



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

CAROLINA CASTELLO BRANCO RANGEL HELBOURN

**CULTIVO DE BASIDIOMICETO PRODUTOR DE L-ASPARAGINASE EM MEIO
CONTENDO CASCA DE SOJA**

**Brasília
2024**

CAROLINA CASTELLO BRANCO RANGEL HELBOURN

**CULTIVO DE BASIDIOMICETO PRODUTOR DE L-ASPARAGINASE EM MEIO
CONTENDO CASCA DE SOJA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília - UnB, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

Coorientadora: Marina Borges Guimarães

Brasília

2024

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Luciana, que esteve ao meu lado durante toda a minha jornada acadêmica, me deu amor e suporte, e estará ao meu lado em toda a minha vida. À minha irmã, Júlia, que me inspira e me incentiva. Ao meu amor, Marcelo, que vibrou comigo e me acolheu quando foi preciso. Ao meu pai, Alberto, pelo apoio e incentivo.

Agradeço aos meus amigos, sem eles não teria seguido firme nessa caminhada. Em especial, às minhas amigas Ana Luísa e Kaylane. As risadas que compartilhamos aliviaram o estresse de muitos estudos e trabalhos. Nos conhecemos na faculdade e, enfim, seremos amigas de profissão. A amizade e o apoio de vocês foram essenciais para chegar até aqui.

À Prof. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães, pela orientação acadêmica e pela confiança depositada em mim. Agradeço à Marina Borges Guimarães, seus ensinamentos e orientações foram indispensáveis para a elaboração deste trabalho. Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais, sou grata por todo apoio durante os meus experimentos.

RESUMO

A enzima L-asparaginase é um dos tratamentos para a leucemia linfóide aguda (LLA), e atualmente suas fontes desta enzima são as bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*. Com os anos, alguns efeitos adversos provindos dessa enzima foram notados, o que aumentou o interesse por novas fontes de L-asparaginase. Ela pode ser encontrada em animais, plantas e microrganismos. Além disso, a L-asparaginase também é utilizada na indústria alimentícia, com o fim de reduzir uma substância cancerígena nos alimentos, a acrilamida. Os fungos são fontes promissoras dessa enzima, e este trabalho teve como objetivo triar 9 basidiomicetos isolados do cerrado e quantificar a sua produção de L-asparaginase. Esse filo, Basidiomycota, é amplamente conhecido na gastronomia, como shitake e champignon de Paris, e, além disso milenarmente utilizados na medicina chinesa. Seu uso mais recente é na bioconversão de resíduos agrícolas em produtos de valor agregado. A produção de L-asparaginase de 9 basidiomicetos foi avaliada qualitativamente, desses, três apresentaram resultado positivo, FPB 102, FPB 104 e FPB 119. Foram feitas análises quantitativas da enzima e do teor de proteína. Com esses valores, foi possível calcular a atividade específica de L-asparaginase em cada um dos isolados. Um fungo expressou a enzima em maior quantidade que os outros fungos avaliados e foi escolhido para ser aplicado no cultivo submerso com a casca de soja como resíduo agrícola, adicionado como fonte de carbono. Observou-se que a atividade específica no meio contendo casca de soja foi maior do que nos meios usados sem resíduo, demonstrando ser um substrato promissor para a obtenção de L-asparaginase. Novos estudos devem ser feitos para aprimoramento do meio de cultivo para obtenção de melhores resultados.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase is one of the treatments for acute lymphoblastic leukemia (ALL), and the sources of this enzyme are the bacteria *Escherichia coli* and *Erwinia carotovora*. Over the years, some adverse effects from this enzyme were noticed, which increased interest in new sources of L-asparaginase. It can be found in animals, plants, and microorganisms. Furthermore, L-asparaginase is also used in the food industry, to reduce a carcinogen substance in food, acrylamide. Fungi are promising sources of this enzyme, and this work aimed to screen 9 basidiomycetes isolated from the cerrado soil and quantify their production of L-asparaginase. This phylum, Basidiomycota, is widely known in gastronomy, such as shitake and Paris mushrooms, and, in addition, has been used for thousands of years in Chinese medicine. Its most recent use is the bioconversion of agricultural waste into value-added products. The production of L-asparaginase in 9 basidiomycetes was evaluated qualitatively, and three of them showed a positive result, FPB 102, FPB 104, and FPB 119. Quantitative analysis of the enzyme and protein content was evaluated. With these values, it was possible to calculate the specific activity of L-asparaginase in each of the isolates. A fungus expressed the enzyme in greater quantities than the other fungi evaluated and was chosen to be applied in submerged cultivation with soybean hulls as an additional carbon source. It is noted that the specific activity in the soybean hulls was higher than what was measured before, demonstrating that it is a promising substrate for obtaining L-asparaginase. New studies must be carried out to improve the cultivation to obtain the best results.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Curva padrão do teor de proteína de autoria própria17
- Figura 2** - Mecanismo de reação da asparagina com hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β -hidroxamato aspártico férrico, segundo Freitas (2019)18
- Figura 3** – Curva padrão para quantificação de L-asparaginase de autoria própria19
- Figura 4** - Triagem qualitativa da produção de L-asparaginase. A imagem está dividida em três linhas, sendo a primeira referente ao FPB 102, a segunda ao FPB 104 e a terceira do FPB 119. Controles com nitrato de sódio substituindo a asparagina (A) e controles que não possuem o indicador vermelho de fenol (B)21
- Figura 5** - Média do peso seco (g) dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB 119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C23
- Figura 6** - Média da atividade específica em U/g_{cél.} dos extratos aquosos de FPB 102, FPB 104 e FPB 119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C24
- Figura 7** - Média da atividade específica em U/mg_{proteína} dos extratos aquosos de FPB 102, FPB 104 e FPB 119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores de índice de zona dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB 119 após 48h de incubação a 28°C22
- Tabela 2** - Quantificação de L-asparaginase, proteína e peso seco dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB 11923
- Tabela 3** – Quantificação de L-asparaginase e proteína do basidiomiceto FPB 10425

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA	Ácido L-aspartil-beta-hidroxâmico
BCA	Ácido bicinconínico
CuNO ₃	Nitrato de cobre
FeSO ₄	Sulfato de ferro
FPB	Fungo de podridão branca
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
KCl	Cloreto de potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potássio bibásico
L-ASNase	L-asparaginase
LLA	Leucemia linfoide aguda
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
ZnSO ₄	Sulfato de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Leucemia linfóide aguda	9
1.2 L-asparaginase	9
1.3 Basidiomicetos	10
1.4 Resíduo agroindustrial como substrato	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivo específico	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Preparo dos meios de cultura	14
3.2 Preparo do resíduo	15
3.3 Reativação dos fungos	15
3.4 Análise qualitativa em placa	16
3.5 Cultivo submerso	16
3.6 Obtenção do extrato enzimático	16
3.7 Teor de proteína	17
3.8 Quantificação de L-asparaginase	17
3.9 Peso seco	19
3.10 Cultivo em resíduo agroindustrial	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Análise qualitativa em placa	21
4.2 Análise quantitativa de L-asparaginase em cultivo submerso	22
4.3 Triagem do basidiomiceto para cultivo submerso	23
4.4 Cultivo submerso em resíduo agroindustrial	24
5 CONCLUSÃO	26
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia linfóide aguda

