UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

Produção e caracterização de L-asparaginase de leveduras isoladas de pólen coletados de *Melipona* spp. da Região Amazônica

SHEYLLA ARAUJO DA SILVA

Recife – PE
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

SHEYLLA ARAUJO DA SILVA

Produção e caracterização de L-asparaginase de leveduras isoladas de pólen coletados de *Melipona* spp. da Região Amazônica

Trabalho de Tese apresentado ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMFA/UFRPE, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de doutor.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE/Brasil)
Co-Orientador: Prof. Dr. José Antônio Couto Teixeira (UMINHO/Portugal)
Co-Orientadora: Prof.ª Dr.ª Keila Aparecida Moreira (UFRPE/UAG/Brasil)

Recife – PE
2015

Parecer da comissão examinadora da defesa de tese, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, de:

SHEYLLA ARAUJO DA SILVA

Produção e caracterização de L-asparaginase de leveduras isoladas de pólen coletados de *Melipona* spp. da Região Amazônica

Área de concentração: Morfofisiologia Animal

Recife, 27 de fevereiro de 2015

Comissão examinadora composta pelos seguintes professores:

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Presidente)

Prof. Dra Polyanna Nunes Herculano
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Membro interno)

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE
(Membro interno)

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
(Membro externo)

Prof. Dra. Galba Maria de Campos Takaki
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP
(Membro externo)

A toda minha família e amigos pelo apoio dado nos momentos mais difíceis. Mas principalmente a todas as pessoas que um dia pensaram em desistir e mesmo com tudo dando errado, ergam a cabeça e lutem pelos seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por amparar-me nos momentos de fraqueza, por acalmar meu coração nos momentos de desespero e por me fortalecer para enfrentar todos os obstáculos que encontrei ao longo deste trabalho. Obrigada Deus por me fazer compreender o real significado da palavra “pesquisa” e me mostrar que não temos o controle de nada.

A minha querida família sempre apoiando e ajudando mesmo sem compreender direito o que se passava.

À minha orientadora Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela oportunidade, incentivo e principalmente por acreditar no meu potencial.

À Prof. Dra. Keila Aparecida Moreira pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. José Antônio Couto Teixeira, sempre disponível. Grata pela oportunidade e orientação.

À Prof.Dra. Tatiana Souza Porto, por todo o apoio e paciência no auge do desespero, sempre com uma palavra de força. Não esquecerei!

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biociências Animal (PPGBA), pela amizade e conhecimentos transmitidos durante o curso.

À Edna Cherias, secretária do PPGBA, pela atenção, paciência e todo o apoio.

Às minhas amigas: Patyanne Correia, Priscila Sales, Carol Silva, Alana Queiroz e Marcela Lemos por todas as palavras, apoios, paciência e principalmente pelos ombros e pela força incondicional. Sem esquecer, do meu amigo e “pé de coelho” Thiago Pajeu e toda a turma do laboratório que seguraram a barra nas horas mais complicadas.

Aos professores Romero Brandão, Polyanna Herculano, Camila Porto e Raquel Pedrosa por todo o trabalho e incentivo.

A todos os amigos encontrados nessa trajetória: a turma da Universidade do Minho (Portugal), principalmente meus eternos amigos do Laboratório de Fermentações (LF) e do Laboratório de Biotecnologia e Bioativos (LABTECBIO). Obrigada pela amizade, pela possibilidade de aprender um pouco mais com cada um, pela atenção e pelos inúmeros e inesquecíveis momentos no laboratório.

Ao meu noivo Jorge Santos, por todo o incentivo, mas principalmente pela paciência e compreensão diante a minha falta de tempo e mau humor.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

À Coordenadção de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a bolsa PDSE (Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior).

E por fim, todos aqueles que acreditaram no meu potencial, pois estes, direta ou indiretamente contribuíram para que eu viesse a conquistar mais essa etapa, meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADA!

RESUMO

Devido a biodiversidade da Região Amazônica e ao potencial enzimático das leveduras, o presente trabalho visou O presente trabalho buscou selecionar uma levedura produtora de L-asparaginase, identificar e avaliar os parâmetros de produção. Além de analisar a influência isolada da glicose na produção de biomassa e de L-asparaginase, caracterizar bioquimicamente a atividade enzimática, realizar pré-purificação e avaliar o grau de pureza da enzima e seu potencial como agente antiacrilamida Foram utilizadas 21 linhagens de leveduras e a levedura com maior atividade de L-asparaginase foi identificada por sequenciamento de DNA utilizando os primers NL-1 e NL-4 *e* utilizada para a avaliação dos parâmetros de produção através de dois planejamentos estatísticos, Plackett-Burman (PB) e Central Composto (CCD). A glicose foi avaliada variando a concentração no meio (0,5%, 1,0% e 5,0%) e através de planejamento fatorial 2^2 tendo como variáveis glicose (%) e aeração (%). A pré-purificação foi realizada com sulfato de amônia avaliada em SDS-PAGE 12,5%. O Teste como agente aintiacrilamida foi mediante a inibição da formação de poliacrilamida de uma solução de acrilamida a 30%. A levedura selecionada foi identificada como *Tilletiopsis minor* e as variáveis significativas apresentadas pelo PB foram L-asparagina, extrato de levedura e $MgSO_4$, apresentando 1975,67 $U.mL^{-1}$ de L-aspraginase através do CCD com 25 $g.L^{-1}$ de L-asparagina, 40 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 0,35 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$ com meio ajustado para pH 5,0, a 28°C, durante 72 horas. Os resultados obtidos sobre a influência isolada da glicose revelaram que altos níveis de glicose diminuem a produção de L-asparaginase obtendo atividade máxima com glicose a 1,0% e aeração de 40%. O pH e temperatura ótima da enzima foi 7,0 e 50°C, respectivamente, sendo o Na^+ o íon com maior efeito inibitório na atividade de L-asparaginase. A L-asparaginase produzida apresentou um fator de purificação de 7,8 na fração de 20-40% de sulfato de amônio e inibiu 100% a formação de poliacrilamida. O perfil eletroforético demonstrou uma banda mais acentuada de 80,5kDa. Os resultados obtidos evidenciam a *Tilletiopsis minor* estudada como nova fonte produtora de L-asparaginase.com potencial para aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-Chaves: L-asparaginase; Produção; Levedura; *Tilletiopsis minor*; Acrilamida; Amazônia.

ABSTRACT

Because biodiversity of the Amazon region and the enzyme potential of yeasts, this study aimed to select a producing yeast L-asparaginase, identify and assess the production parameters. In addition to analyzing the isolated influence of glucose in the biomass and L-asparaginase, biochemically characterize the enzymatic activity, perform pre-purification and to assess the degree of purity of the enzyme and its potential as an agent antiacrilamida. There were used 21 strains of yeasts and yeast with increased L-asparaginase activity was identified by DNA sequencing using NL-1 and NL-4 primers and used for evaluation of production parameters using two statistical planning, Plackett-Burman (PB) and Composite Central (CCD) . Glucose was evaluated by varying the concentration in the medium (0.5%, 1.0% and 5.0%) and through a factorial design 2^2 having as variables glucose (%) and aeration (%). A pre- purification was performed with ammonium sulfate evaluated on SDS-PAGE 12.5%. The test agent was aintiacrilamida as by inhibiting the formation of a polyacrylamide of 30% acrylamide solution. The selected yeast was identified as *Tilletiopsis minor* and the significant variables were presented by PB L- asparagine, yeast extract and $MgSO_4$, presenting 1975.67 $U.mL^{-1}$ through L- aspraginase CCD 25 $g.L^{-1}$ of L-asparagine, 40 $g.L^{-1}$ yeast extract, 0.35 $g.L^{-1}$ $MgSO_4$ with medium adjusted to pH 5.0 at 28 °C for 72 hours. The results on the influence of glucose alone revealed that high levels of glucose decrease the production of L-asparaginase obtained with maximal activity at 1.0% glucose and aeration of 40%. The pH and optimum temperature of the enzyme was 7.0 and 50 °C respectively, and the Na^+ ion with higher inhibitory effect on the L-asparaginase activity. The L-asparaginase produced showed a 7.8 purification factor in the fraction of 20-40% ammonium sulfate and 100% inhibited the formation of polyacrylamide . The electrophoretic profile showed a sharper band 80.5 kDa . The results show the *Tilletiopsis minor* studied as new producer of L-asparaginase source with potential for applications in the food industry.

