa enzima e que o potencial biotecnológico de *A. recifensis* é ainda desconhecido, já que o mesmo foi recentemente descrito (2020), são necessários estudos adicionais de otimização das condições experimentais para que a produção máxima de L-asparaginase por esse espécime seja alcançada.

Palavras-chave: *Aspergillus recifensis*; Atividade enzimática; Concentração de L-asparagina; pH; Quantidade de inóculo.

ABSTRACT

L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase) promotes the hydrolysis of L-asparagine into aspartic acid and ammonia. This enzyme is currently used for the treatment of leukemias, mainly Acute Lymphoid Leukemia (ALL), and, in the food industry, to minimize the formation of acrylamide. Studies have shown that filamentous fungi produce L-asparaginase and that it is possible to optimize the production of this enzyme by modifying the culture medium and inoculum concentration. In view of this, this work aimed to verify the production of L-asparaginase by 35 filamentous fungi stored in Micoteca URM/UFPE through submerged fermentation and to improve this production by modifying the variables pH, quantity of inoculum and concentration of L-asparagine. *Aspergillus recifensis* URM 6628 showed the higher production of L-asparaginase, being selected to investigate the best production conditions for this enzyme. Through statistical analyses, it was verified that a better production of L-asparaginase could be achieved with the following experimental conditions: pH 5.0, quantity of inoculum 0.5g and L-asparagine concentration of 0.4%. It was found that the use of low concentrations of L-asparagine and inoculum favored the production of L-asparaginase by *A. recifensis* URM 6628 and that the quantity of inoculum and the concentration of L-asparagine were statistically significant variables for the production of this enzyme, not and the same was verified for the pH. With this study, it was possible to verify that *A. recifensis* URM 6628 is a potential source of L-asparaginase, which can be used for the benefit of the food and pharmaceutical industries. Considering that different microorganisms may need different conditions for the production of this enzyme and that the biotechnological potential of *A. recifensis* is still unknown, as it was recently described (2020), additional studies are needed to optimize experimental conditions so that the maximum production of L-asparaginase by this specimen is achieved.

Keywords: *Aspergillus recifensis*; Enzymatic activity; Concentration of L-asparagine; pH; Quantity of inoculum.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Produção microbiana de L asparaginase e aplicações	15
Figura 2 - Cronologia sobre estudos da L-asparaginase.....	16
Figura 3 - Inibição do crescimento de células tumorais por L-asparaginase	17
Figura 4 - Formação e redução da formação de acrilamida pela L-asparaginase.....	21
Figura 5 - Superfície de resposta para a produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus recifensis</i> URM 6628 em função da concentração da L-asparagina (%) e biomassa (g) (A), da L-asparagina (%) e do pH (B) e da biomassa (g) e pH (C).	34
Figura 6 - Comparação de médias dos planejamentos experimentais fatoriais 2 ³ , inicial e final.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fungos filamentosos, estocados na Micoteca URM/UFPE, selecionados para esse estudo.....	26
Tabela 2- Planejamento experimental fatorial 2 ³ para melhoramento da produção de L-asparaginase pelo espécime selecionado.....	29
Tabela 3- Atividade enzimática (L-asparaginase) de fungos estocados na Micoteca URM/UFPE.....	30
Tabela 4- Produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus recifensis</i> URM 6628 em planejamento experimental fatorial 2 ³	32
Tabela 5– Análise de variância (ANOVA) para produção enzimática por <i>Aspergillus recifensis</i> URM 6628.	33
Tabela 6- Produção de L-asparaginase por <i>Aspergillus recifensis</i> URM 6628 em planejamento experimental fatorial 2 ³ final.....	35
Tabela 7- Estudos de otimização parcial ou completa da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LLA	Leucemia linfoblástica aguda
JECFA	FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
OMS	Organização Mundial de Saúde
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação Submersa
FB	Fermentação por Biofilme
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
CDM	Czapex Dox's Modificado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.2	OBJETIVOS	14
1.2.1	Objetivo geral	14
1.2.2	Objetivos específicos	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	L-ASPARAGINASE	14
2.1.1	Histórico	15
2.1.2	Importância na indústria farmacêutica	16
2.1.3	Efeitos adversos	19
2.1.4	Importância na indústria alimentícia	20
2.2	PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS	23
2.3	OBTENÇÃO DE ENZIMAS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS	23
2.3.1	Fermentação Submersa	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	MÉTODO DE SCREENING PARA A SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO COM MAIOR ATIVIDADE DA L- ASPARAGINASE	26
3.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS FILAMENTOSOS	28
3.3	SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DA L ASPARAGINASE	28
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1	PRODUÇÃO DA ENZIMA L-ASPARAGINASE	29
4.2	MELHORES CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE	32
5	CONCLUSÕES	38
	REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas compreendem cerca de 52% de todas as enzimas comercializadas, em uma escala global, destacando-se pela variedade estrutural, mecanismos de ação e diversidade de aplicações, principalmente biotecnológicas (LI *et al.*, 2013). Segundo Anbu *et al.* (2015), a produção de enzimas a partir de microrganismos é desejável para a indústria, pois elevadas quantidades dessas proteínas podem ser geradas em um curto espaço de tempo, já que células microbianas exibem um tempo de geração mais curto, e pela possibilidade de serem geneticamente manipuladas, favorecendo o aumento dessa produção.

A L-asparaginase é uma enzima que hidrolisa o aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia, sendo amplamente utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e empregada na indústria de alimentos, para diminuir a formação da substância cancerígena acrilamida, durante a produção de alimentos ricos em carboidratos expostos a temperaturas superiores a 120 °C (KUMAR *et al.*, 2014; ADEBO *et al.*, 2017).

A L-asparaginase é produzida em escala industrial, disponível comercialmente. A produção dessa enzima representa 40% da demanda mundial de enzimas, o que corresponde a 380 milhões de dólares comercializados, em 2017, podendo esse valor ser elevado para 420 milhões de dólares, até 2025 (QESHMI *et al.*, 2018; ALAM *et al.*, 2019). A enzima utilizada no tratamento da LLA é de origem bacteriana e está disponível em três formulações, sendo duas provenientes da *Escherichia coli* e uma da *Erwinia chrysanthemi* (HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016). Porém, as mesmas provocam diversos efeitos adversos nos pacientes, como anafilaxia, hiperglicemia e distúrbios de coagulação (DORIYA; KUMAR, 2016). As causas desses efeitos adversos são atribuídas à produção de anticorpos anti-asparaginase e/ou à atividade da enzima sobre a glutamina (CACHUMBA *et al.*, 2016; BATTISTEL *et al.*, 2021). Na indústria de alimentos, são utilizadas duas formulações de L-asparaginase, de origem fúngica, derivadas de *Aspergillus oryzae* e *A. niger*. Ambas são consideradas seguras pelo Comitê Misto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) e são capazes de reduzir em até 90% a formação da acrilamida nos alimentos (ADEBO *et al.*, 2017; CUNHA, 2020).

Várias espécies de fungos filamentosos têm demonstrado potencial para produção de L-asparaginase, como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (AHMED *et al.*, 2015), *Cladosporium*, *Fusarium* (CHOW; TING, 2015; ISAAC; ABU-TAHON, 2016) e *Penicillium* (GONÇALVES *et al.*, 2016) SILVA *et al.*, 2022). Acredita-se que a L-asparaginase produzida por fungos provoque menos reações adversas ao ser utilizada como medicamento, por apresentar melhor compatibilidade com o sistema humano (LOPES *et al.*, 2017; COSTA-SILVA *et al.*, 2019).

Nesse contexto, é indispensável a realização de pesquisas com o objetivo de selecionar espécies fúngicas produtoras de L-asparaginase com elevado rendimento e que não produzam substâncias tóxicas aos seres humanos. Diante disso, o presente estudo foi desenvolvido com base nas seguintes hipóteses: 1- espécimes de fungos depositados na Micoteca URM/UFPE são produtores de L-asparaginase; 2 - é possível otimizar a produção dessa enzima com base no crescimento dos fungos em meios de cultura com variações do pH, da concentração de L-asparagina e da quantidade de inóculo.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo geral

- Avaliar a produção de L-asparaginase por espécimes de fungos filamentosos estocados na Micoteca URM/UFPE e melhorar a produção dessa enzima pelo espécime selecionado.

1.2.2. Objetivos específicos

- Realizar o *Screening* dos fungos filamentosos que apresentem atividade da asparaginase e selecionar o melhor espécime produtor dessa enzima.
- Encontrar as melhores condições para produção da L-asparaginase pelo espécime selecionado, utilizando as variáveis pH, quantidade de inóculo e concentração de L-asparagina.
- Avaliar os principais efeitos e interações das variáveis biomassa, pH, e L-asparagina em meio de cultura para a melhor atividade da L-asparaginase.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. L-ASPARAGINASE

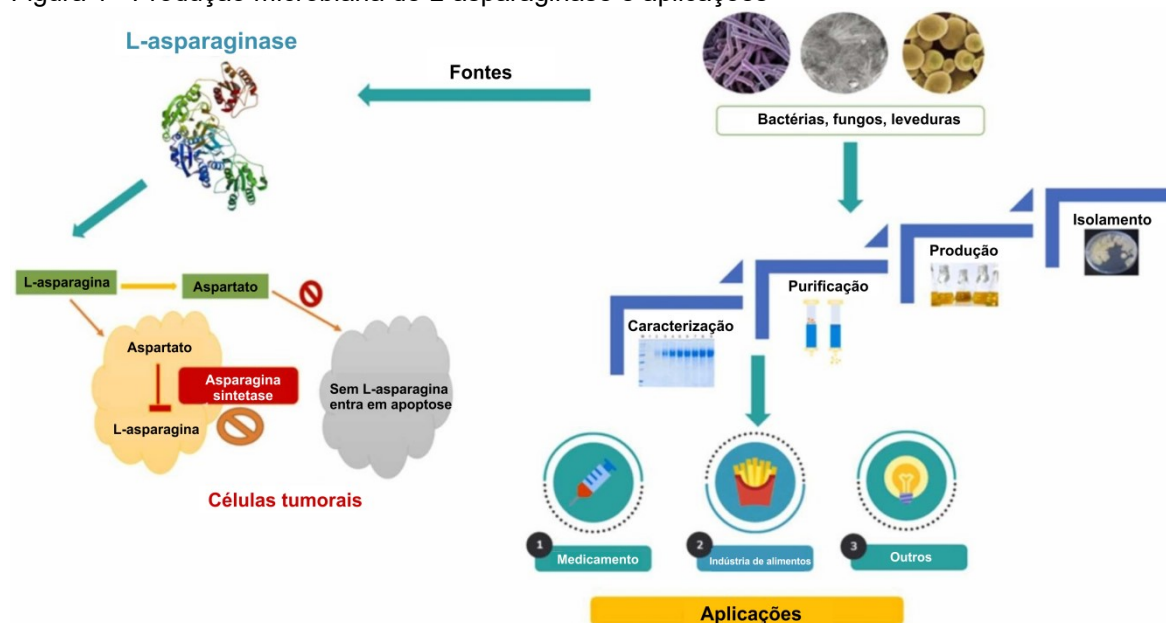
A L-asparaginase é uma enzima do grupo das amidases, classificada como L-asparagina amidohidrolase - E.C. 3.5.1.1. (Classificação da Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica) - que promove a hidrólise da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia e, em menor grau, da L-glutamina em L-glutamato e amônia (BASKAR; RENGANATHAN, 2011; NOMME *et al.*, 2012; BOREK *et al.*, 2014).