A leucemia é um tipo de câncer que é originado na medula óssea, e é considerada uma doença maligna do sangue. Existem vários tipos de leucemia, e elas podem ser consideradas agudas ou crônicas. As agudas acontecem quando células do sangue não são capazes de chegar no seu estado maduro, e há uma proliferação dessas células imaturas no organismo. Já nas crônicas, as células hematológicas chegam ao estado maduro, mas são anormais tanto funcionalmente quanto morfológicamente (ABREU et al., 2021). Além disso, ainda são categorizadas em mielóides ou linfóides, de acordo com a linhagem celular que foi acometida (WEBER et al., 2021). No acometimento das células progenitoras linfóides, que originam as células de defesa, como linfócitos B e T, ocorre a leucemia linfóide, enquanto a falha nas células mielóides, que originam as células vermelhas, grande parte das células brancas e células progenitoras das plaquetas, causam a leucemia mieloide (ABREU et al., 2021).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é a neoplasia maligna que mais ocorre em crianças (VAN BEURDEN-TAN et al., 2022; PEDROSA, 2002), e uma das principais causas de mortes, principalmente nos casos de recidiva (VAN BEURDEN-TAN et al., 2022). Essa doença é caracterizada pela presença de linfoblastos que não têm a capacidade de chegar ao seu estado de maturação por conta de um erro genético, causando um acúmulo dessas células imaturas na medula óssea.

O tratamento da doença é feito em três etapas, e são elas a indução, a consolidação e a manutenção. Na indução o objetivo é eliminar as células leucêmicas do organismo, causando a remissão completa, e são utilizados, por exemplo, antibióticos antitumorais, enzimas que impedem a sobrevivência das células, como a L-asparaginase, medicamentos que impedem a divisão celular, corticoides e imunoterapia. Na consolidação, são utilizados quimioterápicos em doses maiores para eliminar as células leucêmicas restantes. Já na terceira fase, quimioterápicos em doses menores são usados para evitar recidiva nos pacientes (ABREU et al., 2021).

1.2 L-asparaginase

Um dos tratamentos para a LLA é o uso da L-asparaginase, também chamada L-asparagina amido hidrolase, de classificação enzimática EC 3.5.1.1 (ARDILA, 2017;

CARDOSO, 2018), uma enzima que hidrolisa a L-asparagina em ácido aspártico e amônia, reduzindo a concentração desse aminoácido no plasma.

Em um organismo leucêmico, as células malignas não possuem a enzima asparagina sintetase em níveis regulares, e assim não conseguem sintetizar a L-asparagina, precisando utilizar a asparagina livre no plasma para completar o seu ciclo celular. Como medicamento, a L-asparaginase tem a função de hidrolisar estes aminoácidos livres e impedir que as células leucêmicas os utilizem, travando, assim, o ciclo dessas células e induzindo-as à apoptose (BARBA et al., 2017; FREITAS et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020).

A L-asparaginase pode ser encontrada nos tecidos de animais, em microrganismos e plantas. Atualmente, as fontes de L-asparaginase utilizadas para medicamentos são provenientes de cepas de *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* (FREITAS et al., 2021). As formulações existentes de L-asparaginase procariótica são frequentemente tóxicas e contêm resíduos de L-glutaminase e urease, aumentando assim as etapas de purificação. Com o tempo, percebeu-se os efeitos adversos no tratamento de crianças, como choque anafilático, distúrbios de coagulação, trombose, e, em alguns casos, a presença de anticorpos anti-*Erwinia* asparaginase também foi notada (FREITAS et al., 2021; SAEED et al., 2017). Isso levou a um interesse na busca de novas fontes de L-asparaginase que poderiam apresentar menos efeitos adversos, como organismos eucariotos (SARQUIS et al., 2004).

Na indústria alimentícia, a L-asparaginase tem uma função importante para reduzir a acrilamida em produtos que passaram por um tratamento térmico. Essa substância foi classificada como provável carcinógeno humano, no Grupo 2A, pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer da França (FREITAS et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2020; NERI et al., 2004), ela é formada pela redução de açúcares e asparagina, então a função enzimática da L-asparaginase, quanto à indústria alimentícia, é remover um dos precursores da acrilamida (OLIVEIRA et al., 2020). Atualmente, a enzima comercializada é a Acrylaway® da Novozymes A/S, obtida a partir do fungo *Aspergillus oryzae* (XU et al.; 2016).

1.3 Basidiomicetos

Em 2008, Kirk et al registraram 29.914 espécies do filo Basidiomycota, divididos em 177 famílias, 52 ordens e 16 classes, e esses são caracterizados morfológicamente pela produção de esporos de origem sexuada em estruturas denominadas basídios, pela presença de micélios dicarióticos e hifas septadas que podem formar ansas. Em sua maioria são sapróbios,

que dependem de matéria orgânica para seu desenvolvimento. (KIRK et al., 2008; ABRAHÃO, 2010).

Os basidiomicetos também têm grande participação na alimentação. Nomes como shiitake (*Lentinula edodes*) e champignon de Paris (*Agaricus bisporus*) pertencem ao filo Basidiomycota e são amplamente conhecidos e utilizados na gastronomia mundialmente. Além disso, esses fungos estão sendo cada vez mais utilizados para a produção de ração animal, tanto para alimentação direta de aves (BEDERSKA-ŁOJEWSKA et al., 2017), quanto para enriquecimento da ração que seria dada aos animais (GALÚCIO et al., 2018). Isso se deve pela capacidade antioxidante, imunoestimulante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral e hipocolesterolêmica destes fungos. Ademais, eles conseguem realizar a bioconversão de compostos complexos e os tornar mais disponíveis para os animais absorverem (BEDERSKA-ŁOJEWSKA et al., 2017; GALÚCIO et al., 2018).

Espécies de basidiomicetos têm histórico milenar na medicina chinesa, e os fungos que produzem asparaginase, além do seu benefício terapêutico de poder causar menos efeitos adversos quando se utiliza dele como fonte (FREITAS et al., 2021; SARQUIS et al., 2004), possuem uma importante contribuição para tornar o planeta mais sustentável, já que têm a capacidade de enriquecer biomassas que seriam descartadas pela agroindústria, transformando-as em produto de valor agregado, como biocombustíveis. (CONCEIÇÃO et al., 2022; PINTO et al., 2022; DE SALVI, 2011).