Keywords: L- asparaginase, Production, Yeast, *Tilletiopsis minor*, Acrylamide Amazon.

SUMÁRIO

RESUMO..... VII
ABSTRACT..... VIII
LISTA DE FIGURAS..... XII
LISTA DE TABELAS..... XIV
1 Introdução..... 16
2 Revisão da Literatura..... 18
2.1 Região Amazônica e seu potencial..... 18
2.2 Abelhas *Meliponas*..... 18
2.3 Leveduras do gênero *Tilletiopsis*..... 20
2.4 Descoberta da L-asparaginase..... 22
2.5 L-asparaginase..... 23
2.6 Fontes produtoras de L-asparaginase..... 30
2.7 Mecanismo de ação da L-asparaginase como agente antineoplásico.... 30
2.8 Câncer e L-asparaginase..... 32
2.9 Utilização da L-asparaginase como antineoplásico..... 33
2.10 Medicamentos a base e L-asparaginase..... 35
2.11 Leucemia linfoblástica aguda e L-asparaginase..... 37
2.12 L-asparaginase como aditivo alimentar..... 38
2.13 Mecanismo de ação da L-asparaginase como agente antiacrilamida..... 41
3 Objetivos..... 43
3.1 Geral..... 43
3.2 Especfico..... 43
Considerações Finais …… 44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIA

CAPÍTULO I

***Tilletiopsis minor* nativa isolada de pólen coletado de *Melipona* spp. da Região Amazônica, Brasil como nova produtora de L-asparaginase** 54
RESUMO..... 54

I.1 Introdução..... 55

I.2 Materiais e métodos..... 56

I.2.1 Micro-organismos e Manutenção..... 56

I.2.2 Condições de cultivo e seleção do micro-organismo..... 57

I.2.3 Identificação taxonômica por sequenciamento genético 57

I.2.4 Dosagem de Proteína..... 57

I.2.5 Atividade de L-asparaginase..... 58

I.2.6 Planejamento experimental Plackett-Burman..... 58

I.2.7 Planejamento Central Composto 59

I.3 Resultados e discussão..... 60

I.3.1 Seleção da melhor levedura produtora de L-asparaginase..... 60

I.3.2 Influência das variáveis na produção de L-asparaginase utilizando Plackett-Burmam..... 61

I.3.3 Otimização do meio de cultura para produção de L-asparaginase através do Planejamento Central Composto Otimização do meio de cultura para produção de L-asparaginase através do Planejamento Central Composto..... 64

I.4 Conclusão..... 67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO II

Tilletiopsis minor **produtra de L-asparaginase termoestável com potencial antiacrilamida** 72

RESUMO..... 72

II.1 Introdução..... 73

II.2 Materiais e métodos..... 74

II.2.1 Micro-organismo e manutenção..... 74

II.2.2 Produção de L-asparaginase..... 74

II.2.3 Avaliação do efeito da glicose sobre a produção de L-asparaginase e a biomassa..... 75
II.2.4 Dosagem de Proteína..... 76
II.2.5 Determinação da atividade de L-asparaginase..... 76
II.2.6 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e a estabilidade da enzima L-asparaginase..... 76
II.2.7 Efeito de íons sobre a atividade de L-asparaginase..... 77
II.2.8 Precipitação do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio..... 77
II.2.9 Perfil eletroforético..... 77
II.2.10 Teste antiacrilamida..... 78
II.3 3 Resultados e discussão..... 78
II.3.1 Avaliação dos efeitos da glicose sobre a biomassa e a produção de L-asparaginase..... 78
II.3.2 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da L-asparaginase..... 84
II.3.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade de L-asparaginase..... 88
II.3.4 Pré-prufication de L-asparaginase..... 89
II.3.5 Perfil eletroforético do extrato enzimático pré-purificado..... 90
II.3.6 Efeito da L-asparaginase na formação de poliacrilamida..... 91
II.4 Conclusão..... 92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - (a) Aparelho bucal de Melipona, com os dois palpômeros distais pequenos, cilíndricos, semelhantes aos dos palpos maxilares e, em geral, em ângulo reto com os palpômeros proximais. (b) Detalhe da perna posterior de Melipona, com corbícula (cesta de pólen) na superfície externa da tíbia posterior..... 19

Figura 2 - (a) Colônia de Tilletiopsis minor crescida em agar Saboroud, (b) Fotomicrográfia do Tilletiopsis minor (a) Colônia de Tilletiopsis minor crescida em agar Saboroud, (b) Fotomicrográfia do Tilletiopsis minor..... 21

Figura 3 - Hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia 31

Figura 4 - Controle normal (a) e alterado (b) na produção de células. (a1) representa uma monocamada de células normais inibidas por contato. (b1) demonstra monocamada de células cancerosas não-inibidas 33

Figura 5 - Formação de glicidamida a partir da acrilamida 41

Figura 6 - Formação de acrilamida a partir da reação entre o aminoácido asparagina com açucares redutores mediante aquecimento..... 42

CAPÍTULO I

Figura 1 - Níveis de atividade de L-asparaginase (▬) e de proteina total (▬) apresentados pelas leveduras isoladas de pólen coletados de abelhas da Região Amazônica..... 61

Figura 2 - Efeito das variáveis analisadas pelo Plackett-Burman, sobre a atividade de L-asparaginase produzida por *Tilletiopsis minor.*..... 62

Figura 3 - Representação tridimensional dos ensaios em função das

concentrações de extrato de levedura e L-asparagina para a produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*..... 66

CAPÍTULO II

Figura 1 - Efeito da concentração inicial de glicose, sobre a produção de biomassa (a) e L-asparaginase (b) do *T. monir*. Glicose 0,5% (●), glicose 1,0% (□) e glicose 5,0% (▲)..... 80

Figura 2 - Comportamento do *T. minor* na produção de L-asparaginase com adição extra de glicose (■) ao meio com 48 horas de cultivo. (□) meio sem adição extrata de glicose..... 81

Figura 3 - Parâmetros de produção para L-asparaginase de *Tilletiopsis monir* e a maior atividade encontrada pelo planejamento fatorial 2^2..... 84

Figura 4 - Efeito do pH sobre a atividade de L-asparaginase. (a) pH ótimo e (b) estabilidade da L-asparaginase ao pH..... 86

Figura 5 - Efeito da temperatura sobre a atividade de L-asparaginase. (a) temperatura ótima e (b) estabilidade da L-asparaginase a temperatura..... 88

Figura 6 - Perfil eletroforético por SDS-PAGE do extrato enzimático bruto e pré-prurificado com sulfato de amônia. Padrão (linha 1 e 8), extrato bruto (linha 2), concentrações 0-20 (linha 3), 20-40 (linha 4), 40-60 (linha 5), 60-80 (linha 6) e 80-100 (linha 7)..... 91