Essa enzima é produzida por animais (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016), plantas (SHANMUGAPRAKASH *et al.*, 2015) além de bactérias e fungos (ZIA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016; RAJA *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2019), mas, devido à facilidade de produção, extração e purificação, os

microrganismos são a alternativa mais viável economicamente (Figura 1) (LOPES *et al.*, 2017; MOGUEL, 2018; BRUMANO *et al.*, 2019).

Atualmente, a L-asparaginase tem sido utilizada no tratamento da LLA e na redução da produção da acrilamida em alimentos e compreende 40% da produção total de enzimas em uma escala global (SHARMA *et al.*, 2019; CHAND *et al.*, 2020; PATEL *et al.*, 2022).

Figura 1 - Produção microbiana de L-asparaginase e aplicações



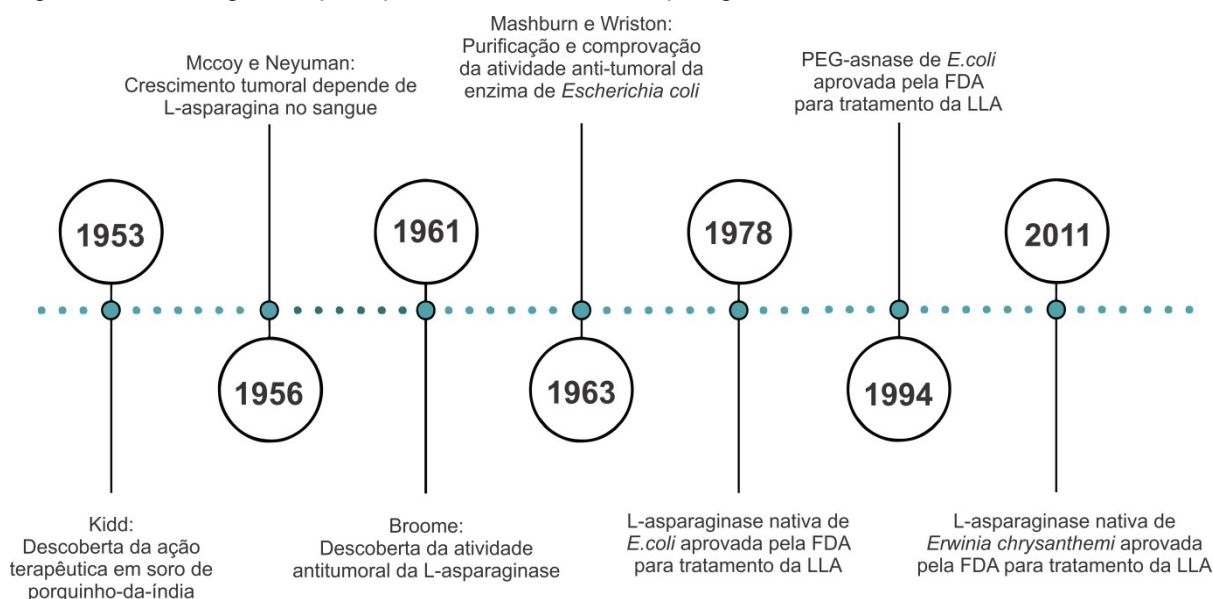
As etapas para obtenção da L-asparaginase por microrganismos consistem no isolamento do microrganismo selecionado e na produção enzimática por fermentação. Em seguida, a enzima é purificada do meio de fermentação e caracterizada através de ensaios físico-químicos. Fonte: Adaptado de Patel *et al.* (2022)

2.1.1. Histórico

A descoberta da ação terapêutica da L-asparaginase ocorreu quando John Kidd (1953) constatou que o soro de porquinhos-da-índia tinha ação antitumoral em camundongos. McCoy e Neuman (1956) observaram que o crescimento das células tumorais dependia da disponibilidade de L-asparagina no sangue. No entanto, somente alguns anos depois, Broome (1961) atribuiu esta propriedade antitumoral à presença da L-asparaginase no soro desses animais (BOREK *et al.*, 2014; BATOOL *et al.*, 2016). A dificuldade em extrair a enzima do soro dos animais fez os pesquisadores procurarem outras fontes para a produção dessa enzima. Mashburn e Wriston (1964) conseguiram purificar e comprovar a

atividade anti-tumoral da L-asparaginase obtida a partir da *Escherichia coli*. A partir de então, iniciou-se a produção enzimática em escalas maiores, permitindo a realização de ensaios clínicos (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). A figura 2 apresenta um resumo histórico da utilização da L-asparaginase como medicamento, desde sua descoberta por John Kidd, até as aprovações dos medicamentos comercializados.

Figura 2 - Cronologia dos principais estudos sobre L-asparaginase.



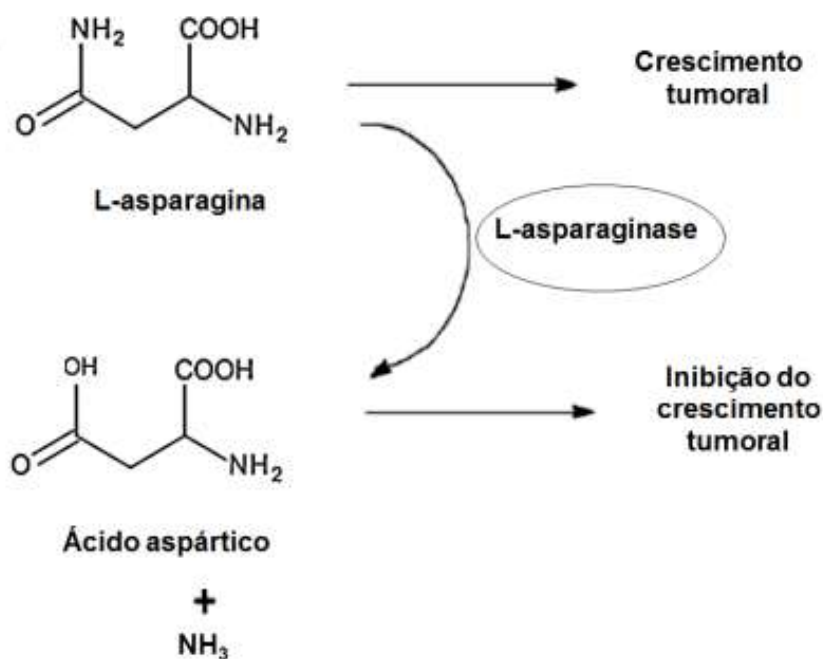
Fonte: Galvão, 2022

2.1.2. Importância da L-asparaginase na indústria farmacêutica

A L-asparaginase foi a primeira enzima terapêutica com função antineoplásica a ser extensivamente estudada, estando inserida na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) como medicamento citotóxico e adjuvante para LLA (BATTOOL *et al.*, 2016). A enzima de fonte bacteriana tem sido utilizada no tratamento da LLA, desde a década de 70, mas também é utilizada, com menos frequência, no tratamento da Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), Linfoma de Hodgking e Leucemia Mielocítica Aguda (LMA) (MEHTA *et al.*, 2014; CECCONELLO *et al.*, 2019). A mesma vem sendo estudada no combate aos diferentes tipos de cânceres, incluindo o de mama (BENCHAMIN *et al.*, 2019).

O efeito anti leucêmico dessa enzima se dá devido à conversão da L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia, no meio extracelular, reduzindo os níveis intracelulares deste aminoácido que é essencial para a síntese proteica nos linfoblastos leucêmicos (Figura 3). As células normais são capazes de sintetizar a L-asparagina intracelularmente por possuírem a enzima asparagina-sintetase, porém as células leucêmicas não a conseguem sintetizar por não possuírem, ou possuírem baixos níveis desta enzima. A inoculação de L-asparaginase purificada na corrente sanguínea consome rapidamente a L-asparagina no plasma sanguíneo, resultando na morte das células neoplásicas (Figura 1), devido à indisponibilidade deste aminoácido, que é necessário para o rápido crescimento das células tumorais, o que torna a L-asparaginase altamente específica para estas células, sem prejudicar as células normais (RIZZARI *et al.*, 2013; KRISHNAPURA *et al.*, 2016; GARCÍA *et al.*, 2019).

Figura 3 – Inibição do crescimento de células tumorais por L-asparaginase



Fonte: Dias (2016)

Atualmente, são utilizadas três preparações diferentes de L-asparaginase que apresentam características farmacocinéticas distintas: duas preparações derivadas da *Escherichia coli*, L-asparaginase nativa e L-asparaginase

polietilenoglicolada (PEG), e uma derivada da *Erwinia chrysanthemi* (PESSION *et al.*, 2005; HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016).

A L-asparaginase derivada de *E. coli*, nativa, apresenta alta imunogenicidade, que se manifesta através de reações de hipersensibilidade, caracterizadas pelo desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase e redução significativa dos níveis de atividade enzimática, e / ou através de uma inativação silenciosa, em que há a neutralização da atividade da enzima sem sinais de hipersensibilidade (HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016; HEO; SYED; KEAM, 2019). Além disso, a administração dessa enzima deve ser realizada com frequência, devido a sua meia-vida curta (1,28 dias) (LABORATÓRIOS BAGÓ, 2023).

A peguilação da L-asparaginase de *E. coli* consiste na fixação do polietilenoglicol (PEG) à superfície da enzima. O polietilenoglicol é um polímero hidrossolúvel, de baixa imunogenicidade que aumenta a solubilidade e estabilidade da proteína conjugada, prolongando sua meia-vida (MENEQUETTI *et al.*, 2019). O conjugado PEG-asparaginase melhora o perfil farmacocinético da enzima sem afetar suas propriedades enzimáticas, além de prolongar sua meia-vida de eliminação para 4,8 a 7 dias (LES LABORATOIRES SERVIER INDUSTRIE, 2020). Por esta razão, essa enzima é utilizada com mais frequência nos tratamentos da LLA. No entanto, a incidência de reações de hipersensibilidade em todas as fases do tratamento é equivalente nas duas preparações, com maior incidência de hepatotoxicidade e disfunção pancreática com a PEG-asparaginase, em adultos, do que em pacientes pediátricos com LLA (HEO; SYED; KEAM, 2019).