Estudos que relacionam L-asparaginase com fungos pertencentes ao filo Basidiomycota, os principais em degradar os resíduos lignocelulósicos do meio ambiente, ainda são poucos. Dois artigos foram encontrados sobre o tema. Eisele et al. (2011) estudaram a L-asparaginase proveniente de *Flammulina velutipes*, e os resultados mostraram que é uma fonte da enzima atrativa para a indústria alimentícia. Chakraborty et al. (2021) estudaram o *Ganoderma australe*, onde foi relatado, pela primeira vez, *G. australe* como fonte potencial de L-asparaginase livre de urease.

1.4 Resíduo agroindustrial como substrato

A indústria agrícola produz muitos resíduos que são desperdiçados, e por conta das políticas de descarbonização que vêm surgindo, biomassas lignocelulósicas como cascas de frutas, cascas de castanhas, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de arroz e feijão, têm ganhado um enorme interesse para a obtenção de produtos de valor agregado, como, por exemplo, biocombustíveis e moléculas bioativas (PINTO et al., 2022; FERNANDES et al., 2020). Além

disso, a aplicabilidade desses resíduos em fungos pode melhorar e aumentar a produção de enzimas, como proteases em farelo de trigo, amilases em casca de mandioca (CRUZ et al., 2011) e xilanases em bagaço de cana e casca de soja (CUNHA, 2016).

A relação carbono/nitrogênio é um dos pilares mais importantes para a produção e atividade das enzimas (ALONSO et al., 2007). Além disso, também interfere diretamente no crescimento e esporulação dos fungos. Uma alta concentração de nitrogênio limita a esporulação (CUTRIM et al., 2006), assim como uma relação carbono nitrogênio elevada como 10:1, pode contribuir para obtenção de proteínas no meio de cultura, um excesso, porém, como 50:1, pode tornar o meio favorável para a produção de metabólitos secundários (CARDOSO, 2018), que são indesejados.

A casca de soja, por sua vez, possui uma relação carbono/nitrogênio de 24,27 (CARDOSO, 2018), se mostrando ser uma ótima fonte de carbono para a produção de enzimas em um meio de cultura, além de ser uma fonte de carbono economicamente viável (CUNHA, 2016).

Acerca da atividade terapêutica, alimentícia e sustentável dos basidiomicetos e da L-asparaginase, este trabalho busca avaliar a presença da enzima nesses fungos e a aplicação deles em resíduos agroindustriais. Além disso, a L-asparaginase usada atualmente no Brasil para tratamento da leucemia linfóide aguda não é nacional e é de origem bacteriana, apresentando algumas desvantagens já citadas anteriormente. Novos trabalhos devem ser feitos para avaliar e fortalecer o uso dessa fonte fúngica em várias áreas, já que na literatura encontram-se poucos estudos correlacionando basidiomicetos e L-asparaginase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a atividade enzimática de L-asparaginase de basidiomicetos em cultivo submerso com a adição de casca de soja como resíduo.

2.2 Objetivo específico

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- *Screening* qualitativo de 9 espécies de basidiomicetos;
- *Screening* qualitativo em placa das espécies selecionadas;
- Cultivo submerso em meio pré-definido;
- Quantificação da L-asparaginase do fermentado líquido;
- Cultivo submerso com resíduo agroindustrial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Preparo dos meios de cultura

- Ágar Batata Dextrose
 - Ágar Batata Dextrose - 39 g
 - Água destilada q.s.p. - 1 L
- Meio indutor de crescimento
 - Ágar Batata Dextrose - 2,4%
 - Extrato de levedura – 1%
 - Água destilada q.s.p - 1 L
- Meio Czapek Dox modificado (GULATI et al. 1997)
 - Glicose – 0,2%
 - L-asparagina ou nitrato de sódio - 1%
 - Fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) - 0,152%
 - Cloreto de potássio (KCl) - 0,152%
 - Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,052%
 - Nitrato de Cobre ($CuNO_3 \cdot 3H_2O$) - 0,001%
 - Sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,001%
 - Sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,001%
 - Agar Bacteriológico Europeu – 2%
 - Água destilada q.s.p. - 1L
 - Vermelho de fenol em etanol (2,5 %) pH 7 - 360 μ L
 - Ajustar pH para 6,2 com HCl ou NaOH 1M
- Caldo Czapek Dox modificado (BASKAR et al. 2012)
 - L-prolina – 1,71%
 - L-asparagina - 1,38%
 - Nitrato de sódio - 1,99%
 - Glicose – 0,65%
 - Fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) - 0,0152%
 - Cloreto de potássio (KCl) - 0,052%
 - Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,052%

- Ajustar pH para 6,5 com HCl ou NaOH 1M
- Cultivo submerso com resíduo agrícola (CARDOSO, 2018)
 - Fosfato de potássio bibásico (K_2HPO_4) - 0,15%
 - Cloreto de potássio (KCl) - 0,052%
 - Sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) - 0,052%
 - Sulfato de ferro ($FeSO_4$) - 0,001%
 - Sulfato de zinco ($ZnSO_4$) - 0,001%
 - Sulfato de cobre ($CuSO_4$) - 0,001%
 - Sacarose – 0,1%
 - Extrato de levedura – 0,2%
 - Resíduo agrícola (casca de soja) - 0,5%
 - L-asparagina – 2,8%
 - L-prolina – 4,0%
 - Caldo batata dextrose – 0,75%

3.2 Preparo do resíduo

A casca de soja foi cedida gentilmente pela Damha Agronegócios, localizada na Fazenda Menina, em Itapura, São Paulo. O resíduo foi autoclavado por 2 horas a 121°C e pressão 1 atm, para a quebra da lignocelulose. Após esse processo, foi lavado em água corrente. Em seguida, a casca de soja foi seca em estufa de circulação de ar a 60°C por 72 horas.

Para o cultivo em estado líquido, as cascas foram moídas com um moedor de café e tamisado para obtenção de um pó fino de 710 μm .

3.3 Reativação dos fungos

Este trabalho foi realizado a partir de cepas de basidiomicetos pertencentes à coleção de fungos da Embrapa Agroenergia, fornecidas gentilmente pelo Dr. Felix Gonçalves Siqueira, pesquisador da Embrapa Agroenergia. Primeiramente, as cepas cedidas foram reativadas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA). Os basidiomicetos inoculados foram repicados posteriormente em meio indutor de crescimento (Ágar Batata Dextrose + 1% de extrato de levedura). Permaneceram em estufa a 28°C por 7 dias. Os fungos foram: FPB 102, FPB 104, FPB 109, FPB 115, FPB 116, FPB 117.2, FPB 117.2, FPB 119 e E2RC.