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Espécies aceitas para o gênero *Tilletiopsis.*..... 20
Tabela 2 - Condições de cultivo para a produção de L-asparaginase a partir de várias fontes microbiana..... 25
Tabela 3 - Medicamentos a base de L-asparaginase para tratamentos clínicos..... 36
Tabela 4 - Etapas para o tratamento de LLA seguindo o protocolo GBTLI-99 utilizando L-asparaginase..... 38

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Nível de cada variável analisada pelo planejamento experimental Plackett-Burman para avaliar a produção de L-asparaginase..... 59
Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento central composto para produção de L-asparaginase..... 60
Tabela 3 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman utilizado para avaliar a produção de L-asparaginase..... 63
Tabela 4 - Matriz do planejamento Central Composto para atividade de L-asparaginase como variável resposta..... 65
Tabela 5 - Análise de variância para as variáveis significativas das condições de produção de L-asparaginase pela levedura selvagem *Tilletiopsis minor*..... 65

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento

fatorial..... 75

Tabela 2 - Planejamento fatorial variando a aeração e a concetração de glicose na produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor* ao longo do tempo..... 82

Tabela 3 - Valores referentes a gráficos de Pareto gerados para cada 24 horas de cultivo durante 120 horas do planejamento fatorial 2^2..... 84

Tabela 4 - Efeito de íons sobre a atividade de L-asparaginase..... 89

Tabela 5 - Precipitação enzimática com sulfato de amônia..... 90

Tabela 6 - Inibição da polimerização da acrilamida diante diferentes níveis de enzima..... 92

1 Introdução

A região amazônica apresenta uma grande riqueza de espécies e diversidade de meliponíneos, em especial as do gênero *Melipona*, onde se encontram as abelhas de maior porte e produção de mel (SILVEIRA et al., 2002).

A levedura utilizada nesse trabalho foi isolada a partir de polén coletados de *Melipona* spp. da Região Amazônica.

As leveduras são fungos predominantemente unicelulares, de forma esférica, elíptica ou filamentosa, em que a própria célula cumpre as funções vegetativas e reprodutivas. As estruturas microscópicas mais comuns são as gêmulas, também denominadas de blastoconídios com formas arredondadas ou ovaladas. Que por sua vez, são brotos ou células-filhas que podem desprender ou não, da célula matriz, formando cadeias denominada de pseudo-hifa, cujo conjunto é o pseudo-micélio (TORTORA et al., 2012). Esses fungos fazem parte dos mais importantes sistemas de expressão eucariótica disponíveis para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. (BON et al., 2008; CAMPBELL; REECE, 2010.

Entre as enzimas biotecológicas destacamos a L-asparaginase (EC 3.5.1.1) que está entre as enzimas terapêuticas mais estudadas mundialmente sendo considerada um eficaz agente contra a leucemia linfoblástica aguda (LLA). No entanto, a eficácia do medicamento a base desta enzima para o tratamento de outras doenças hematológicas malignas, particularmente a leucemia mielóide aguda, não está bem estabelecida (EMADI et al., 2014; MAKKY et al., 2014).

A capacidade que a enzima L-asparaginase tem de hidrolisar a L-asparagina no plasma sanguíneo em ácido aspártico e amônia, é o que à torna potente para o tratamento da leucemia. As células leucêmicas são incapazes de sintetizar L-asparagina, e a privação desse aminoácido causa um colapso metabólico acarretando a morte da célula (CHOHAN; RASHID, 2013). Ou seja, o mecanismo de ação da L-asparaginase está relacionado com a redução rápida e prolongada do aminoácido L-asparagina no plasma, que por sua vez, é de suma importância para a nutrição e proliferação das células leucêmicas (EMADI et al., 2014).

A L-asparaginase é oriunda de vários organismos como plantas, alguns animais, fungos filamentosos, leveduras, bactérias e arqueobactérias. A L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são consideradas as

melhores para aplicação clínica, por exibirem elevada atividade especifica para asparagina e um efeito secundário relativamente baixo para glutamina (ZUO et al., 2014).

Além do poder antitumoral, nos últimos anos, a L-asparaginase apresentou potencial como aditivo alimentar no processamento de alguns alimentos, auxiliando o setor industrial. A L-asparagina e os açúcares redutores presente na matéria-prima de alguns alimentos, quando submetidos a altas temperaturas formando um potente carcinógeno denominado acrilamida. Este tipo de reação geralmente acontece em alimentos à base de amido. A L-asparaginase de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* e *Bacillus subtilis* B11-06 são relatadas como capazes de reduzir a formação de acrilamida em alimentos ricos em amido, através da hidrólise do aminoácido L-asparagina (ZUO et al., 2014; AYVAS; RODRIGUEZ-SAONA, 2015).

A variedade de aplicações das enzimas nos mais diversos setores industriais e o grande desenvolvimento de uso terapêutico, deve-se à identificação, purificação e caracterização de enzimas e metabólitos relevantes, além do processo de produção em larga escala, que possibilitam um aumento na produção enzimática e custos mais baixos (BON et al., 2008).

Considerando que muitas fontes de L-asparaginases não são capazes de serem utilizadas como quimioterápicos e aditivos alimentares contra a formação de acrilamida devidos ao desenvolvimento de hipersensibilidade, o presente trabalho buscou encontrar uma nova fonte de L-asparaginase para o enriquecimento dos recursos terapêuticos e alimentares utilizando leveduras nativas isoladas de pólens coletados de abelhas silvestres da Região Amazônica.

2 Revisão da Literatura

2.1 Região Amazônica e seu potencial

A região Amazônica ostenta o título de maior floresta tropical contínua do planeta, com o Brasil possuindo a segunda maior reserva de floresta do mundo, sendo duas vezes maior que a do Canadá, terceiro colocado, e três vezes maior que a do Congo, segundo maior em reservas de florestas tropicais (MACQUEEN, 2004).

A região Amazônica possui 20% de toda a água doce do planeta, 20 mil km de vias navegáveis, 68 mil MW de potencial hidroenergético equivalente a 53% do total brasileiro, 350 milhões de hectares de florestas virgens, um exuberante potencial pesqueiro com mais de três mil espécies e agrícola com 25 milhões de hectares de várzeas, além de uma extraordinária biodiversidade e a maior reserva mineral do planeta (Tavares, 2011).

A produção científica sobre o conhecimento dos vários aspectos da biodiversidade da Amazônia brasileira vem crescendo de maneira exponencial. Na mesma direção, observa-se que as instituições públicas e privadas vêm experimentando, por meio de uma estratégia de parcerias, uma nova fase de articulação institucional. Essas ações são movidas pelo objetivo comum da necessidade de um avanço rápido do conhecimento científico sobre a composição e a ecologia das espécies amazônicas (Vieira et al., 2005).

2.2 Abelhas *Meliponas*

O surgimento e a proliferação das abelhas estão relacionados com o aparecimento das Angiospermas a milhares de anos. As relações entre visitantes florais e Angiospermas estão baseadas numa troca de recompensas onde o pólen e o néctar são os principais recursos oferecidos pelas flores. Destes, o pólen é o alimento essencial à vida das abelhas por ser a única fonte de proteína para as larvas e operárias jovens, fornecendo ainda lipídios, vitaminas e sais minerais (Oliveira et al., 2009).