A enzima derivada da *E. chrysanthemi* exibe uma meia-vida ainda mais curta, de 15,6 horas, e um tempo de recuperação dos níveis séricos menor, sendo necessárias doses mais elevadas e uma frequência maior de aplicações para assegurar uma atividade enzimática. A mesma apresenta menos efeitos adversos em comparação com as enzimas derivadas de *E. coli*, e, por isso é utilizada como tratamento de segunda linha para pacientes que apresentam graves reações alérgicas às outras preparações (JAZZ PHARMACEUTICALS, 2016; PANETTA *et al.*, 2009; SALZER *et al.*, 2018; CECCONELLO *et al.*, 2019). Não existem protocolos preestabelecidos para iniciar o uso da nova preparação, mas, para evitar um intervalo prolongado sem a medicação, os pacientes com

hipersensibilidade devem começar o tratamento com a enzima derivada de *E. chrysanthemi*, preferencialmente, dentro de 48-72 horas, após o evento de hipersensibilidade, caso os sintomas já tenham sido controlados (HIJIYA; VAN DER SLUIS, 2016).

2.1.3. Efeitos adversos

A eficácia terapêutica das três formulações supracitadas está bem estabelecida. No entanto, estes medicamentos provocam reações adversas, como anafilaxia, disfunção cerebral, distúrbios de coagulação, disfunção hepática, hiperglicemia, pancreatite e trombose (VAN DEN BERG, 2011; DORIYA; KUMAR, 2016). Alguns autores associam essas reações adversas à atividade da glutaminase e outros à produção de anticorpos anti L-asparaginase.

A atividade da glutaminase da L-asparaginase ocorre devido à semelhança estrutural dos aminoácidos L-asparagina e L-glutamina, o que torna a L-glutamina um inibidor competitivo da hidrólise da L-asparagina (CACHUMBA *et al.*, 2016). Alguns dos efeitos colaterais ligados à hidrólise da L-glutamina são a redução da síntese de albumina, insulina, fibrinogênio e proteína-C, resultando em hepatotoxicidade, pancreatite, neurotoxicidade, hiperglicemia, leucopenia, trombose e hemorragia (ATHANASSIADOU *et al.*, 2004; RAMYA *et al.*, 2012; BATOOL *et al.*, 2016). Além disso, as formulações comercializadas, atualmente, são compostas de amidohidrolases, como glutaminase e urease, e não apenas de L-asparaginase, levando à hidrólise destes aminoácidos e provocando toxicidade (CACHUMBA *et al.*, 2016; DORIYA; KUMAR, 2016).

Quanto à produção de anticorpos, quanto maior e mais complexa for uma enzima, mais imunogênica ela será. A L-asparaginase de origem bacteriana possui uma massa molecular de 140 kDa e sua estrutura é formada por quatro subunidades idênticas, o que aumenta a possibilidade de ser reconhecida como estranha e ativar o sistema imune (MÜLLER; BOSS, 1998; VARALAKSHMI, 2013; BATTISTEL *et al.*, 2021). Os anticorpos produzidos ativam uma cadeia de citocinas que estimulam reações de hipersensibilidade no indivíduo, que pode apresentar febre, dispneia, eritema, erupções cutâneas, prurido, náuseas e vômitos (KLOOS *et al.*, 2020; BATTISTEL *et al.*, 2021). Outro efeito colateral é a produção de anticorpos neutralizantes, ou anticorpos silenciosos, que inativam

o efeito da droga sem provocar sintomas nos pacientes (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016).

2.1.4. Importância da L-asparaginase na indústria alimentícia

Na indústria alimentícia, a L-asparaginase é empregada para diminuir a formação da acrilamida durante a produção de alimentos contendo L-asparagina e açúcares redutores, como glicose e frutose, aquecidos em temperaturas superiores a 120 °C e baixa umidade (KUMAR *et al.*, 2014; ADEBO *et al.*, 2017; CUNHA, 2020). Os principais grupos de alimentos com potencial para formação de acrilamida são produtos fritos à base de batata, além de biscoitos, bolachas, cafés e pães, quando torrados (EFSA, 2015). No Brasil, a maior fonte de acrilamida é a batata frita (57%), seguida pelo café moído (14%), farinha de mandioca (8%), bolachas (7%) e pão francês (4%) (ARISSETO; TOLEDO, 2008).

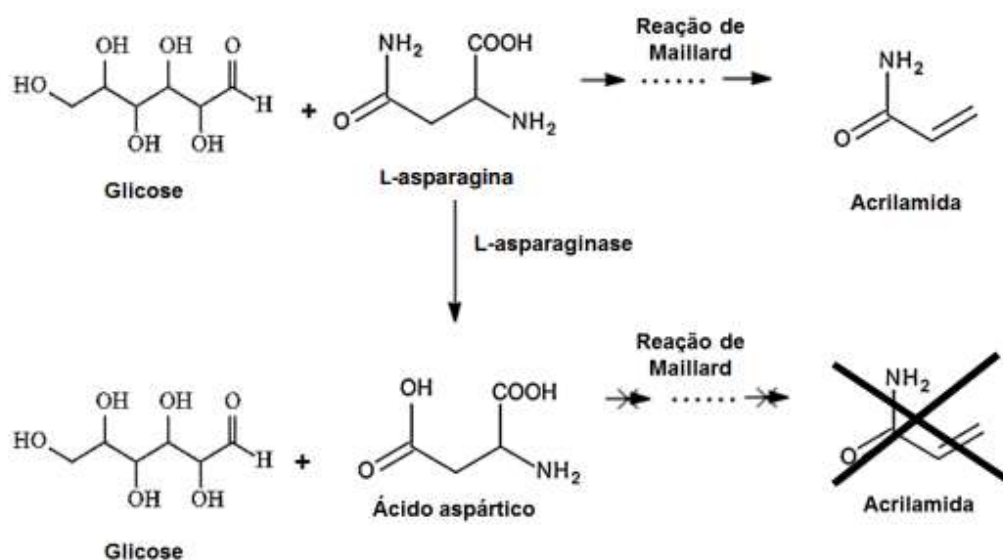
A acrilamida (2-propenamida) é uma neurotoxina sólida, cristalina, incolor e inodora que foi categorizada como carcinogênica para humanos (GÖKMEN; PALAZOGLU, 2008). A formação da acrilamida é resultante da reação de Maillard, que ocorre entre os grupos carbonil dos açúcares redutores e o grupo amino da L-asparagina, presentes nesses alimentos (Figura 4) (VIMAL; KUMAR, 2017). Alimentos ricos em amido possuem naturalmente L-asparagina e a utilização da L-asparaginase, antes desses alimentos serem assados, cozidos ou fritos hidrolisa este aminoácido, minimizando a formação de acrilamida, sem afetar outros aminoácidos, mantendo assim as características sensoriais do alimento preservadas (EL-NAGGAR; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; DORIYA; KUMAR, 2016).

Atualmente, estão disponíveis, no mercado, duas L-asparaginases recombinantes: Acrylaway® (Novozymes, Dinamarca) e a PreventAse™ (DSM Food Specialties, Dinamarca), derivadas dos fungos *Aspergillus oryzae* e *A. niger*, respectivamente, utilizadas na indústria de alimentos e consideradas seguras pelo FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (ADEBO *et al.*, 2017; CUNHA, 2020). Elas são utilizadas em diversos países, como Austrália, China, Estados Unidos, México, Nova Zelândia, Rússia e diversos países da Europa (Xu *et al.*, 2016; CUNHA, 2020). No Brasil, a ANVISA permite

apenas a utilização da Acrylaway® (ANVISA, 2009), embora, os custos para a sua aplicação ainda sejam elevados.

Após aplicação, a enzima deve ser inativada ou removida do alimento. É permitida a presença de resíduos, como a L-asparaginase desnaturada ou seus derivados, embora esses não devam ultrapassar 428 mg/Kg de alimento (JECFA, 2009). Apesar de não haver padronização oficial da quantidade máxima de enzima que pode ser empregada nos diferentes tipos de alimentos, a utilização da mesma é considerada segura, mesmo em concentrações mais elevadas, uma vez que a enzima será completamente inativada (EFSA, 2015).

Figura 4 - Formação e redução da formação de acrilamida pela L-asparaginase



Fonte: Dias (2016)

Diversos estudos revelam novas fontes fúngicas produtoras de L-asparaginase com eficácia na redução da acrilamida em alimentos. Meghavarnam e Janakiraman (2018) investigaram o potencial da L-asparaginase purificada a partir de *Fusarium culmorum* para reduzir a formação de acrilamida em batatas fritas e pães doces. Os alimentos foram tratados com 300 U/mL da enzima e apresentaram redução de 78% a 85% no teor de L-asparagina e 86% a 94% dos níveis de acrilamida. Aiswarya e Baskar (2018) avaliaram a eficácia de L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* no pré-tratamento de batatas fritas. A temperatura e o tempo ótimos de imersão foram encontrados em 170 °C e 15 min, respectivamente, utilizando 4 U/mL da enzima

e obtiveram uma redução de 70% de acrilamida após o tratamento. Dias *et al.* (2017) produziram e purificaram L-asparaginase de *Aspergillus oryzae* e compararam a enzima obtida com a enzima recombinante comercial na redução de acrilamida em batata frita. Eles verificaram uma redução de 72% dessa substância utilizando a enzima produzida por *A. oryzae* contra 92% de redução utilizando a enzima comercial. Porém, diferente da enzima comercial, a enzima produzida pelo fungo não apresentou atividade sobre L-glutamina, sendo esta uma vantagem a ser considerada numa aplicação comercial futura.

2.2. PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS FILAMENTOSOS

A vasta aplicação da L-asparaginase, bem como a importância dessa enzima, tanto na área médica quanto na alimentícia, aumenta a procura desse metabólito no mercado e, conseqüentemente, eleva o seu custo. Apesar de existirem diversas fontes produtoras de L-asparaginase, comercialmente, as bactérias *E. coli* e *E. chrysanthemi* são as utilizadas para produção em escala industrial, para aplicação médica, apesar de causarem diversos efeitos colaterais, enquanto os fungos *Aspergillus oryzae* e *A. niger* são utilizados na indústria alimentícia (VIMAL; KUMAR, 2017). Por esta razão, busca-se desenvolver novos métodos de produção e purificação que minimizem as impurezas que causam reações adversas ao medicamento, como a hipersensibilidade (SARQUIS *et al.*, 2004; VIMAL; KUMAR, 2017).

Microrganismos eucarióticos, como fungos filamentosos, possuem células semelhantes às humanas, e são capazes de realizar diversas modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, acilação, metilação e formação de pontes de dissulfeto, que são responsáveis pela estabilidade proteica e pelo mascaramento de sítios imunogênicos. Assim, esses têm sido alvo de pesquisas para a produção dessa enzima, por apresentarem melhor compatibilidade com o sistema humano, provocando menos efeitos colaterais (BATOOL *et al.*, 2016; CACHUMBA *et al.*, 2016; SHRIVASTAVA *et al.*, 2016).