3.4 Análise qualitativa em placa

A análise qualitativa foi realizada com o meio Ágar Czapek-Dox modificado, conforme descrito por Gulati em 1997 (GULATI et al., 1997). O ágar utilizado contém vermelho de fenol, um indicador de pH. Se alcalino, o meio se apresenta rosa avermelhado, sugerindo a presença de L-asparaginase e se ácido, se apresenta amarelado. Isso se dá porque a produção de L-asparaginase quebra a L-asparagnina em ácido aspártico e amônia, alcalinizando o meio de cultura.

O ensaio foi realizado em triplicata. Um disco do fungo repicado a partir do meio indutor de crescimento foi colocado no centro das placas de Czapek-Dox modificado e das placas controle, incubadas a 28°C e observadas após 48h para a avaliação da coloração. Foram feitos dois tipos de controle negativos, um contendo nitrato de sódio para substituir a L-asparaginase e outro sem vermelho de fenol. Os dois tipos não devem apresentar a zona avermelhada, já que um não terá o indicador de cor e o outro não terá a enzima a ser quebrada.

As placas que apresentaram coloração avermelhada sugerem a presença da enzima, e então o índice da zona dessas placas foi medido por meio da divisão do diâmetro da zona colorida pelo diâmetro da colônia fúngica, como indica a equação abaixo.

$$\text{Índice de zona} = \frac{\text{diâmetro da zona}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

3.5 Cultivo submerso

Um disco de cada fungo que apresentou atividade de L-asparaginase foi transferido para um Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio Czapek-Dox modificado, descrito por Baskar et al. em 2012 (BASKAR et al, 2012) incubado a 28°C, a 120 r.p.m. em agitador rotativo durante 14 dias.

Após esse período, os cultivos foram filtrados utilizando o funil de Büchner acoplado ao kitassato, bomba de vácuo e papel filtro. A biomassa foi separada para a produção do extrato enzimático e o sobrenadante descartado.

3.6 Obtenção do extrato enzimático

A biomassa separada da filtração foi preparada a uma concentração de 0,5 mg/mL com tampão Tris-HCl 50 mM de pH 8,6 pelo método de agitação com barra magnética, nas condições de 700 r.p.m. por 1 h, em temperatura ambiente (MUSSAGY et al., 2022).. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante coletado e reservado para a quantificação de L-asparaginase e teor de proteínas.

3.7 Teor de proteína

A quantificação de proteínas dos extratos enzimáticos foi realizada com o kit Pierce BCA (Thermo Scientific). Essa metodologia é baseada na redução de Cu^{+2} a Cu^{+1} e na detecção colorimétrica do cátion do cobre por ácido bicinconínico (BCA).

Em uma microplaca, 25 μL das amostras foi colocado em triplicata nos poços e 200 μL do reagente foi adicionado a essas amostras. Para o branco, também feito em triplicata, foi adicionado 25 μL do tampão Tris-HCl a 50 mM pH 8,6 substituindo as amostras. A microplaca foi levada para a leitora de microplacas e foi incubada a 37°C por 30 minutos, e posterior leitura a 562 nm.

A curva padrão (Figura 1) foi feita em triplicata em microplaca, com concentrações diferentes dos reagentes do kit Pierce BCA e o tampão Tris-HCl a 50 mM pH de 8,6. A microplaca foi então incubada a 37°C por 30 minutos na leitora.

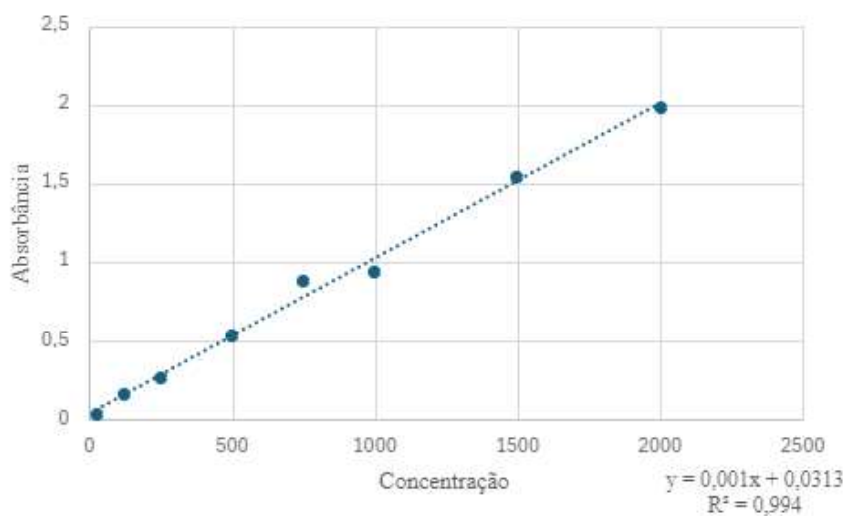


Figura 1 – Curva padrão do teor de proteína de autoria própria.

3.8 Quantificação de L-asparaginase

A quantificação da L-asparaginase foi realizada por meio do método do ácido L-aspartil-beta-hidroxâmico (AHA), segundo Drainas et al. (1977). Conforme a Figura 2, na presença de L-asparaginase, quando o ácido aspártico reage com a hidroxilamina, o beta-hidroxamato-aspártico é formado. Ao adicionar o ácido tricloroacético, ácido clorídrico e cloreto férrico essa reação é parada e o cloreto férrico age com o beta-hidroxamato-aspártico, formando o beta-hidroxamato aspártico férrico, sendo o agente colorimétrico dessa reação. Sendo assim, com essa reação colorimétrica, é possível quantificar a L-asparaginase por meio da leitura a 500 nm no espectrofotômetro.