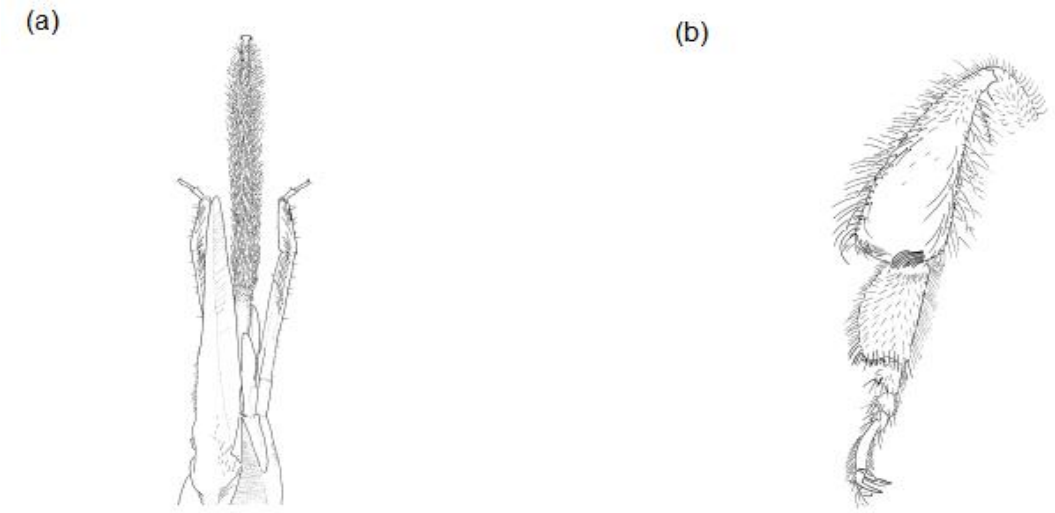
As abelhas da subfamília *Meliponinae* (Hymenoptera, Apidae) conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, destacam-se dentre os principais grupos de polinizadores, por constituírem o maior componente de biomassa de insetos que se

alimentam de pólen e néctar em muitas áreas tropicais. A meliponicultura, ou criação de abelhas indígenas sem ferrão, tem se mostrado como uma excelente alternativa para a geração de renda entre as populações interioranas da Amazônia, podendo enquadrar-se perfeitamente nos preceitos de uso sustentável dos recursos naturais, sem necessidade de remoção da cobertura vegetal nativa. As *Meliponas* podem ser manejadas de modo racional para a produção de mel, pólen e para o incremento e a manutenção da polinização de espécies silvestres e cultivadas (Venturieri, 2005; Oliveira et al., 2009).

Várias das espécies de *Melipona* têm se mostrado dependentes dos ambientes florestais, não sendo encontradas em ambientes abertos (nativos ou antropogênicos), a não ser nas margens de matas. As *Meliponas* constitui o gênero de *Meliponina* com maior número de espécies. Ocorre em toda a região neotropical, sendo mais diversificado na bacia amazônica. Suas espécies foram revistas pela última vez por Schwarz em 1932 (Silveira et al., 2002).

A figura representa a morfologia de *Melipona* referente aos palpos labiais com os dois palpômeros proximais achatados e alongados e o aparato para transporte de pólen de uma fêmea.

Figura 1 - (a) Aparelho bucal de Melipona, com os dois palpômeros distais pequenos, cilíndricos, semelhantes aos dos palpos maxilares e, em geral, em ângulo reto com os palpômeros proximais. (b) Detalhe da perna posterior de Melipona, com corbícula (cesta de pólen) na superfície externa da tíbia posterior



.Fonte: Silveira et al. (2002).

2.3 Leveduras do gênero *Tilletiopsis*

O processo fermentativo das leveduras é amplamente dominado o que permite o fácil *scale up* de produção para níveis comerciais. As leveduras têm elevadas taxas de crescimento e são capazes de realizar várias modificações pós-traducionais (CAMPBELL; REECE, 2010; TORTORA et al., 2012).

As leveduras do gênero *Tilletiopsis* foram sugeridas por Derx em 1930 a partir de um fungo formador de blastoconídeos sem brotamento de células, sendo considerado para percecer a familia *Sporobolomycetaceae*. Em 1948 Derx preveu um diagnóstico de *Tilletiopsis* sp. com quatro tipos de gênero. No entanto, esta estirpe não estaria mais disponível. Em 1950, Nyland designou o gênero *Tilletiopsis minor* e *Tilletiopsis washingtonensis*, enquanto que em 1952, Tubaki descreveu duas novas espécies, *Tilletiopsis cremea* e *Tilletiopsis lilacina*, bem como, *Tilletiopsis minor* de acordo com a consistência de colônias e os tamanhos de blastoconídeos (BOEKHOUT et al., 1992a; HAMAMOTO et al., 2000).

Em 1952 Tubaki, Gokhale em 1972 e Boekhout em 1991 aceitaram seis espécies para esse gênero (Tabela 1) (BOEKHOUT et al., 1992).

Tabela 1 - Espécies aceitas para o gênero *Tilletiopsis*

Ordem alfabética	Micro-organismo	Catalogação
1.	*Tilletiopsis albescens*	Em 1972 por Gokhale
2.	*Tilletiopsis flava*	Em 1991 por Boekhout
3.	*Tilletiopsis fulvescens*	Em 1972 por Gokhale
4.	*Tilletiopsis minor*	Em 1950 por Nyland
5.	*Tilletiopsis pallescens*	Em 1972 por Gokhale
6.	*Tilletiopsis washingtonensis*	Em 1950 por Nyland

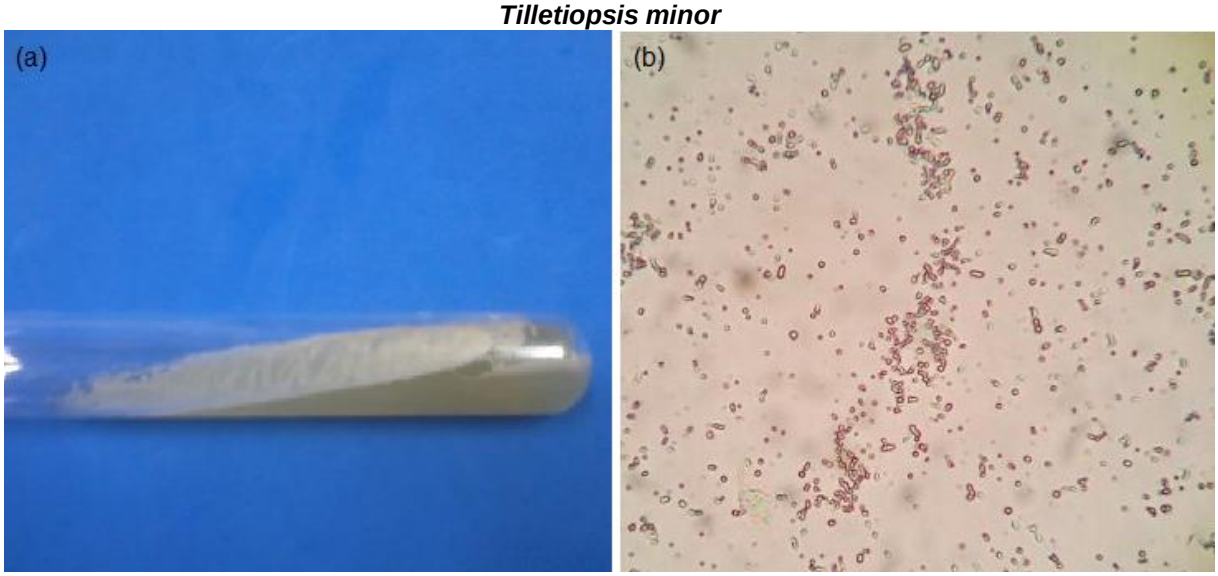
Fonte: Boekhout e colaboradores (1992).

Espécies de *Tilletiopsis* são reconhecidas com base no tamanho dos conídios, cor da colônia e testes nutricionais. A tonalidade das colônias podem ser de cor branca, creme, rosa-creme, rosa-amarelo, amarelo-marrom ou castanho (RAMANI et al., 1997; BOEKHOUT, 1998b).