Várias espécies de fungos filamentosos são conhecidas por produzirem L-asparaginase, como as pertencentes aos gêneros *Aspergillus* (AHMED *et al.*, 2015), *Cladosporium* (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013), *Fusarium*

(ISAAC; ABU-TAHON, 2016; CHOW; TING, 2015), *Mucor* (THAKUR *et al.*, 2013), *Penicillium* (GONÇALVES *et al.*, 2016), *Rhizomucor* (HUANG *et al.*, 2014) e *Rhizopus* (ASHOK; DEVARAI, 2019), e algumas espécies desses gêneros possuem a certificação GRAS (*Generally Recognized as Safe*), que é um dos requisitos da indústria alimentícia (SANTOS *et al.*, 2022), já que algumas espécies de fungos podem produzir micotoxinas, tais como aflatoxina, ocratoxina e zearalenona, que provocam danos às células humanas (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Em seu trabalho, Doriya e Kumar (2016) descreveram a produção de L-asparaginase por 35 espécies de fungos filamentosos, com destaque para *Aspergillus sp.*, que apresentou maior atividade enzimática (33,59 U/mL) em relação às demais espécies. El-Gendy *et al.* (2021) realizaram uma triagem de isolados de fungos do solo para produção extracelular de L-asparaginase, tendo *Fusarium equiseti* se apresentado como melhor produtor (11,34 U/mL), sendo selecionado para estudos de otimização da produção, com uma produção final de L-asparaginase de 40,78 U/mL, em pH 7,0, temperatura de 30 °C, 0,1% de glicose, 0,2% de L-asparagina e 0,1% de alanina. Balasubramanian *et al.* (2012), Zia *et al.* (2013), Dias *et al.* (2015) e Santos *et al.* (2022), apresentaram em seus estudos fungos do gênero *Aspergillus* como bons produtores de L-asparaginase.

Embora vários estudos relataram sucesso em encontrar novas fontes fúngicas promissoras quanto à produção de L-asparaginase e demonstraram a eficácia dessa enzima frente às células tumorais, a maioria destes estudos foi desenvolvida em escala de laboratório (Dias *et al.*, 2016; Hassan *et al.*, 2018; Benchamin *et al.*, 2019) e muito ainda precisa ser pesquisado, principalmente com relação aos estudos clínicos e de otimização da produção dessa enzima (PATEL *et al.*, 2022). Outro desafio é tornar a produção da enzima mais acessível economicamente, favorecendo sua aquisição por populações de baixa renda.

2.3. OBTENÇÃO DE ENZIMAS POR PROCESSOS FERMENTATIVOS

As enzimas produzidas por microrganismos são obtidas através de métodos de fermentação. Os métodos mais comuns são a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FS). A principal diferença entre

ambos os métodos é que na FES não há água livre no processo, enquanto na FS o microrganismo cresce em meio líquido. Porém, ambos os processos são adequados na obtenção de enzimas por fungos filamentosos (MANAN; WEBB, 2017).

Diversos estudos utilizaram a fermentação submersa e a fermentação em estado sólido para analisar a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos. Divyashree *et al.* (2020) avaliaram a síntese de L-asparaginase por *Fusarium* sp. D 05 sob fermentação submersa e as condições ótimas encontradas para a produção dessa enzima foram pH 6, temperatura de 30 °C e 1 mL de inóculo, obtendo-se 119,7 U/mL de atividade enzimática. Hamed *et al.* (2021) realizaram a otimização da produção de L-asparaginase por *Cladosporium tenuissimum*, tendo obtido uma atividade enzimática de 2,6471 U/ml, utilizando 37 °C de temperatura, pH 6,2, tempo de incubação de 72 h e relação carbono/nitrogênio 2:1, em fermentação submersa. Já Meghavarnam e Janakiraman (2017) avaliaram a produção de L-asparaginase por *Fusarium culmorum* (ASP-87) e quantificaram 18,91 U/g, quando avaliado crescimento em meio contendo 50 % de farelo de trigo e 50 % de casca de soja. Kumar e Manonmani (2013) identificaram 9,67 U/mL de atividade enzimática, quando avaliaram a produção de L-asparaginase em fermentação em estado sólido por *Cladosporium* sp.

2.3.1. Fermentação Submersa

A FS é o tipo de fermentação mais utilizado para produção de enzimas em escala industrial, sendo caracterizada pelo crescimento microbiano em meio de cultivo líquido e sob agitação. Este método oferece uma série de vantagens, como facilidade no controle de fatores físico-químicos (pH, temperatura e aeração) e maior absorção de nutrientes, diminuindo o tempo de processo e gerando altos rendimentos de produção, sendo essa mais adequada para produção em larga escala (MANDUJANO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016; VIMAL; KUMAR, 2017; LIU *et al.*, 2020). Entretanto, esta técnica apresenta algumas desvantagens, como o aumento de contaminação bacteriana, devido à presença de água livre, o alto custo das instalações e o fluxograma de produção complexo (CANNEL; MOO-YOUNG, 1980; ALONSO, 2001). Além disso, quando a

produção da enzima é extracelular, os procedimentos para concentração e purificação aumentam o custo da operação (ALONSO, 2001).

As fermentações submersas podem ser realizadas em escala laboratorial e em escala industrial. Os experimentos em escala laboratorial são importantes para avaliar o desempenho de microrganismos com custos menores, sendo utilizados para otimizar algumas condições do processo fermentativo, como fonte e concentração de carbono e nitrogênio, presença de microelementos, entre outras (GAMBOA-SUASNAVART *et al.*, 2013).

Na FS, o modo de operação pode ser realizado em batelada simples, batelada alimentada e fermentação contínua. Na batelada simples, o processo de fermentação acontece de forma única e direta, e todos os substratos são adicionados no início do cultivo, e o produto é removido ao final do processo. Na batelada alimentada, um ou mais substratos são adicionados no decorrer do tempo e o produto é retirado no final do processo. E na fermentação ou batelada contínua, os substratos são adicionados e o produto retirado continuamente, sendo essa a mais utilizada pela indústria atualmente (TORRES NETO *et al.*, 2012; STANBURY *et al.*, 2013).

Atualmente, apenas a FS é utilizada para a produção industrial de L-asparaginase, tanto para uso farmacêutico, quanto para uso na indústria de alimentos (XU *et al.*, 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MÉTODO DE SCREENING PARA A SELEÇÃO DO FUNGO FILAMENTOSO COM MAIOR ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

Foram selecionados trinta e cinco espécimes de fungos filamentosos estocados na Coleção de Culturas -Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), distribuídos entre os gêneros *Absidia*, *Aspergillus*, *Backusella*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Gongronella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus*, como mostra a tabela 1.

Tabela 1- Fungos filamentosos, estocados na Micoteca URM/UFPE, selecionados para esse estudo.

Fungo filamentoso	Número URM
<i>Absidia cornuta</i> D.X. Lima, C.A. de Souza, H.B. Lee & A.L. Santiago	6100
<i>A. multispora</i> T.R.L. Cordeiro, D.X. Lima, Hyang B. Lee & A.L. Santiago	8210
<i>A. caatingaensis</i> D.X. Lima & A.L. Santiago	7156
<i>A. pernambucoensis</i> D.X. Lima, C.M. Souza-Motta & A.L. Santiago	7219
<i>Aspergillus alabamensis</i> Balajee, Baddley, Frisvad & Samson	7211
<i>A. hortae</i> (Langeron) C.W. Dodge	5256
<i>A. terreus</i> Thom	7284
<i>A. barbosa</i> A.C.R. Barros-Correia, R.N. Barbosa, Houbraken & Souza-Motta	7011
<i>A. recifensis</i> A.C.R. Barros-Correia, R.N. Barbosa, Houbraken & Souza-Motta	6628
<i>Backusella azygospora</i> T.R.L. Cordeiro, Hyang B. Lee & A.L. Santiago	8065
<i>B. constricta</i> D.X. Lima, C.A. de Souza, C.M. Souza-Motta & A.L. Santiago	7323
<i>B. indica</i> (Baijal & B.S. Mehrotra) Walther & de Hoog	7643
<i>B. tuberculispora</i> (Schipper) Walther & de Hoog	7642
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> Stadel	8099
<i>C. echinulata</i> (Thaxt.) Thaxt. Ex Blakeslee	7150
<i>C. elegans</i> Lendner	7142
<i>C. gigacellularis</i> A.L. Santiago, C.L. Lima & C.A. de Souza	7400
<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl	7213
<i>F. oxysporum</i> Schltdl	7162
<i>F. pernambucanum</i> A.C.S. Santos, C.S. Lima, P.V. Tiago & N.T. Oliveira	7554
<i>F. sulawesiense</i> Maryani, Sand.-Den., L. Lombard, Kema & Crous	7555
<i>F. fujikuroi</i> Nirenberg	7954
<i>Gongronella brasiliensis</i> C.A.F. de Souza, D.X. Lima & A.L. Santiago	7487
<i>G. lacrispora</i> Hesselt. & J.J. Ellis	8329
<i>Lichtheimia brasiliensis</i> A.L. Santiago, Lima & Oliveira	6910
<i>Mucor merdicola</i> C.A. de Souza & A.L. Santiago	7223
<i>M. pernambucoensis</i> C.L. Lima, D.X. Lima & A.L. Santiago	7640
<i>M. souzae</i> C.A. de Souza, D.X. Lima & A.L. Santiago	7553
<i>Penicillium adametzii</i> K.W. Zaleski	7688
<i>P. barbosa</i> S. Ramos, R. Cruz, R.N. Barbosa & Houbraken	7705
<i>P. javanicum</i> J.F.H. Beyma	7719
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	7170
<i>P. limae</i> S. Ramos, R. Cruz, Souza-Motta & N. Tinti	7706
<i>Rhizopus microsporus</i> Tiegh.	7147
<i>R. arrhizus</i> A. Fisch.	7100

Fonte: Galvão (2022)

Para obtenção do pré-inóculo utilizado na etapa de produção enzimática, os espécimes foram cultivados em meio batata ágar dextrose, em placas de Petri, e incubados por até sete dias a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2$.

A L-asparaginase foi produzida por fermentação submersa em meio Czapek Dox's Modificado (CDM) (GULATI *et al.*, 1997), constituído por glicose (2 g.L^{-1}), L-asparagina (10 g.L^{-1}), KH_2PO_4 ($1,52\text{ g.L}^{-1}$), KCl ($0,52\text{ g.L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,52\text{ g.L}^{-1}$), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,01\text{ g.L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01\text{ g.L}^{-1}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,01\text{ g.L}^{-1}$), em pH 6,2.

Na etapa de pré-fermentação, utilizou-se 50 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), com alteração na quantidade de glicose (14 g.L^{-1}) e adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}). Cinco discos de 5 mm do pré-inóculo foram adicionados aos frascos de Erlenmeyer e incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, a 120 rpm por 96 horas. Posteriormente, todas as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e o micélio utilizado na etapa de fermentação. Para a fermentação, o micélio coletado na etapa de pré-fermentação foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM. Depois, foram incubados por 96 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 120 rpm. Em seguida, as culturas foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 1 e o micélio obtido foi utilizado para quantificar a atividade enzimática (DRAINAS *et al.*, 1977; SILVA *et al.*, 2018).