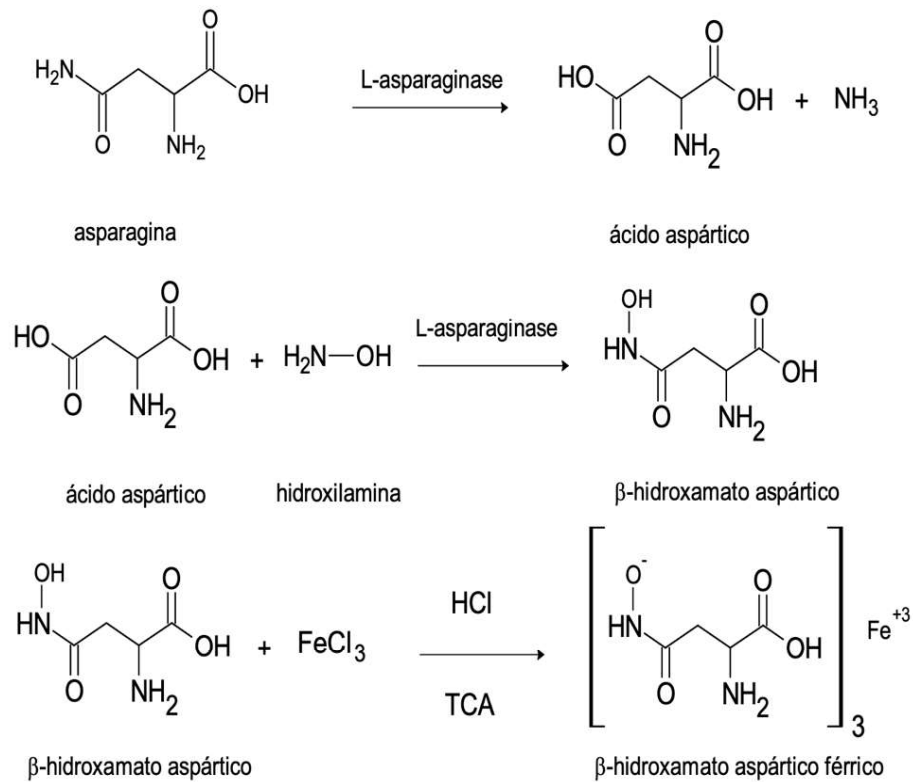


Figura 2 - Mecanismo de reação da asparagina com hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β-hidroxamato aspártico férrico, segundo Freitas (2019).

O cálculo da quantidade de L-asparaginase é feito a partir da equação abaixo.

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

A atividade específica de L-asparaginase em $U/mg_{proteína}$ é calculada a partir da equação abaixo.

$$\frac{U}{mg} ASNase = \frac{\text{Atividade enzimática em } \frac{U}{mL}}{\text{Teor de proteína em } \frac{mg}{mL}}$$

A atividade específica de $U/g_{cél.}$ é calculada a partir da equação abaixo.

$$\frac{U}{g} ASNase = \frac{\text{Atividade enzimática em } \frac{U}{mL}}{\text{Concentração de células em } \frac{g}{mL}}$$

A curva padrão (Figura 3) foi feita em triplicata, com concentrações diferentes da solução padrão de beta-hidroxamato 5 mM/L com o tampão Tris-HCl a 50 mM pH de 8,6 e solução de cloreto férrico, tricloroacético e ácido clorídrico. As misturas de soluções foram transferidas para cubetas e lidas no espectrofotômetro a 500 nm.

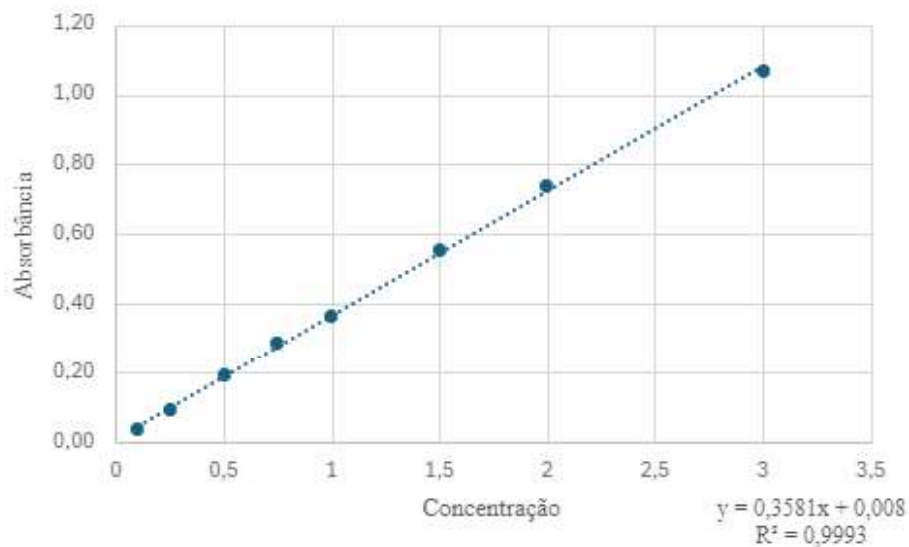


Figura 3 – Curva padrão para quantificação de L-asparaginase de autoria própria.

3.9 Peso seco

Para definir o peso seco das amostras, os fungos que foram filtrados para a quantificação de L-asparaginase foram pesados em balança de umidade. Sabendo-se a umidade presente em cada cultivo, foi possível avaliar o peso seco dos fungos em grama.

3.10 Cultivo em resíduo agroindustrial

O basidiomiceto que apresentou maior quantidade de L-asparaginase e atividade específica, além de um crescimento satisfatório foi selecionado para o cultivo submerso com resíduo agroindustrial. O resíduo a ser utilizado foi a casca de soja.

Em triplicata, 50 mL do meio de cultura foi transferido para o Erlenmeyer de 250 mL, e um disco do fungo escolhido, FPB 104, foi inoculado em cada uma das vidrarias. Os cultivos permaneceram sete dias em shaker a 120 rpm e 28°C.

Após os 14 dias, os cultivos foram retirados do shaker, filtrados com papel filtro e reservados para os testes de quantificação de L-asparaginase e teor de proteína.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise qualitativa em placa

O método qualitativo em placa mostrou a formação da zona avermelhada em 3 dos 9 fungos isolados após 48 horas de incubação em estufa a 28°C (Figura 4). Nenhuma das placas controle apresentou a formação da zona avermelhada, indicando a validação dos controles negativos. Os índices de zona estão apresentados na Tabela 1.

Um estudo feito por Freitas (2021) revelou a zona avermelhada nos controles contendo nitrato de sódio no lugar da asparaginase, e isso pode ser explicado pela possibilidade de os fungos terem transformado esse sal em amônia, elevando o pH e alcalinizando a placa (FREITAS, 2021).

Chakraborty et al. (2021) encontrou um índice de zona de 5.58 após 120 horas, significativamente maior, provavelmente por conta do tempo de incubação. (CHAKRABORTY et al., 2021).

Ashok et al. (2019) obteve o maior valor de índice de zona de 5,8 cm após 96 horas de incubação para *Trichosporon asahii* IBBLA1, enquanto Freitas (2021) teve os melhores resultados na cepa *Aspergillus sp.* DCFS1 em 48 horas de incubação, apresentando um índice de zona de 4,55 cm. Alguns isolados de *Penicillium sp.* também apresentaram resultados próximos ao máximo encontrado. No presente estudo, o fungo com o maior índice de zona foi o FPB 104, com 2,75.