Tilletiopsis (Figura 2) são leveduras basidiomicetas frequentemente isoladas a partir do filoplano das plantas, incluindo representantes com elevado potencial como

agentes de biocontrole (JANISIEWICZ et al., 1994). O filoplano é formado por microorganismos presentes na superfície foliar das plantas, os quais podem ser considerados de antagônicos a fitopatógenos ou indutores de mecanismos de defesa intrínseco da planta (ARAÚJO et al., 2010). De um modo geral, a antibiose parece ser o principal mecanismo de ação das *Tilletiopsis* spp. (URQUHART; PUNJA, 1997; KISS et al., 2003).

Figura 2 – (a) Colônia de *Tilletiopsis minor* crescida em agar Saboroud, (b) Fotomicrográfia do *Tilletiopsis minor*



Fonte: arquivo pessoal.

A literatura descreve que o gênero *Tilletiopsis* já foi associado com o aparecimento de Haze White (Bruma branca) em pomares, causada pelo elevado crescimento micelial de fungos sobre a superfície dos frutos formando uma película fina de cor esbranquiçada, acinzentada, que ocasionam perdas econômicas na comercialização dos frutos (BARIC et al., 2010). Além de casos patológicos como relata Kechkekian et al. (2007) com o primeiro caso descrito de ceratite pós-operatória causada por *Tilletiopsis minor* em ambiente com mofo. E Ramani et al. (1997) quando isolou um *Tilletiopsis minor* de uma lesão cística em um paciente imunodeprimido, descrevendo que fungos sapróbios ou patógenos de plantas estão cada vez mais implicados como agentes etiológicos em doenças humanas devido ao uso generalizado de drogas citotóxicas e imunossupressoras, cateteres e transplantes, entre outros. As micoses subcutâneas são causadas pela variedade de fungos “ambientais” presentes após o trauma na pele. O inicio e o progresso da

doença está associado à imunidade do hospedeiro e a capacidade do fungo de sobreviver.

O presente trabalho descreve o primeiro relato sobre o potencial enzimático do gênero *Tilletiopsis minor* como produtor de L-asparaginase, enzima de importância mundial para o setor biotecnológico.

2.4 Descoberta da L-asparaginase

Em 1922, Clementi ao estudar o soro de mamíferos, descobriu que soros de cobaias eram ricas fontes de enzimas L-asparaginase. Em 1953, Kidd descreveu a regressão de linfomas transplantados em ratos, tratados com soros de cobaias. Ao mesmo tempo varias outras observações foram feitas: em primeiro lugar, a inibição foi produzida apenas pelo soro de cobaias enquanto que o soro de outras espécies de animais não apresentaram as mesmas características; em segundo lugar, apenas alguns tipos de tumores foram aptos a supressão do crescimento mediada os soros de cobaias; e em terceiro lugar e mais curioso, foi a observação da inibição do crescimento *in vivo* de algumas linhas celulares de linfoma, através do soro de cobaia, e ao mesmo tempo, a falha do soro, em inibir o crescimento *in vitro* das mesmas linhas de células (PATIL et al., 2011).

Em 1960, Broome, correlacionou os resultados de Clementi e Kidd, e observou que o soro de cobaias recém-nascidas era desprovidos de L-asparaginases, sendo incapaz de inibir o crescimento dos linfomas. Observação realizada mediante a separação das proteínas do soro de cobaias adultas, apresentando atividade anti-linfoma apenas nas frações contendo L-asparaginase. Afirmando que a atividade anti-linfoma devia-se a atividade enzimática da L-asparaginase (LOUREIRO et al., 2010; PATIL et al., 2011). Ao mesmo tempo varias outras observações foram feitas. McCoy e colaboradores, em 1956, observaram que o crescimento e a viabilidade de alguns tumores dependiam de aminoácidos obtidos de fontes externas às células tumorais e dentre esses está a L-asparagina (LOUREIRO et al., 2010; EMADI et al., 2014).

Broome ainda em 1963, verificou que a L-asparaginase é uma enzima responsável pela hidrólise do aminoácido L-asparagina. Posteriormente, foi demonstrado que este aminoácido era necessário para o crescimento do “carcinosarcoma de Walker” e que as células leucêmicas tinham L-asparagina como

total requisito nutricional para o seu desenvolvimento, o que concluiu o importante papel dessa enzima no tratamento da leucemia linfoblástica aguda (KUMAR; SOBHA, 2012b).

Em 1966, Yellin e Wriston isolaram duas isoformas de L-asparaginase a partir do soro de porquinhos da índia ou preá da índia (*cavia porcellus*) e conseguiram demonstrar a atividade antitumoral de uma delas. Com o tempo, as pesquisas tornaram-se cada vez mais limitadas devido à baixa quantidade de L-asparaginase obtida do soro de cobaias para a realização de mais testes clínicos. Os estudos voltaram-se para a busca de novas fontes produtoras de L-asparaginase, e o alvo passou a ser os micro-organismos (LOUREIRO et al., 2010).

Mashburn e Wriston em 1964 e Campbell e Mashburn em 1969 relataram a purificação de L-asparaginase provenientes de *Escherichia coli* e demonstraram a sua atividade antitumoral semelhante ao de soros de cobaias. O uso de micro-organismo foi uma base prática para a produção em larga escala da L-asparaginase e estudos pré-clínicos e clínicos. (ZUO et al., 2014). O interesse em L-asparaginase surgiu a partir do efeito impressionante que apresentava no tratamento de leucemia. O que obrigou, os pesquisadores a desenvolver procedimentos para a purificação da L-asparaginase com alto grau de pureza, utilizando colunas cromatográficas seguidas de eletroforese em gel de poliacrilamida (ZOU et al,. 2014).

Em 1967, Oettgen e colaboradores foram os primeiros a mostrar a eficácia da L-asparaginase em seres humanos contra leucemia. Outra observação de importância contemporânea descreveu uma atividade antitumoral *in vivo* num modelo de cão contra lymphosarcoma espontâneo (NARTA et al., 2007). Os ensaios clínicos realizados em todos os pacientes, utilizando L-asparaginase provenientes de soro de cobaias e de *Escherichia coli* apresentaram resultados positivos. O primeiro uso clínico de L-asparaginase foi relatado em uma criança de oito anos de idade com leucemia linfoblástica aguda (ALL) que alcançou uma resposta clínica com asparaginase parcialmente purificada a partir de cobaias (EMADI et al., 2014).

2.5 L-asparaginase

A L-asparaginase é uma amido hidrólase (EC 3.5.1.1) comumente utilizada como quimioterápico, não sendo encontrada na espécie humana, mas frequentemente encontrada em bactérias Gram negativas (em menor frequência),

em bactérias Gram positivas e fungos filamentosos (ARRIVUKKARASAN et al., 2010, ZUO et al., 2014).

Existem dois tipos de L-asparaginases a partir de *E. coli*, denominadas de EC-1 e EC-2 ou asparaginase-I e asparaginase-II ou ainda tipo I e tipo II. Esses dois tipos de enzimas são geneticamente e bioquimicamente distintas: a L-asparaginase-I é citoplasmática e a L-asparaginase-II, periplasmático. L-asparaginases tipo I são necessárias para o crescimento do micro-organismo, enquanto que a L-asparaginases tipo II são expressas sob condições anaeróbicas e são amplamente usadas como agente anti-leucêmicos (EMADI et al., 2014).

As asparaginases são constitutivas na maioria dos microorganismos. Apresentam atividade antineoplásica e antiacrilamida (em alimentos), embora poucas possam ser utilizadas como quimioterápicos, por provocarem reações alérgicas durante a quimioterapia (TIZZOT et al., 2005; NARTA et al., 2007; MAKKY et al., 2014), fator que vem estimulando a décadas, inúmeras pesquisas em busca de novas fontes produtoras de L-asparaginase com potencial anti-tumoral (TIZZOT et al., 2005; POKROVSKAYA et al., 2012).