3.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR FUNGOS FILAMENTOSOS

A atividade da enzima L-asparaginase foi verificada de acordo com Drainas *et al.* (1977), modificado por Silva *et al.* (2018), em que foi utilizado tampão Tris-HCl com pH 8,6 e 0,1 g de biomassa. A solução para determinação da atividade enzimática de cada cultura foi composta de 1,5 mL Tris-HCl pH 8,6 (20 mM), 0,2 mL solução estoque de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL solução de hidroxilamina (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica obtida na etapa de fermentação. A biomassa fúngica foi adicionada ao tampão Tris-HCl e agitada em vórtex (Phoenix AP56). Em seguida, foram adicionadas às amostras, com exceção dos brancos, as soluções de L-asparagina e hidroxilamina. Tanto as amostras quanto os brancos (biomassa e Tris-HCl) foram incubados por 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 150 rpm. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de reagente cloreto férrico [10% (p/v) FeCl_3 mais 5% (p/v) de ácido tricloroacético em 0,66 mol·L HCl] às amostras e

brancos com o objetivo de interromper a reação. Em seguida, foram acrescentadas as soluções de L-asparagina e hidroxilamina aos brancos. Todas as amostras e brancos foram centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação, foi realizada a leitura dos sobrenadantes das amostras em espectrofotômetro (HITACHI U-5100), a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de beta-hidroxamato aspártico, por minuto, a 37 °C, por grama de biomassa (U/g).

Para análise da atividade extracelular (detectada no extrato) foi utilizada a mesma metodologia, substituindo 0,1 g de biomassa por 0,1 mL do extrato. Desta forma, a unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de beta-hidroxamato aspártico, por minuto, a 37 °C, por mililitros de extrato (U/mL).

3.3. SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE

Um planejamento experimental estatístico (2^3) (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005) foi utilizado com o objetivo de avaliar a influência das variáveis para a produção de L-asparaginase do melhor produtor enzimático (tabela 2). O planejamento estatístico foi composto por 12 ensaios, com quatro repetições para o ponto central e três variáveis, com dois níveis para cada uma (2^3). Foram analisadas as influências das variáveis: concentração de L-asparagina, pH, e quantidade de inóculo. Nesta etapa, a pré-fermentação foi realizada seguindo as mesmas condições descritas anteriormente. Na fermentação, foram utilizados 50 mL do meio CDM, modificado, contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), e as variáveis utilizadas foram ajustadas em cada frasco, de acordo com o planejamento seguido (tabela 2). Esses frascos foram incubados a 30 °C e 120 rpm, por 120 horas. Em seguida, a biomassa foi filtrada e utilizada para quantificar a atividade enzimática da L-asparaginase (DRAINAS *et al.*, 1977; SILVA *et al.*, 2018).

Tabela 2- Planejamento experimental fatorial 2³ para melhoramento da produção de L-asparaginase pelo espécime selecionado.

Ensaio	Substrato (%)	pH	Inóculo (g)
E1	0,5	5,0	1,5
E2	1,5	5,0	1,5
E3	0,5	7,0	1,5
E4	1,5	7,0	1,5
E5	0,5	5,0	3,5
E6	1,5	5,0	3,5
E7	0,5	7,0	3,5
E8	1,5	7,0	3,5
E9	1,0	6,0	2,5
E10	1,0	6,0	2,5
E11	1,0	6,0	2,5
E12	1,0	6,0	2,5

Fonte: Galvão (2022)

Com base nos resultados obtidos no planejamento fatorial, foram realizadas sequências experimentais com o objetivo de aumentar a produção enzimática.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para determinar se houve diferença de significância estatística ($p < 0,05$) entre os resultados da produção de L-asparaginase pelos fungos filamentosos testados.

Os resultados obtidos no melhoramento da produção da L-asparaginase foram submetidos ao teste F (ANOVA) para avaliar a relação entre as variáveis independentes e a atividade enzimática. Em todas as análises estatísticas foi utilizado o software R (R Core Team 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3. PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE

Dos 35 fungos selecionados para a triagem quantitativa deste estudo, seis produziram apenas L-asparaginase intracelular (detectada na biomassa), um produziu apenas L-asparaginase extracelular (detectada no extrato) e um

produziu a enzima tanto intracelularmente quanto extracelularmente (tabela 3). Este resultado confirma parcialmente a hipótese 1 desse trabalho, pois apenas sete espécimes de fungos estocados na Micoteca URM apresentaram produção da enzima.

Com base nos resultados obtidos no teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível classificar os resultados em três grupos (A-C), de acordo com a produção enzimática de cada fungo (tabela 3). Apenas espécimes de *Aspergillus* e *Fusarium* produziram a enzima. Os melhores resultados da atividade na biomassa foram observados para *Aspergillus recifensis* URM 6628, *A. hortae* URM 5256 e *Fusarium pernambucanum* URM 7554, que exibiram atividades de 2,41 U/g, 2,11 U/g e 1,19 U/g, respectivamente. A atividade enzimática no extrato foi verificada em apenas dois isolados, *A. terreus* e *F. sulawesense*, com 0,54 U/g e 0,73 U/g respectivamente (tabela 3). Esses resultados são corroborados pelos estudos de Cachumba *et al.* (2016), Chand *et al.* (2020) e Kumar *et al.* (2010), que afirmam que, na maioria dos microrganismos, a produção de L-asparaginase é intracelular, como produto citoplasmático, periplasmático e ligado à membrana. *Aspergillus recifensis* URM 6628 apresentou a maior atividade enzimática, sendo então selecionado para o processo de melhoramento da produção enzimática, em que foi submetido a um modelo de planejamento fatorial 2³. É importante destacar que *A. recifensis* URM 6628 foi recentemente descrito por Barros-Correia *et al.* (2020), e, até o presente, não existem estudos sobre o potencial biotecnológico do mesmo.

Tabela 3- Atividade enzimática (L-asparaginase) de fungos estocados na Micoteca URM/UFPE

Fungo do solo	Número URM	Atividade enzimática (U/g) Biomassa	Atividade enzimática (U/mL) Extrato
<i>Absidia caatinguensis</i>	7156	0 ^c	0 ^b
<i>A. cornuta</i>	6100	0 ^c	0 ^b
<i>A. multispora</i>	8210	0 ^c	0 ^b
<i>A. pernambucoensis</i>	7219	0 ^c	0 ^b
<i>Aspergillus alabamensis</i>	7211	0,76 ^b	0 ^b
<i>A. barbosae</i>	7011	0,77 ^b	0 ^b
<i>A. hortae</i>	5256	2,11 ^a	0 ^b
<i>A. recifensis</i>	6628	2,41 ^a	0 ^b
<i>A. terreus</i>	7284	0,60 ^b	0,54 ^a
<i>Backusella azygospora</i>	8065	0 ^c	0 ^b
<i>B. constricta</i>	7323	0 ^c	0 ^b

<i>B. indica</i>	7643	0 ^c	0 ^b
<i>B. tuberculispora</i>	7642	0 ^c	0 ^b
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	8099	0 ^c	0 ^b
<i>C. echinulate</i>	7150	0 ^c	0 ^b
<i>C. elegans</i>	7142	0 ^c	0 ^b
<i>C. gigacellularis</i>	7400	0 ^c	0 ^b
<i>Fusarium pernambucanum</i>	7554	1,19 ^a	0 ^b
<i>F. oxysporum</i>	7213	0 ^c	0 ^b
<i>F. oxysporum</i>	7162	0 ^c	0 ^b
<i>F. sulawesiense</i>	7555	0 ^c	0,73 ^a
<i>F. verticillioides</i>	7954	0 ^c	0 ^b
<i>Gongronella brasiliensis</i>	7487	0 ^c	0 ^b
<i>G. lacrispora</i>	8329	0 ^c	0 ^b
<i>Lichtheimia brasiliensis</i>	6910	0 ^c	0 ^b
<i>Mucor merdicola</i>	7223	0 ^c	0 ^b
<i>M. pernambucoensis</i>	7640	0 ^c	0 ^b
<i>M. souzae</i>	7553	0 ^c	0 ^b
<i>Penicillium adametzii</i>	7688	0 ^c	0 ^b
<i>P. barbosae</i>	7705	0 ^c	0 ^b
<i>P. javanicum</i>	7719	0 ^c	0 ^b
<i>P. limae</i>	7706	0 ^c	0 ^b
<i>P. oxalicum</i>	7170	0 ^c	0 ^b
<i>Rhizopus arrhizus</i>	7100	0 ^c	0 ^b
<i>R. microsporus</i>	7147	0 ^c	0 ^b

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os valores com a mesma letra não diferem entre si estatisticamente. Fonte: Galvão (2022)

Estudos demonstram que fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* são fontes promissoras de L-asparaginase. Baskar e Renganathan (2009) avaliou a produção desta enzima por *Aspergillus terreus* MTCC 1782 em meio de cultura ágar Czapek Dox, sob fermentação submersa e detectaram uma produção máxima de 9,17 U/mL. Zia *et al.* (2013) estudaram a produção de L-asparaginase por *A. niger* usando subprodutos de resíduos agro, e, após otimização, foi alcançada uma atividade máxima de 2,83 U/mL, usando licor de maceração de milho como substrato. No entanto, estes trabalhos utilizaram como metodologia para quantificação enzimática, o princípio de Nesslerização (IMADA *et al.*, 1973).

No presente estudo, a metodologia utilizada para a quantificação enzimática foi a proposta por Drainas *et al.* (1977), modificado por Silva *et al.* (2018), em que a determinação da atividade da L-asparaginase se dá pela

formação do β -hidroxâmico aspártico a partir da biomassa fúngica. Segundo Magri *et al.* (2018), a quantificação de atividade de L-asparaginase em extratos brutos utilizando o método do ácido L-aspártico β -hidroxamato (AHA) é ideal, uma vez que não sofre interferência de amônia residual, ao contrário do método de Nessler. Usando esta mesma metodologia, Da Rocha *et al.* (2019) realizaram a triagem de 32 fungos filamentosos isolados da Caatinga e quinze apresentaram a capacidade de produzir L-asparaginase, com destaque para o *A. terreus* (1,58 U/mL) como maior produtor entre os espécimes testados.

4.4. MELHORES CONDIÇÕES PARA PRODUÇÃO DA L-ASPARAGINASE POR *Aspergillus recifensis* URM 6628.

Para o melhoramento da produção de L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628, foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 utilizando três variáveis significativas, sendo elas: pH, quantidade de inóculo (biomassa) e concentração do substrato (L-asparagina). No primeiro planejamento experimental (tabela 4), os valores da atividade enzimática variaram entre 1,835 U/g e 2,427 U/g, o que confirmou a importância das variáveis utilizadas para otimização da produção enzimática. Após análise de variância (tabela 5) pode-se observar que a L-asparagina ($p = 0,0083$) e o inóculo ($p = 0,0347$) são variáveis estatisticamente significativas, pois apresentaram $p < 0,05$, enquanto que o pH ($p = 0,8905$) foi pouco significativo. Adicionalmente, como o ajuste do modelo não foi significativo e os resíduos pequenos (tabela 4), pode-se considerar que o modelo utilizado foi adequado.