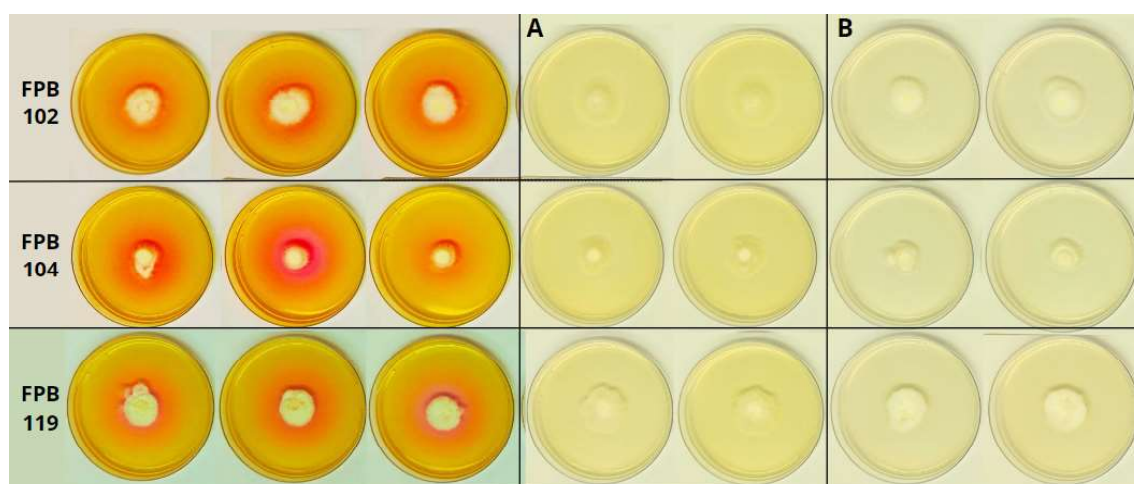


Figura 4 - Triagem qualitativa da produção de L-asparaginase. A imagem está dividida em três linhas, sendo a primeira referente ao FPB 102, a segunda ao FPB 104 e a terceira do FPB 119. Controles com nitrato de sódio substituindo a asparagina (A) e controles que não possuem o indicador vermelho de fenol (B).

Fonte: Imagem de autoria própria.

Tabela 1 – Valores de índice de zona dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB 119 após 48h de incubação a 28°C.

Basidiomiceto	Média do diâmetro da zona (mm)	Média do diâmetro da colônia (mm)	Índice da zona
FPB 102	56,33	26,75	2,11
FPB 104	58,74	21,39	2,75
FPB 119	40,57	23,38	1,74

4.2 Análise quantitativa de L-asparaginase em cultivo submerso

A atividade de L-asparaginase nos três fungos selecionados foi analisada, e os resultados variaram de 0,52 a 0,84 U/g_{cél}, referentes ao FPB 102 e FPB 104, respectivamente. A atividade da enzima também foi medida em U/mL e U/mg_{proteína} (Tabela 2).

Nos estudos de Freitas (2019), *Mucor sp.* DCFTP7 apresentou um resultado de 2,29 U/g_{cél}, consideravelmente maior do que os resultados encontrados no presente estudo. Em 2018, Pádua (2018) encontrou 2,41 U/g_{cél} na cepa de *Diaporthe sp.* URM7793, valor superior ao de Freitas (2021).

Os dois estudos citados foram feitos com fungos do filo Ascomyceto, diferentemente do presente trabalho. Filos diferentes podem interferir no resultado final, o que pode explicar o resultado consideravelmente maior dos dois estudos.

Eisele et al. (2011), quantificou a atividade hidrolisante de L-asparaginase de 16 U/mL, com gene de *Flammulina velutipes* expresso em *Escherichia coli*. Já em 2021, Chakraborty et al. (2021) encontrou uma atividade enzimática de 1,57 U/mL, pelo método de Nessler, o qual quantifica a amônia liberada na reação.

Segundo a Tabela 2, o peso seco variou de 0,45 a 0,62 g. O FPB 102 teve um resultado maior no peso seco, indicando que em 50 mL de meio de cultura, ele se destaca na quantidade de crescimento de células, enquanto o FPB 104 apresentou o menor resultado.

O teor de proteína foi avaliado, e os valores variaram de 2,25 a 2,69 mg/mL (Tabela 2). O fungo FPB 102 apresentou o maior teor de proteínas, e o FPB 104 apresentou o menor. A atividade específica variou de 0,12 a 0,17 U/mg_{proteína}, apesar do alto valor de proteínas, a atividade mostra que há várias outras presentes além da L-asparaginase. Essas proteínas são derivadas do metabolismo secundário, que ocorre após a baixa de fontes de nutrientes primárias (SOUZA, 2009).

Tabela 2 - Quantificação de L-asparaginase, proteína e peso seco dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB119.

Basidiomiceto	L-ASNase			Proteína (mg/mL)	Peso seco (g)
	U/mL	U/mg _{proteína}	U/g _{cél.}		
FPB 102	0,33 ± 0,01	0,12 ± 0,004	0,52 ± 0,02	2,69	0,62 ± 0,04
FPB 104	0,38 ± 0,03	0,17 ± 0,01	0,84 ± 0,06	2,25	0,45 ± 0,07
FPB 119	0,30 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,49 ± 0,06	2,29	0,61 ± 0,08

O teor de proteína foi avaliado, e os valores variaram de 2,25 a 2,69 mg/mL (Tabela 2). O fungo FPB 102 apresentou o maior teor de proteínas, e o FPB 104 apresentou o menor. A atividade específica variou de 0,12 a 0,17 U/mg_{proteína}, apesar do alto valor de proteínas, a atividade mostra que há várias outras presentes além da L-asparaginase. Essas proteínas são derivadas do metabolismo secundário, que ocorre após a baixa de fontes de nutrientes primárias (SOUZA, 2009).

4.3 Triagem do basidiomiceto para cultivo submerso

Para definir o fungo a ser aplicado no resíduo, os três basidiomicetos que apresentaram produção de L-asparaginase foram comparados. Os parâmetros utilizados foram a média do peso de células secas (g) (Figura 5), atividade específica em U/g_{cél.} (Figura 6) e em U/mg_{proteína} (Figura 7).