A produção desta enzima depende de vários parâmetros tais como a concentração de fontes de carbono e de nitrogênio, o pH do meio de cultura, temperatura, fermentação, tempo e taxa de transferência de oxigênio (Tabela 2). A variação desses parâmetros difere para cada organismo e a principal forma de obtenção, é através de fermentação submersa (KUMAR; SOBHA, 2012b).

Tabela 2 continua - Condições de cultivo para a produção de L-asparaginase a partir de várias fontes microbiana.

Micro-organismos	Requerimentos nutricionais % (w/v)	Condições de produção	Fonte de proteína recombinante	Atividade (U mL^{-1})	Referencias
Aspergillus terreus IOC 217	Prolina (2,0)	pH 6,2; 30°C; 160 rpm; 48h.		0,058	Sarquis et al. (2004)
Aspergillus oryzae	L-asparagina (0,5)	pH 6,2; 37°C; 250 rpm; 96h.		0,14	Gulati et al. (1997)
Aspergillus terreus MTCC 1782	L-asparagina (1,0); Farinha de milho (1,5); Glicose (0,2)	pH 6,2; 30°C; 160 rpm; 72h		33,25	Baskar et al. (2010a)
Aspergillus terreus MTCC 1782	L-asparagina (1,0); Ext. levedura (1,0); Peptona (0,6); Glicose (0,4)	pH 6,0; tamanho do inoculo (1.5); 35°C; 160 rpm; 72h.		24,10	Baskar et al. (2011b)
Aspergillus terreus MTCC 1782	Farinha de castanha com óleo (3,99); Nitrato de sódio (1,04); L-asparagina (1,84); Sacarose (0,64)	pH 6,0; 35°C; 160 rpm; 72h; contagem de esporos de $2 \times 10^7 \sim 10^8$ mL^{-1}		36,97	Baskar et al. (2011c)

Tabela 2 continuação

Micro-organismos	Requerimentos nutricionais % (w/v)	Condições de produção	Fonte de proteína recombinante	Atividade (U mL^{-1})	Referencias
Bacillus sp.	Peptona (0,1)	pH 8,0; 37°C ; 200 rpm		RA	Mohapatra et al. (1995)
Bacillus sp. DKMBT10	L-asparagina (0,6); Glicose/maltose (0,3)	pH 7,0; 37°C; 200 rpm; 24h		1,12[a]	Vidhya et al. (2010)
Bacillus licheniformis	KH2PO4 (0,3); MgSO4.7H2O (0,05); L-asparagina (4,0); Glicerol (0,2)	pH 6,0; 37°C; 200rpm; 18h		32,26	Mahajan et al. (2012)
Bacillus subtilis B11-6	-	-	*E. coli* JM109	816[b]	Jia et al. (2013)
Bacillus subtilis hswx88	L-asparagina (0,3); Glicose (0,2); $NaHPO_4$ (0,6); KH_2PO_4 (0,3); NaCl (0,05); $MgSO_4$ (0,05); CaCl (0,0015); Extrato de Levedura (0,1); Peptona (0,1).	pH 6,5; 37°C; 150rpm		23,8	Pradhan et al. (2013)

Tabela 2 continuação

Micro-organismos	Requerimentos nutricionais % (w/v)	Condições de produção	Fonte de proteína recombinante	Atividade (U mL^{-1})	Referencias
Cladosporium sp.	Farelo de milho	pH5,8; 30°C; 58 de umidade; 48h		3.74[b]	Kumar et al. (2013c)
Enterobacter aerogenes NCIM 2340	Citrato de sódio (1,0); Hidrogênio fosfato de amônia (0,16)	pH 7,0; 37°C; 24h; (0,25L); Arejamento 1,0 (vvm); 700 rpm; 6h; (2L).		0,60±0,02 1,2	Mukherjee et al. (2000)
Erwinia aroideae NRRL B-138	Triptona (0,05); Glicose (0,1); Extrato levedura (0,05)	pH 7,0; 28°C ; 200 rpm; 8h; (2.8L); pH 7,0; 28°C ; 300 rpm; 24h; arejamento 0,5 (vvm); (20L)		12,50	Peterson e Ciegler (1969).
Erwinia aroideae NRRL B-138	Lactose (1,0); Ext. levedura (1,5); K_2HPO_4 (0,1)	pH 7,5; 24°C; 550 rpm; 16h; arejamento 1,0 (vvm); antifoam 0,02% (v/v); pH 7,5; 24°C; D = 0,05 h^{-1} ; energia de ativação - 8,500 cal $mole^{-1}$		4,0	Liu e Zajic (1973)
Erwinia Chrysanthemi 3937	Peptona (1,0); Extrato levedura (0,5); NaCl (1,0)	pH 5,5 - 7,0; 24°C		2,25	Georgia e Nikolaos (2007)

Tabela 2 continuação

Micro-organismos	Requerimentos nutricionais % (w/v)	Condições de produção	Fonte de proteína recombinante	Atividade (U mL^{-1})	Referencias
Mucor hiemalis	Czapek Dox com 1,25 de L-asparagina e 0,4 de glicose	pH 7,0; 30°C; 96h		64,43	Thakur et al. (2014)
Pectobacterium carotovorum MTCC 1428	Glicose (0,52); L-asparagina (0,207)	pH 7,0; 30°C; 180 rpm; 12h; pH 7,0; 30 °C; 200 rpm; arejamento 1,5 (vvm); 12h; (4 L).		14,71 15,39	Sanjay et al. (2009)
Penicillium brevicompactum NRC 829	CZapek Dox com 2,0 de glicose	pH 6,0; estático; 96h.		475±0,51[b]	Elshafel et al. (2012)
Pichia pastoris	BSM 2	pH 5,0; 30°C; arejamento 5 (1 min^{-1}); (2L).	*Saccharomyces* cerevisiae ASP3	85,6	Ferrara et al. (2006)
Serratia marcescens ATCC 60	AYE (Extrato de Levedura autolisada) (4,0)	pH 5,0; 26°C; 250 rpm; 48h; 0.5L); em fraco de Erlenmeyer pH 8,5; 40 - 42h; (4L); em garrafa pH 8,4; 35h; em Fermentador		3,7 4,0 3,1	Heinemann e Howard (1969)

Tabela 2 conclusão

Micro-organismos	Requerimentos nutricionais % (w/v)	Condições de produção	Fonte de proteína recombinante	Atividade (U mL^{-1})	Referencias
Staphylococcus sp. Oj82	-	-	*E.coli* BL21	2,376	Han et al. (2014)
Streptomyces griséus ATCC 10137	Peptona (4,0)	pH 8,5		0,01	Peter (1972)
Thermococcus gammatolerans EJ3	-	-	*E. coli* BL21	7622[a]	Zuo et al. (2014)
Thermococcus kodakaraensis	-	-	*E. coli* DH5α	225494[b]	Chohan e Rashid (2013)
Thermus thermophilus HB8	Triptona (0,5); Glicose (0,1); Ext. levedura (0,3)	pH 9,2; 70°C		494[b]	Prista e Kyridio (2001)

a, atividade especifica; b, unidade internacional (IU). Fonte: Kumar e Sobha (2012b), modificado pelo acrescimo de trabalhos e coluna..

2.6 Fontes produtoras de L-asparaginase

A enzima L-asparaginase é oriunda de vários organismos como plantas, animais, leveduras, fungos filamentosos, bactérias e arqueobactérias, no entanto, as L-asparaginases de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são consideradas as melhores fontes dessa enzima para aplicação clínica, por exibirem elevada atividade especifica para asparagina e um efeito secundário relativamente baixo para glutamina (SHAH et al., 2010; POKROVSKAYA et al., 2012; ZUO et al., 2014).