Tabela 4- Produção de L-asparaginase por *Aspergillus recifensis* URM 6628 em planejamento experimental fatorial 2^3

Ensaio	L-asparagina (%)	pH	Biomassa(g)	Atividade média (U/g)	Atividade prevista (U/g)	Resíduos (U/g)
E1	0,5	5,0	1,5	2,427	2,418	0,010
E2	1,5	5,0	1,5	2,303	2,214	0,089
E3	0,5	7,0	1,5	2,407	2,409	-0,002
E4	1,5	7,0	1,5	2,124	2,206	-0,082
E5	0,5	5,0	3,5	2,307	2,354	-0,047
E6	1,5	5,0	3,5	1,835	1,873	-0,037
E7	0,5	7,0	3,5	2,400	2,346	0,054
E8	1,5	7,0	3,5	1,909	1,864	0,045

E9	1,0	6,0	2,5	2,207	2,210	-0,003
E10	1,0	6,0	2,5	2,311	2,210	0,101
E11	1,0	6,0	2,5	2,140	2,210	-0,071
E12	1,0	6,0	2,5	2,155	2,210	-0,056

Fonte: Galvão, 2022

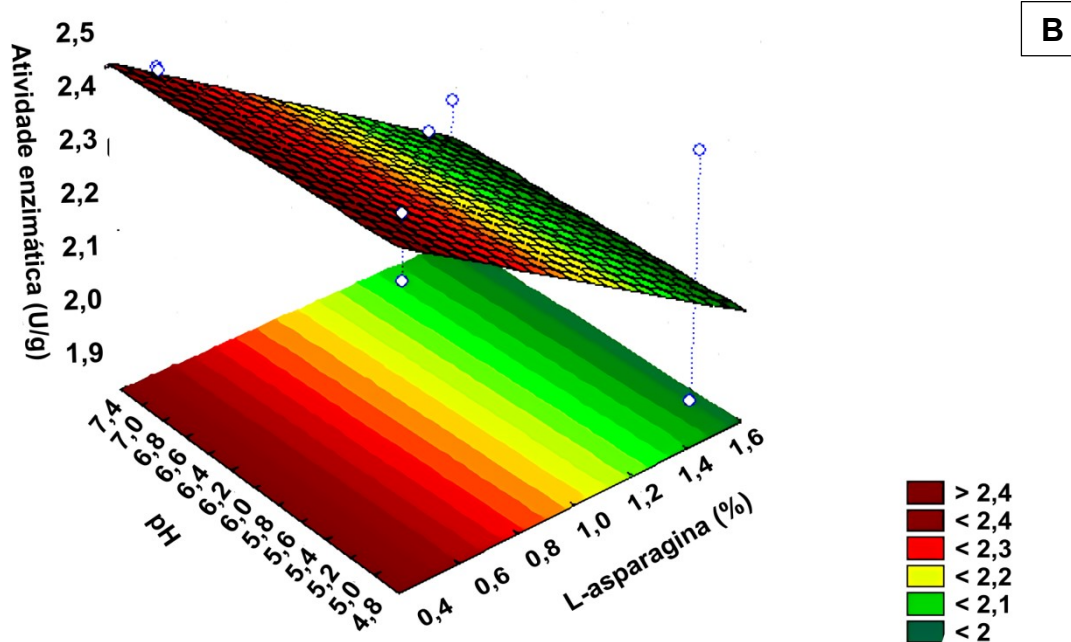
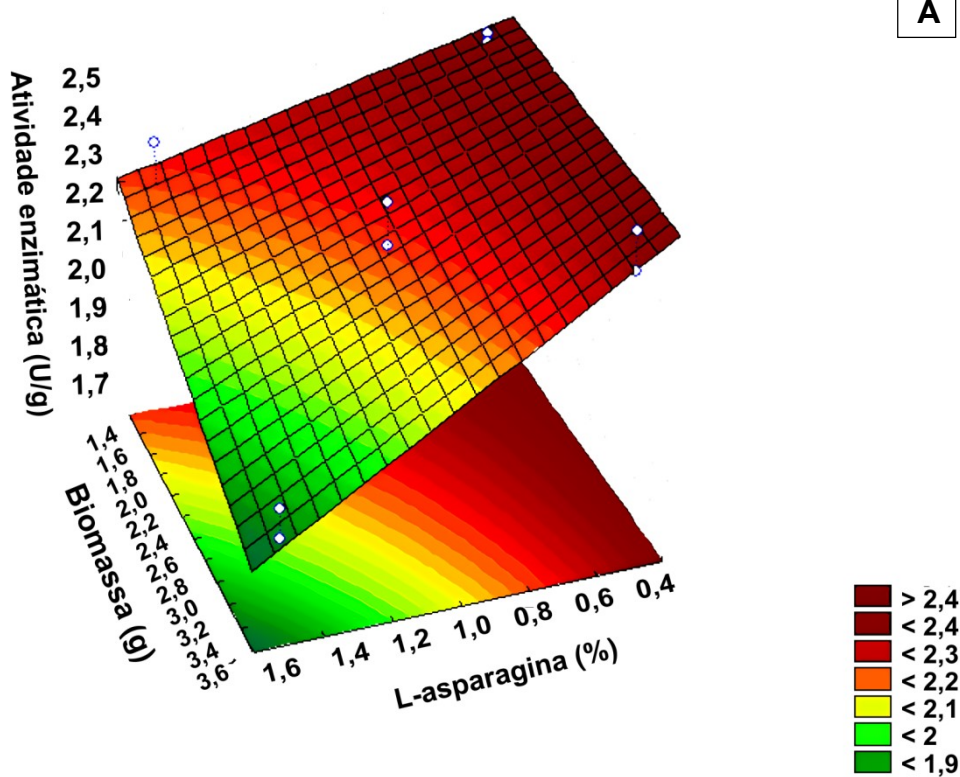
Tabela 5– Análise de variância (ANOVA) para produção enzimática por *Aspergillus recifensis* URM 6628.

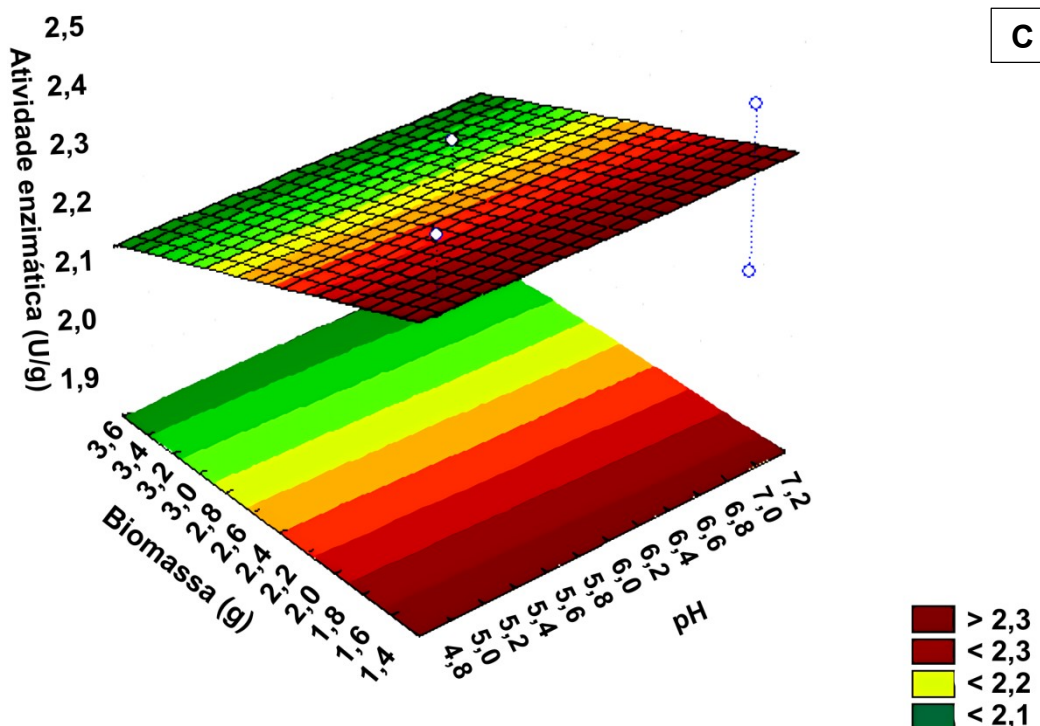
Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado Médio	F	Valor p
(1) Substrato (%)	1	0,2351	0,2351	38,9952	0,0083
(2)pH	1	0,0001	0,0001	0,0224	0,8905
(3) Inóculo (%)	1	0,0818	0,0818	13,5630	0,0347
1 por 3	1	0,0386	0,0386	6,4074	0,0853
Falta de juste	4	0,0235	0,0059	0,9754	0,5296
Erro puro	3	0,0181	0,0060		
Total SS	11	0,3972			

Fonte: Galvão, 2022

Avaliando os gráficos de superfície de resposta (Figura 5A, B e C), pode-se observar que a diminuição da concentração de L-asparagina e da biomassa aumenta a atividade enzimática. Um alto desempenho na atividade enzimática foi observado utilizando 1,5g biomassa e 0,5% de concentração de L-asparagina. As figuras 5B e 5C mostram que a diminuição da concentração da L-asparagina e da biomassa resultou no aumento da atividade enzimática, e que o pH, neste aspecto, pouco influenciou na atividade, podendo dessa forma, ser utilizado dentro de uma escala entre 5,0 a 7,0.

Figura 5 - Superfície de resposta para a produção de L-asparaginase por *Aspergillus recifensis* URM 6628 em função da concentração de L-asparagina (%) e biomassa (g) (A), da L-asparagina (%) e do pH (B) e da biomassa (g) e pH (C).





Fonte: Galvão, 2022

De acordo com os resultados do primeiro planejamento, observa-se que o ponto máximo de atividade enzimática não foi alcançado, mas existem tendências claramente marcadas. Após alguns planejamentos intermediários (resultados não mostrados), os melhores resultados foram alcançados no planejamento final, conforme tabela 6, em que E1-E8 representam os ensaios e C o controle. Como o valor do pH não influenciou na atividade enzimática, neste ensaio foi fixado em 5,0. Os resultados foram agrupados de acordo com a semelhança estatística, em que letras iguais representam valores estatisticamente iguais. Os melhores tratamentos foram observados nos ensaios E3 e E4, em que foram verificadas atividades enzimáticas de 2,561 U/g e 2,535 U/g, respectivamente.