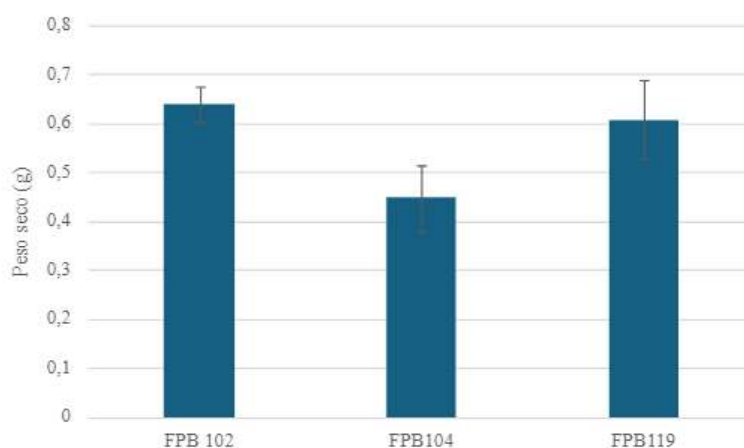


Figura 5 - Média do peso seco (g) dos basidiomicetos FPB 102, FPB 104 e FPB 119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C.

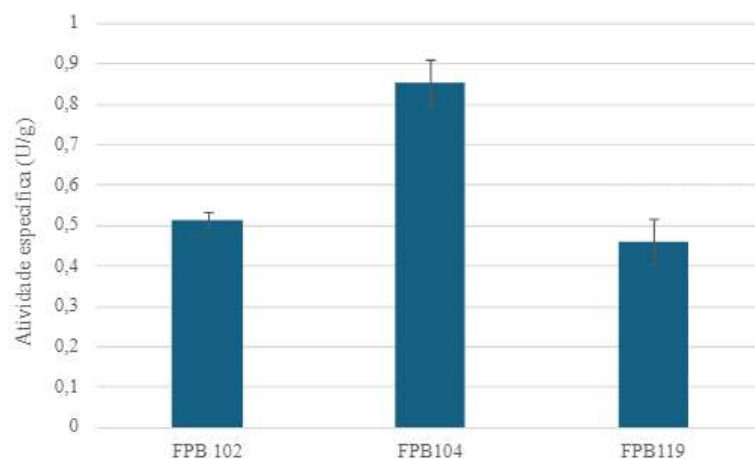


Figura 6 - Média da atividade específica em U/g_{cél.} dos extratos aquosos de FPB 102, FPB 104 e FPB ,119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C.

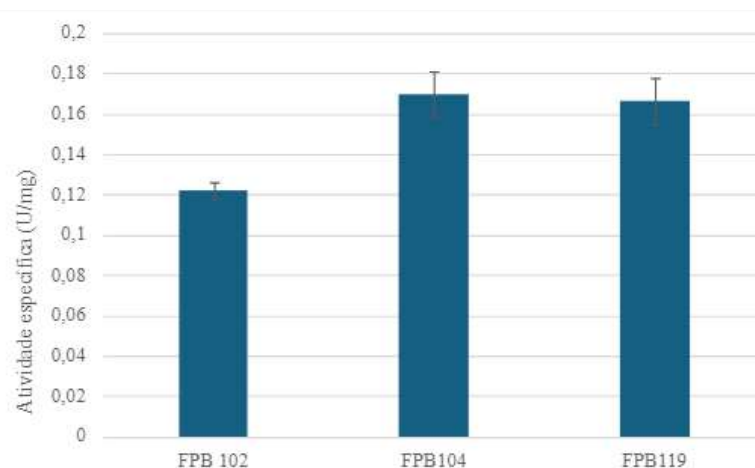


Figura 7 - Média da atividade específica em U/mg_{proteína} dos extratos aquosos de FPB 102, FPB 104 e FPB 119 cultivados em meio Czapek Dox modificado por 14 dias a 28 °C.

Em relação ao peso seco (Figura 5), o FPB 102 obteve o maior resultado, seguido do FPB 119, e o FPB 104 por último. O fungo FPB 104 apresentou a maior atividade específica em U/g_{cél.}, seguido pelo FPB 102 e FPB 119, como demonstra a Figura 6. Na atividade específica de U/mg_{proteína} mostrada na Figura 7, o FPB 104 obteve o maior resultado, enquanto o FPB 102 apresentou o menor. O basidiomiceto FPB 104 se destacou nos resultados de atividade específica, apesar de apresentar baixo peso seco comparado às outras espécies.

4.4 Cultivo submerso em resíduo agroindustrial

Os meios utilizados contêm como fonte de nitrogênio somente a L-asparagina e a L-prolina. A asparagina possui dois nitrogênios em sua composição (C₄H₈N₂O₃), enquanto a

prolina possui um ($C_5H_9NO_2$). Em cada meio a relação carbono/nitrogênio se modifica por conta da quantidade dos aminoácidos e de fontes de carbono em cada meio. No Czapek dox modificado, a alteração para o meio tradicional é justamente a adição de L-asparagina e L-prolina, que além de quantificar a produção da enzima L-asparaginase, tem a função de obter essa relação carbono/nitrogênio. A adição da casca de soja no meio de cultivo submerso tem o objetivo de adicionar mais uma fonte de carbono para o crescimento fúngico.

Os meios de cultura utilizados nos outros testes contêm outras fontes de carbono, como a glicose, o extrato de levedura e o caldo batata dextrose. O meio utilizado para cultivo submerso com resíduo agrícola contém a casca de soja como fonte adicional de carbono, segundo Cardoso (2018), a casca de soja possui o valor de 24,27 dessa relação. A relação carbono/nitrogênio nesse meio foi de 5,15.

Tabela 3 – Quantificação de L-asparaginase e proteína do basidiomiceto FPB 104.

Basidiomiceto	L-ASNase		Proteína (mg/mL)
	U/mL	U/mg _{proteína}	
FPB 104	0,14 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,447

Como indicado na Tabela 3, a atividade específica em U/mg_{proteína} foi de 0,30 U/mg_{proteína}, quase o dobro do encontrado anteriormente. A casca de soja teve um papel importante nisso, e a relação carbono/nitrogênio possivelmente reduziu a produção de metabólitos secundários. Estes resultados demonstram o potencial do uso de casca de soja como fonte de carbono para a produção de L-asparaginase em basidiomicetos.

O peso seco, assim como a atividade específica em U/g_{cél.} não foram mensurados, pois não foi possível separar as células fúngicas da biomassa de casca de soja, já que o fungo se liga diretamente a ela.

Para a produção de L-asparaginase em cultivo submerso, Cardoso (2018) obteve melhores resultados utilizando o farelo de trigo (CARDOSO, 2018). Em 2016, Pereira encontrou que a casca de soja é um ótimo substrato na produção de xilanase, mananase, carboximetilcelulase e β -glicosidase, sendo as atividades mais expressivas para xilanase, 13,4 U/mL (PEREIRA, 2016).