Os primeiros relatos de L-asparaginase foram em soros de cobaias, logo passou alguns tipos de tecidos como: tecidos de peixes, pâncreas, fígado, cérebro, ovário, baço, pulmão, testículos e rins de mamíferos e aves (KUMAR; SOBHA, 2012b). Entre os vegetais e algas são encontras em *Capsicum annuum* (SHANMUGAPRAKASH et al., 2015), *Pisum sativum* (KUMAR; SOBHA, 2012b) e *Chlorella vulgaris* (EBRAHIMINEZHAD et al., 2014). Já as fontes microbianas são inúmeras como descritas na Tabela 2.

2.7 Mecanismo de ação da L-asparaginase como agente antineoplásico

As células cancerígenas apresentam uma divisão descontrolada se tiverem um suprimento contínuo de nutrientes (CAMPBELL; REECE, 2010), e é justamente na parte nutricional dessas células que a enzima L-asparaginase vai atuar como agente antineoplásico (EMADI et al., 2014).

A L-asparaginase atua esgotando os estoques de asparagina plasmática, metabólito essencial para o desenvolvimento de células neoplásicas (NARTA et al., 2007; BON et al., 2008; KUMAR et al., 2011a). A capacidade que a enzima L-asparaginase tem de hidrolisar o aminoácido L-asparagina no plasma sanguíneo em ácido aspártico e amônia (Figura 3) à torna candidata potente para o tratamento de leucemia. Uma vez que, as células leucêmicas são incapazes de sintetizar L-asparagina, a ausência desse aminoácido causa um colapso metabólico nas células (CHOHAN; RASHID, 2013).

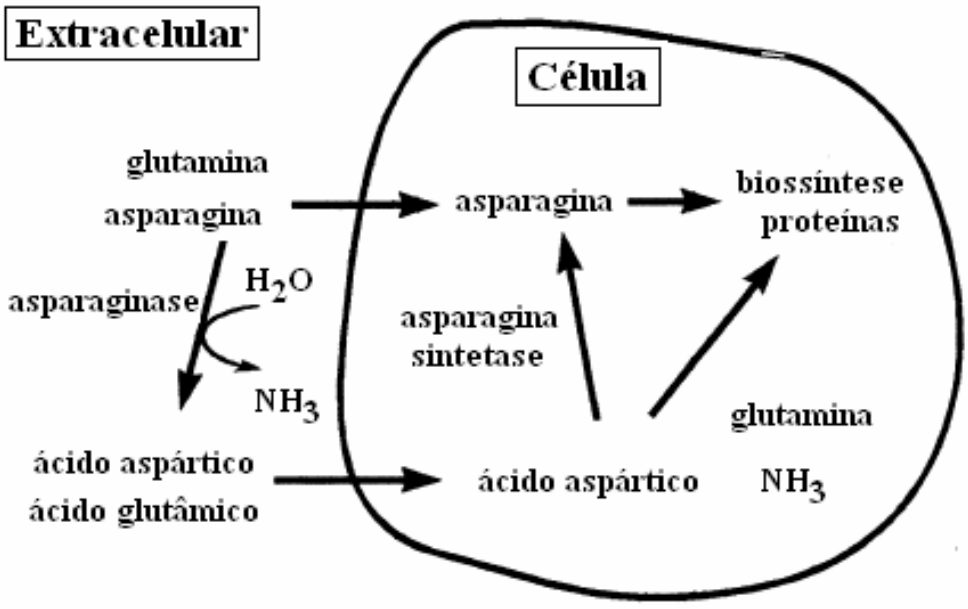
A aplicação da L-asparaginase como um agente quimioterapêutico é baseada principalmente na sua propriedade catalítica de hidrólise de L-asparagina. As células tumorais apresentam uma elevada necessidade pelo aminoácido L-asparagina, mas devido aos baixos níveis desse aminoácido, são completamente dependentes dos

níveis séricos de asparagina para a sua proliferação e sobrevivência. A enzima L-asparaginase causa depleção de asparagina no soro sanguíneo resultante na morte das células tumorais, no entanto, as células saudáveis escapam inalteradas, por serem capazes de sintetizar asparagina com auxílio da L-asparagina sintetase (SOYER et al., 2009; KUMAR et al., 2011a; KUMAR; SOBHA, 2012b).

Contudo, o mecanismo de ação da L-asparaginase está relacionado com a redução rápida e prolongada do aminoácido L-asparagina no soro, o qual é necessário metabolicamente para a rápida proliferação das células leucêmicas (SHAH et al., 2010; EMADI et al., 2014).

A capacidade de reduzir substancialmente o nível plasmático de asparagina e de mantê-lo baixo por período de tempo prolongado é a característica principal, responsável pela atividade antineoplásica da asparaginase (TIZZOT et al., 2005).

Figura 3 - Hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido aspártico e amônia



Fonte: Muller e boos, (1998).

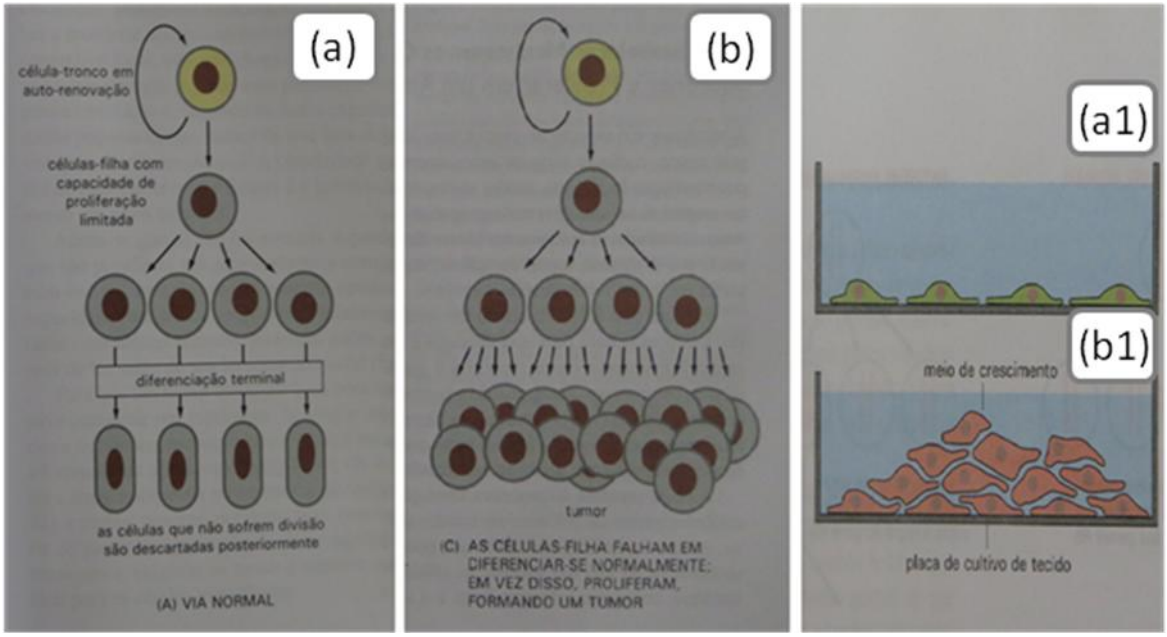
2.8 Câncer e L-asparaginase

As células cancerígenas não atendem aos sinais normais que regulam o ciclo celular. Além de sofrerem divisões excessivas são capazes de invadir outros tecidos e se não controladas, podem matar o organismo. O comportamento anormal das células cancerosas pode ser catastróficos quando ocorre no corpo. Os problemas iniciam-se quando uma única célula em um tecido sofre transformação, processo que converte células normais em células cancerosas. O sistema imune do corpo normalmente reconhece uma célula transformada como estranha e a destrói, entretanto, se a célula se esquiva da destruição, ela pode se proliferar e formar um tumor, uma massa anormal de células dentro de um tecido normal (CAMPBELL; REECE, 2010).