Tabela 6- Produção de L-asparaginase por *Aspergillus recifensis* URM 6628 em planejamento experimental fatorial 2³ final

Ensaio	L-asparagina (%)	Biomassa (g)	Atividade (U/g)	Desvio	Grupo
E1	0,1	0,5	1,992	0,025	cd
E2	0,1	2,5	2,220	0,040	c
E3	0,4	0,5	2,561	0,054	a
E4	0,4	2,5	2,535	0,065	a
E5	0,46	1,5	1,684	0,104	de
E6	0,04	1,5	1,155	0,053	f

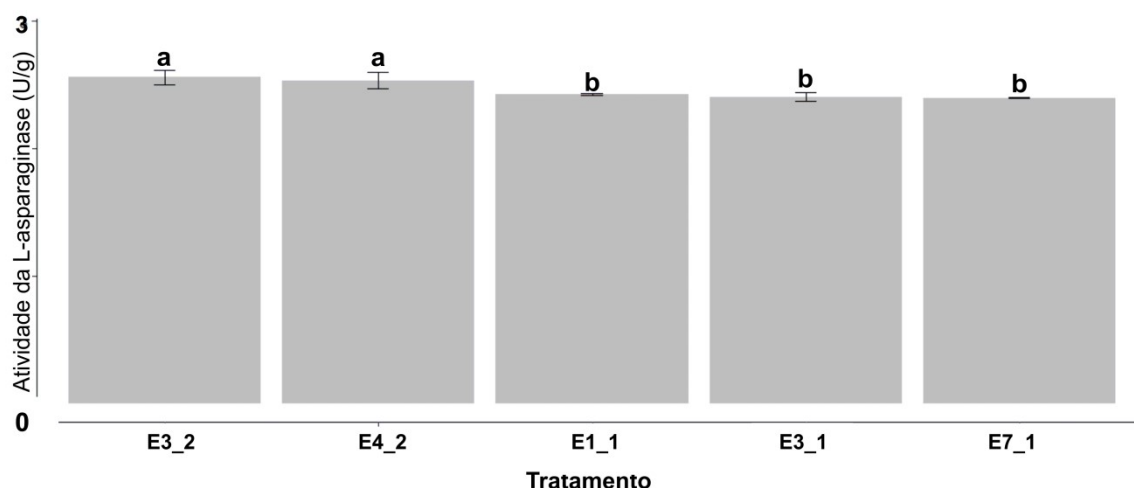
E7	0,25	0,09	1,266	0,000	ef
E8	0,25	2,91	2,225	0,011	c
C	0,25	1,5	2,375	0,059	b

Fonte: Galvão, 2022

A análise dos resultados demonstra que a variável concentração de L-asparagina em 0,4% foi responsável pelos maiores resultados de atividade enzimática, enquanto as quantidades mínimas e máximas de biomassa não influenciaram no valor da atividade final. Assim, a utilização de baixas concentrações de biomassa e inóculo favoreceram a produção da L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628, sendo uma opção comercialmente vantajosa por diminuir o custo da produção da enzima.

Finalmente, foi realizada uma análise *Post Hoc* de comparação de médias dos melhores resultados dos planejamentos inicial (E1, E3 e E7) e final (E3 e E4) (Figura 6). O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$), agrupando-os em dois grupos (a e b).

Figura 6 - Comparação de médias dos planejamentos experimentais fatoriais 2^3 , inicial e final



Os ensaios E1, E3 e E7 estão representados, respectivamente, por E1_1, E3_1 e E7_1 e E3 e E4, representados por E3_2 e E4_2, respectivamente. Fonte: Galvão, 2022

A análise da figura 6 revela que os melhores tratamentos do planejamento final são estatisticamente mais significativos ao serem comparados com os melhores resultados do planejamento inicial, confirmando assim que houve um melhoramento da produção enzimática ao final do estudo. Tal resultado confirma a hipótese 2 deste estudo, pois comprova que é possível otimizar a produção da

L-asparaginase a partir de variações do pH, da concentração de L-asparagina e da quantidade do inóculo.

A produção enzimática é influenciada pela composição do meio de fermentação, da quantidade de inóculo e por diversos fatores físicos, tais como a temperatura de incubação, o pH do meio de cultura, a velocidade de agitação e o tempo de fermentação que aumentam a quantidade e a qualidade da enzima (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; SINGH *et al.*, 2013; REDA, 2015; DIAS; SATO, 2016; SOUZA *et al.*, 2017; CHAND *et al.*, 2020). No entanto, cada microrganismo tem suas próprias condições para a produção máxima da enzima e requer um estudo específico (JIA *et al.*, 2021).

O pH do meio de fermentação é uma variável importante na produção de L-asparaginase, pois atua no transporte de vários compostos através da membrana celular e no gerenciamento do metabolismo celular, afetando diretamente o crescimento fúngico e a disponibilidade de nutrientes no meio (THAKUR *et al.*, 2013; FARAG *et al.*, 2015). A quantidade de inóculo (biomassa) utilizada é um dos fatores mais importantes a ser estudado, pois níveis elevados de biomassa inibem a produção de enzimas, devido ao esgotamento de nutrientes do substrato ou acúmulo de substâncias auto-inibidoras que impedem a formação do produto (HYMAVATHI *et al.*, 2009; HOSAMANI; KALI WAL, 2011). Isto explica o aumento da produção enzimática neste estudo, de 2,41 U/g utilizando 1,5g de biomassa para 2,56 U/g utilizando 0,5g de biomassa. As fontes de nitrogênio também favorecem a produção de L-asparaginase pois influenciam no metabolismo e crescimento fúngico. Sarquis *et al.* (2004) sugerem que a produção é regulada pelo nitrogênio.

Diversos trabalhos verificaram a influência de variáveis para a produção da L-asparaginase por fungos filamentosos, conforme tabela 7.

Tabela 7- Estudos de otimização parcial ou completa da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos

Fungo Filamentoso	Atividade enzimática	Variáveis utilizadas	Referência
<i>Diaporthe ueckerae</i> URM 8321	1,67 U/g	pH 4,0 1% de inóculo 0,2% de farinha de cactáceas	Silva <i>et al.</i> 2022)
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidiicola</i>	1,02 U/g	pH 7,0 0,5% de L-prolina 3,5 g de inóculo	Silva <i>et al.</i> (2018)
<i>Phyllosticta catimbauensis</i>	3,47 U/g	pH 4,2	Magalhães (2019)

		2,5% de L-asparagina 1g de inóculo	
<i>A. terreus</i> CCT 7693	13,50 U/g	120h de incubação pH 9,49 34,6 °C	Costa-Silva <i>et al.</i> (2018)
<i>A. terreus</i> S-18	3,43 U/g	29 °C pH 7,0 3,24x10 ⁷ esporos/mL de inóculo.	Da Rocha <i>et al.</i> (2019)

Fonte: Galvão, 2022

A diferença entre os valores das variáveis, nos estudos citados e no presente estudo, indica que cada microrganismo tem um comportamento específico para produção dessa enzima, e isso se confirma mesmo em estudos utilizando cepas de *Aspergillus*, como foi utilizado neste trabalho.

Salienta-se que todos os resultados supracitados foram alcançados após a otimização completa ou parcial da produção da L-asparaginase, o que indica que *A. recifensis* URM 6628 é promissor como fonte produtora de L-asparaginase. Assim, estudos adicionais sobre o melhoramento da produção dessa enzima que incluam a utilização de outros parâmetros, como temperatura, bem como a utilização de substratos alternativos de baixo custo (ex: resíduos industriais), além de estudos de cinética e bioquímica, podem contribuir com o aumento da produção de L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628, a fim de tornar a produção e comercialização dessa enzima economicamente viáveis.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, dentro das condições experimentais estabelecidas, conclui-se que:

- Fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* possuem potencial para a produção de L-asparaginase, o que não ocorre com cepas de *Absidia*, *Backusella*, *Cunninghamella*, *Gongronella*, *Lichtheimia*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus* avaliadas.
- A produção de L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628 pode ser melhorada diminuindo-se a concentração de L-asparagina e a quantidade de inóculo do fungo, enquanto a variação do pH não influencie na produção dessa enzima por esse fungo.

- A melhor condição para a produção da L-asparaginase por *A. recifensis* URM 6628 é obtida utilizando-se pH 5,0, 0,4% de L-asparagina e 0,5 g de biomassa fúngica.
- *Aspergillus recifensis* URM 6628 exibe potencial para ser utilizado em futuros estudos de otimização da produção da L-asparaginase.

REFERÊNCIAS

ADEBO, O. A. *et al.* Mitigation of acrylamide in foods: An African perspective. In: **Acrylic Polymers in Healthcare**. London: IntechOpen, 2017. p. 152-172.

AHMED, M. M. A. *et al.* Production, purification and characterization of L-asparaginase from marine endophytic *Aspergillus sp.* ALAA-2000 under submerged and solid state fermentation. **Journal of Microbial & Biochemical**, v. 7, n. 3, p. 165-172, 2015.

ANBU, P. *et al.* Microbial enzymes and their applications in industries and medicine 2014. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

AISWARYA, R.; BASKAR, G. Enzymatic mitigation of acrylamide in fried potato chips using asparaginase from *Aspergillus terreus*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 2, p. 491-498, 2018.

ALAM, S. *et al.* Recent development in the uses of asparaginase as food enzyme. In: **Green bio-processes**. Singapore: Springer, 2019. p. 55-81.

ALMEIDA, R. P. C. A. **Avaliação da produção de L-asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado**. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Resolução nº 2 de 26 de maio de 2009.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Estimativa preliminar da ingestão de acrilamida no Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 1, p. 9-4, 2008.

ASHOK, A.; DEVARAI, S. K. L-asparaginase production in rotating bed reactor from *Rhizopus microsporus* IBBL-2 using immobilized Ca-alginate beads. **3 Biotech**, v. 9, n. 9, p. 1-10, 2019.

ATHANASSIADOU, F. *et al.* Severe hyperlipidemia in a child with acute lymphoblastic leukemia treated with L-asparaginase and prednisone. **Pediatrics international**, v. 46, n. 6, p. 743-744, 2004.

BALASUBRAMANIAN, K.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Production, isolation and purification of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* using submerged fermentation. **International Journal of Advanced Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 2, p. 778-783, 2012.

BARBOSA, P. P. M. *et al.* Fungi from Brazilian Savannah and Atlantic rainforest show high antibacterial and antifungal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2017.

BARROS-CORREIA, A. C. R. *et al.* The polyphasic re-identification of a Brazilian *Aspergillus* section Terrei collection led to the discovery of two new species. **Mycological Progress**, v. 19, n. 9, p. 885-903, 2020.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Production of L-asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen source and L-asparagine. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 7, n. 1, 2009.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. 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, n. 1, p. 50-58, 2011.

BATOOL, T. *et al.* A comprehensive review on L-asparaginase and its applications. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900-923, 2016.

BATTISTEL, A. P. *et al.* Allergic reactions to asparaginase: retrospective cohort study in pediatric patients with acute lymphoid leukemia. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 43, p. 9-14, 2021.

BENCHAMIN, D. *et al.* Anti-proliferative activity of L-asparaginase enzyme from fungi on breast cancer. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 1, p. 407-410, 2019.

BOREK, D. *et al.* Crystal structure of active site mutant of antileukemic L-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4097-4111, 2014.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery**. New Jersey: John Wiley & Sons. Inc, 2005. p. 672.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114-1115, 1961.