5 CONCLUSÃO

Em relação à quantificação de L-asparaginase nos basidiomicetos avaliados, o FPB 104 expressou a enzima em maior quantidade que os outros fungos avaliados, e quando foi cultivado em casca de soja, se observou um aumento na atividade específica em $\text{U/mg}_{\text{proteína}}$ para a enzima de interesse. O resultado foi de $0,17 \text{ U/mg}_{\text{proteína}}$ para o cultivo submerso em meio Czapek Dox modificado e $0,30 \text{ U/mg}_{\text{proteína}}$ para o cultivo submerso com casca de soja.

Os estudos encontrados, que relacionam basidiomicetos à produção de L-asparaginase, não aplicam resíduo agrícola. Muitas pesquisas ainda são necessárias para avaliar se essa fonte é realmente viável, em questões econômicas, farmacológicas, biológicas e produtivas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, Máira Cortellini. Fungos Basidiomicetos. **Revista Paidéi@, UNIMES VIRTUAL**, Volume 2, número 4, dez. 2010. Disponível em: <<http://revistapaideia.unimesvirtual.com.br/>>. Acesso em: 05 de jan. 2024.

ABREU, Gabriella Moraes; DE SOUSA, Sarah Campos; GOMES, Eriston Vieira. Leucemia Linfóide e Mieloide: Uma breve revisão narrativa/Lymphoid and Myeloid Leukemia: A brief narrative review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 80666-80681, 2021.

ALONSO, Sandra Kunieda de et al. Isolamento e seleção de fungos causadores da podridão-branca da madeira em florestas de Eucalyptus spp. com potencial de degradação de cepas e raízes. **Revista Árvore**, v. 31, p. 145-155, 2007.

ARDILA, Jorge Andrés Rueda. Otimização da produção da enzima anti-leucêmica L-asparaginase por *Penicillium* sp. **acervo.ufvjm.edu.br**, 2017.

ASHOK, Anup et al. Microbes producing L-asparaginase free of glutaminase and urease isolated from extreme locations of Antarctic soil and moss. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1423, 2019.

BARBA, Pere et al. Asparaginase use for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, n. 5, p. 225-231, 2017.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Application of latin square design for the evaluation and screening of supplementary nitrogen source for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Indian Journal of Science and Technology**, p. 50-54, 2009.

BEDERSKA-ŁOJEWSKA, D; ŚWIĄTKIEWICZ, S.; MUSZYŃSKA, Bożena. The use of Basidiomycota mushrooms in poultry nutrition—a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 230, p. 59-69, 2017.

CARDOSO, Samuel Leite. Avaliação da produção de L-asparaginase por fungo isolado do solo do Cerrado brasileiro em meio contendo resíduo agroindustrial. 2018.

CHAKRABORTY, Meghna; SHIVAKUMAR, Srividya. Bioprospecting of the agaricomycete *Ganoderma australe* GPC191 as novel source for L-asparaginase production. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6192, 2021.

CONCEIÇÃO, Aparecido Almeida et al. Nutraceutical Enrichment of Animal Feed by Filamentous Fungi Fermentation. **Fermentation**, v. 8, n. 8, p. 402, 2022.

CRUZ, EA da et al. Alpha-amylase production by *Aspergillus niger* in cassava peels waste. 2011.

CUNHA, Luana Lima da. Purificação e caracterização bioquímica e biofísica de uma xilanase de *Aspergillus foetidus*. 2016.

CUTRIM, Flávia de Aquino et al. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 85-88, 2006.

DE SALVI, Marina Bianchini. Fungos basidiomicetos em biorremediação. **Curso de capacitação de Monitores e Educadores. Instituto de**, 2011.

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.

EISELE, Nadine et al. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3316-3321, 2011.

FERNANDES, Joana MC et al. Pretreatment of grape stalks by fungi: effect on bioactive compounds, fiber composition, saccharification kinetics and monosaccharides ratio. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5900, 2020.

FREITAS, Marcela et al. Filamentous fungi producing L-asparaginase with low glutaminase activity isolated from Brazilian Savanna soil. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1268, 2021.

FREITAS, Marcela Medeiros de. Produção e purificação de L-Asparaginase por fungos filamentosos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro. 2024.

GALÚCIO, Vanessa Costa Alves et al. Aproveitamento de resíduos de frutas da Amazônia no processo de bioconversão por fungos basidiomicetos para a produção de ração animal. 2018.

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

KIRK, Paul. et al. **Dictionary of the fungi**. 1996.

Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) | Pfizer Brasil. Disponível em: <<https://www.pfizer.com.br/noticias/ultimas-noticias/leucemia-linfoblastica-aguda-lla#:~:text=O%20que%20pode%20causar%20a>>. Acesso em: 20 jan. 2024.

MUSSAGY, Cassamo U. et al. An eco-friendly approach for the recovery of astaxanthin and β -carotene from *Phaffia rhodozyma* biomass using bio-based solvents. **Bioresource Technology**, v. 345, p. 126555, 2022.

NERI, Valéria Cristina de Carvalho et al. **Acrilamida em alimentos: formação endógena e riscos à saúde**. 2004. Tese de Doutorado.

OLIVEIRA, Maycon Douglas et al. L-asparaginase: Uso terapêutico e aplicação na indústria de alimentos. 2020.

PÁDUA, Ana Patrícia Sousa Lopes de. **Diversidade e potencial para produção de L-asparaginase de fungos endofíticos de Myracrodruon urundeuva Allemão (aroeira do sertão)**. 2018. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

PEDROSA, Francisco; LINS, Mecneide. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 2, p. 63-68, 2002.

PEREIRA, Catarina Bernardes. Avaliação da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por fungos isolados do cerrado, costa marinha brasileira e da Antártica, utilizando casca de soja como substrato. 2016.

PINTO, Paula A. et al. Solid-State Fermentation of Chestnut Shells and Effect of Explanatory Variables in Predictive Saccharification Models. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 5, p. 2572, 2022.

SAEED, H. et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* L-asparaginase in *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017. ISSN 0141-8130

SARQUIS, Maria Inez de Moura et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 489-492, 2004.

SOUZA, Aline Francisca; ROSADO, Fábio Rogério. Utilização de fungos basidiomicetes em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em agronegócio e meio ambiente**, v. 2, n. 1, p. 121-139, 2009.

VAN BEURDEN-TAN, Chrissy HY et al. Blinatumomabe em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda B em primeira recidiva de alto risco: um estudo de custo-efetividade. **JBES: Brazilian Journal of Health Economics/Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 14, n. 1, 2022.

WAN, Caixia; LI, Yebo. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology**

advances, v. 30, n. 6, p. 1447-1457, 2012.

WEBER, Douglas Mroginski et al. LEUCEMIA MIELOIDE E LINFOIDE. **Saber Científico (1982-792X)**, v. 9, n. 2, p. 43-61, 2021.

XU, F.; ORUNA-CONCHA, M.; ELMORE, J.. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chem.** 2016 Nov 1;210:163–71.