BRUMANO, L. P. *et al.* Development of L-asparaginase biobetters: current research status and review of the desirable quality profiles. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 6, p. 212, 2019.

CACHUMBA, J. J. M. *et al.* Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 77-85, 2016.

CECCONELLO, D. K. *et al.* Asparaginase: An old drug with new questions. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, p. 275-282, 2020.

CHAND, S. *et al.* A comprehensive review on microbial L-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 619-647, 2020.

CHOW, Y.; TING, A. S. Y. Endophytic L-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 6, p. 869-876, 2015.

COSTA, I. M. *et al.* Recombinant L-asparaginase 1 from *Saccharomyces cerevisiae*: an allosteric enzyme with antineoplastic activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.

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

CUNHA, M. C. **L-asparaginase fúngica: produção, purificação, caracterização bioquímica e aplicação em café para redução dos teores de acrilamida.** 2020. 165 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DA ROCHA, W. R. V. *et al.* Screening and optimizing fermentation production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426-1437, 2019.

DA SILVA, L. F. *et al.* Cacti as low-cost substrates to produce L-asparaginase by endophytic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1-13, 2022.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 2016.

DIAS, F. F. G. **Produção, caracterização bioquímica e aplicação de L-asparaginase fúngica.** 2016. 195 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DIAS, F. F. G. *et al.* Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **LWT-food Science and Technology**, v. 76, p. 222-229, 2017.

DIAS, F. F. G. *et al.* Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 785-794, 2016.

DIAS, F. F. G. *et al.* Simplex centroid mixture design to improve L-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528-534, 2015.

DIVYASHREE, K. C. *et al.* SCREENING AND BIOSYNTHESIS OF L-ASPARAGINASE FROM FUSARIUM SP THROUGH SUBMERGED FERMENTATION. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND MEDICAL RESEARCH**, v. 7, n. 6, 950-953, 2020

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

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.

EL-GENDY, M. M. *et al.* Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 4, p. 2540-2548, 2021.

EL-NAGGAR, N. E.; EL-EWASY, Sara M.; EL-SHWEIHY, N. M. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 182-199, 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Outcome of the public consultation on the draft Scientific Opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) on acrylamide in food. **EFSA Journal**, v. 17, n. 3, p. 1798E, 2015.

FARAG, A. M. *et al.* Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015.

FENG, Y. *et al.* Gene cloning and expression of the L-asparaginase from *Bacillus cereus* BDRD-ST26 in *Bacillus subtilis* WB600. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 127, n. 4, p. 418-424, 2019.

GAMBOA-SUASNAVART, R. A. *et al.* Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production

of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 1421-1429, 2013.

GARCÍA, S. A. M. *et al.* L-asparaginase allergic reactions in children with lymphoblastic acute leukemia. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v. 35, n. 1, p. 1-11, 2019.

GÖKMEN, V.; PALAZOĞLU, T. K. Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 35-42, 2008.

GONÇALVES, A. B. *et al.* Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 387-394, 2016.

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, 1977

HAMED, M. *et al.* Statistical optimization of L-asparaginase production by *Cladosporium tenuissimum*. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 20, n. 1, p. 51, 2021.

HASSAN, S. W. M; FARAG, A. M.; BELTAGY, E. A. Purification, characterization and anticancer activity of L-asparaginase produced by marine *Aspergillus terreus*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 1845-1854, 2018.

HEO, Y. A.; SYED, Y. Y.; KEAM, S. J. Correction to: Pegaspargase: A review in acute lymphoblastic leukaemia. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 901-901, 2019.

HIJIYA, N.; VAN DER SLUIS, I. M. Asparaginase-associated toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 57, n. 4, p. 748-757, 2016.

HOSAMANI, R.; KALI WAL, B. B. L-asparaginase an anti-tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. **International Journal of Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011.

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

HYMAVATHI, M. *et al.* Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191-198, 2009.

IMADA A. *et al.* Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, p. 85-99, 1973.

ISAAC, G. S.; ABU-TAHON, M. A. Production of extracellular anti-leukemic enzyme L-asparaginase from *Fusarium solani* AUMC 8615 grown under solid-state fermentation conditions: purification and characterization of the free and immobilized enzyme. **The Egyptian Journal of Botany**, v. 56, p. 799-816, 2016.

JAZZ PHARMACEUTICALS, ERWINAZE® (asparaginase *Erwinia chrysanthemi*), 2016. Disponível em: <https://pp.jazzpharma.com/pi/erwinase.pt.SPC.pdf>

JECFA. Evaluation of certain food additives. WHO Technical Report 952. Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2009.

JIA, R. *et al.* Microbial L-asparaginase for application in acrylamide mitigation from food: Current research status and future perspectives. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1659, 2021.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 565-582, 1953.

KLOOS, R. Q. H *et al.* Individualized asparaginase dosing in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, n. 7, p. 715-724, 2020.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. A critical review on properties and applications of microbial L-asparaginases. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 5, p. 720-737, 2016.

KUMAR, N. S. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 150-158, 2013.

KUMAR, N. S. M. *et al.* Reduction of acrylamide formation in sweet bread with L-asparaginase treatment. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 3, p. 741-748, 2014.

KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 223-229, 2010.

LABORATÓRIOS BAGÓ, SPECTRILA® (L-asparaginase *Escherichia coli*), 2023. Disponível em: <https://www.bago.com.br/media/files/fcd0f10e5aee4911eb8bee6aabbf6ce40ac/f4bc48e3c8ad011eda35e6aabbf6ce40ac/bula-profissional-2023.pdf>

LES LABORATOIRES SERVIER INDUSTRIE, ONCASPAR® (PEG-asparaginase), 2020. Disponível em: https://www.pharmadoor.com.br/images/medicamentos/bulas/bula_Oncaspar.pdf

LI, Q. *et al.* Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155– 1163, 2013.

LIU, J. *et al.* Comparative characterization of extracellular enzymes secreted by *Phanerochaete chrysosporium* during solid-state and submerged fermentation. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 288-294, 2020.

LOPES, A. M. *et al.* Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 82-99, 2017.

LOUREIRO, C. B. *et al.* Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. **Journal of Advances in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 138-145, 2012.

MASHBURN, L. T.; WRISTON JR, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450-452, 1964.

MAGALHÃES, G. R. A. **Produção de L-asparaginase e diversidade de fungos endofíticos de *Mandevilla catimbauensis* (Apocynaceae) do Parque Nacional do Vale do Catimbau**. 2019. 96 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MAGRI, A. *et al.* A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods-colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 27, p. 6985-6990, 2018.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 91, 2017.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. *et al.* Secreted fungal aspartic proteases: a review. **Revista iberoamericana de micología**, v. 33, n. 2, p. 76-82, 2016.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista brasileira de produtos agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MCCOY, T. A.; MAXWELL, M.; NEUMAN, R. E. The amino acid requirements of the Walker carcinosarcoma 256 in vitro. **Cancer research**, v. 16, n. 10, p. 979-984, 1956.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 124-130, 2017.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Evaluation of acrylamide reduction potential of L-asparaginase from *Fusarium culmorum* (ASP-87) in starchy products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 32-37, 2018.

MEHTA, S. N.; RATNER, L.; HORWITZ, S. M. Adult T-cell leukemia/lymphoma. **Journal of oncology practice**, v. 13, n. 8, p. 487-492, 2017.

MENEGUETTI, G. P. *et al.* Novel site-specific PEGylated L-asparaginase. **PLoS One**, v. 14, n. 2, p. e0211951, 2019.

MOGUEL, I. S. **Production of L-asparaginase of pharmaceutical interest from yeasts isolated from the Antarctic continent**. 2018. 114 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentações). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: UFLA, 2006. p. 726.

MOREIRA, F. M. S. *et al.* **O ecossistema solo: componentes, relações ecológicas e efeitos na produção vegetal**. Lavras: UFLA, 2013. p. 351.

MÜLLER, H. J.; BOOS, 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, n. 3, p. 208-221, 2007.

NOMME, J. *et al.* 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, 2012.

PÁDUA, A. P. S. L. *et al.* 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 Botanica Brasilica**, v. 33, n. 1, p. 39-49, 2019.

PANETTA, J. C. *et al.* Comparison of native *E. coli* and PEG asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, n. 6, p. 651-658, 2009.

PATEL, P. G. *et al.* Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: A review. **Process Biochemistry**, v. 121, p. 529-541, 2022.

PESSION, A. *et al.* Long-term results of a randomized trial on extended use of high dose L-asparaginase for standard risk childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of clinical oncology**, v. 23, n. 28, p. 7161-7167, 2005.

QESHMI, F. Q. *et al.* Marine microbial L-asparaginase: biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, v. 208, p. 99-112, 2018.

RAJA, M. M. M. *et al.* Comparative studies on effect of carbon and nitrogen sources on L-asparaginase production. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 452-457, 2016.

RAMYA, L. N. *et al.* L-asparaginase as potent anti-leukemic agent and its significance of having reduced glutaminase side activity for better treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 8, p. 2144-2159, 2012.

REDA, F. M. Kinetic properties of *Streptomyces canarius* L-glutaminase and its anticancer efficiency. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 957-968, 2015.

RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in oncology**, v. 25, p. S1-S9, 2013.

SALZER, W. *et al.* Asparaginase activity levels and monitoring in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, v. 59, n. 8, p. 1797-1806, 2018.

SANTOS, M. G. S. *et al.* Characterization and partial purification of L-asparaginase produced by endophytic fungi from cactus *Cereus jamacaru*. **Sydowia**, v. 74, p. 303-313, 2022.

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

SHANMUGAPRAKASH, M. *et al.* Biochemical characterization and antitumor activity of three phase partitioned L-asparaginase from *Capsicum annuum* L. **Separation and Purification Technology**, v. 142, p. 258-267, 2015.

SHARMA, D. *et al.* Insights into the microbial L-asparaginases: from production to practical applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 20, n. 5, p. 452-464, 2019.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 100, p. 1-10, 2016.

SILVA, L. F. *et al.* Cacti as low-cost substrates to produce L-asparaginase by endophytic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1-13, 2022.

SILVA, L. F. *et al.* *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 1-12, 2018.

SINGH, P. *et al.* Optimization of cultural conditions using response surface methodology versus artificial neural network and modeling of L-glutaminase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305. **Bioresource technology**, v. 137, p. 261-269, 2013.

SOUZA, P. M. *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, p. 194-202, 2017.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 3 ed. London: Elsevier, 2013. p. 824.

THAKUR, M. *et al.* Isolation, Purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 1-9, 2013.

TORRES NETO, A. B. *et al.* Cinética e caracterização físico-química do fermentado do pseudofruto do caju (*Anacardium occidentale* L.). **Química Nova**, v. 29, p. 489-492, 2006.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase Revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168 – 78, 2011.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. 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, n. 9, p. 121 – 129, 2013.

VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9-17, 2017.

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

ZIA, M. A. *et al.* Production of L-asparaginase from *Aspergillus niger* using agro wastes by-products in submerged fermentation process. **Jurnal Teknologi**, v. 62, n. 2, 2013.