Se essa massa anormal de células permanecerem no local de origem, chamamos de tumor benigno, em contraste, se essa massa se tornar invasiva o suficiente para prejudicar as funções de um ou mais órgãos, chamamos de tumor maligno ou câncer (CAMPBELL; REECE, 2010). Uma das mais importantes propriedades das células cancerosas é a perda da inibição por contato. Ou seja, eles perdem a capacidade de cometerem suicídios (apoptose), uma propriedade das células normais (PELCZAR JR et al., 1997).

Células normais reconhecem os limites celulares e limitam a população de células por meio do processo de inibição por contato, que significa inibição do crescimento quando as células se tocam. Ou seja, quando há formação de um grande número de células a taxa de apoptose cresce, para eliminar o excesso celular e manter o equilíbrio (ALBERTS et al., 2004). Por essa razão, quando as células normais são propagadas, formam uma monocamada. Enquanto que as células cancerosas reproduzem-se indefinidamente empilhando-se umas sobre as outras (Figura 4) (PELCZAR JR et al., 1997).

Figura 4 - Controle normal (a) e alterado (b) na produção de células. (a1) representa uma monocamada de células normais inibidas por contato. (b1) demonstra monocamada de células cancerosas não-inibidas



Fonte: Alberts e colaboradores (2004).

2.9 Utilização da L-aspraginase como antineoplásico

A enzima L-asparaginase é amplamente utilizada no tratamento da leucemia linfoblástica aguda pediátrica (ALL), além do uso contra a leucemia meníngea. Sua utilização contra leucemias é benéfica quando usada em quimioterapia sequencial. No entanto, a eficácia do medicamento a base desta enzima para o tratamento de outras doenças hematológicas malignas, particularmente a leucemia mielóide aguda, não está bem estabelecida. A L-asparaginase também é aplicada contra alguns cânceres, como o carcinoma de pâncreas e o linfossarcoma bovino (EMADI et al., 2014).

Maiores estudos têm explorado a administração da L-asparaginase durante 20-30 semanas como tratamento de consolidação para neoplasias linfoblásticas. Por estas razões a L-asparaginase foi estabelecida como componente indispensável em processos modernos de quimioterapia de combinação (NARTA et al., 2007).

O uso da L-asparaginase é realizado em combinação com a quimioterapia para LLA pediátrica, bem como em regimes multiagentes para LLA em adultos, embora a enzima tenha provado ser um agente quimioterapêutico eficaz, o seu uso ainda é limitado devido à manifestação clínica de hipersensibilidade em cerca de

80% dos pacientes quando administração com a fórmula nativa. Por esta razão, os estudos continuam em busca de desenvolver formas alternativas da enzima sem que haja a perda da sua atividade anti-tumoral (KUMAR; SOBHA, 2012b; MAKKY et al., 2014).

Reações de hipersensibilidade são os efeitos colaterais mais comuns da adminidtração de L-asparaginase. A frequência clinica de hipersensibilidade está associada à administração de L-asparaginase proveniente de *E. coli*, variando de 0% à 45%. Os fatores de risco para as reações alérgicas incluem: doses superiores a 6000 IU/m^2/dia administradas por via intravenosa, repetidos ciclos de tratamentos e um único agente quimioterápico. Nesse caso, a interrupção de *E. coli*-asparaginase pode ser substituída pela *Erwinia*-asparaginase ou pelo polietileno glicol (PEG)-asparaginase (SOYER et al., 2009).

A PEGuilação é o método mais sucedido de modificação química, uma vez que reduz a imunogenicidade sem comprometer a atividade anti-tumoral da enzima. Estudos pré-clínicos apresentaram eficácia da L-asparaginase contra mais de 50 tumores, incluindo tumores murinos em ratos, linfossarcoma canino, fibrossarcoma em rato, carcinossarcoma de Walker e sarcoma de Jensen em humanos, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloblástica aguda (LMA), linfoma não-Hodgkin (NHL) e leucemias crônicas. Sendo que os tumores de origem linfóide foram mais susceptível à droga PEG-asparaginase do que os tumores sólidos (NARTA et al., 2007; PATIL et al., 2011; MAKKY et al., 2014).

Estudos com PEG-asparaginase foram realizados na etapa de reindução da remissão e na terapia de manutenção de pacientes com LLA e foi relatado que polietileno glicol asparaginase diminui a toxicidade e pode ser administrado por um longo tempo. Esta forma de L-asparaginase é muito eficaz, uma vez que necessita apenas de ser administrado uma vez cada 2 semanas, ao contrário da forma nativa que tem de ser administrado a cada 2-5 dias. Outra limitação da L-asparaginase é por apresentar um perfil de toxicidade diferente, variando entre hipersensibilidade, sensibilização imunológica aguda e hiperglicemia por disfunção hepatocelular e pancreatite (KUMAR; SOBHA, 2012b).

2.10 Medicamentos a base de L-asparaginase

Desde 2013, o Ministério de Saúde brasileiro, vem investindo alto na indústria de fármacos ao inaugurar parcerias entre laboratórios públicos e privados, para acelerar a produção nacional de 14 novos fármacos, envolvendo o Grupo Executivo do Complexo Industrial da Saúde (GECIS), a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Banco Nacional do Desenvolvimento Social (BNDES) (MS, 2013).

Os produtos representam um custo de R$ 1,8 bilhão ao ano e estão voltados para o tratamento de câncer de mama, leucemia, artrite reumatoide, diabetes, oftalmológicos, além de um cicatrizante, um hormônio de crescimento e uma vacina alergênica. A produção nacional dá ao Brasil maior autonomia, deixando-o menos vulnerável à instabilidade e a certos problemas de importação. Além de diminuir o risco do país ser surpreendido pela suspensão da produção de um medicamento por um laboratório internacional privado, como ocorreu com o fármaco à base de L-asparaginase. Este é um dos medicamentos contemplados entre as parcerias, que envolve a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e os laboratórios privados NT Pharma e United Biotec (MS, 2013).

Medicamentos a base de asparaginase, estão surgindo com a L-asparaginase recombinantes de *E. coli*, as quais são projetadas para terem uma sequência de aminoácidos idêntica à da asparaginase comercial da Medac. Estudos objetivando manter a atividade enzimática e reduzir a formação de antiasparaginase pelos anticorpos, estão relacionados com a encapsulação da enzima em hemoglobinas homólogas. Além disso, estudos pré-clinicos estão sendo realizados com uma forma PEGuilada de asparaginase recombinante de *Erwinia* e *E. coli* (KUMAR; SOBHA, 2012b).

PEG-asparaginase (polietilenoglicol-L-asparaginase) é uma versão modificada de L-asparaginase conjugação formada pela ligação covalente entre a L-asparaginase com Monometoxi-polietilenoglicol. A ligação a da enzima ao PEG prolonga a meia-vida da droga. Ou seja, é uma técnica de conjugação para melhorar o desempenho das proteínas de fármacos (EMADI et al., 2014).

Uma nova formulação de L-asparaginase encapsulada (GRASPA) através de PEG-asparaginase, resultou em um prolongando tempo de esgotamento do

aminoácido asparagina e uma redução na taxa de reações alérgicas em adultos e crianças (BHOJWANI; PUI, 2013).

A L-asparaginase é utilizada como um fármaco quimioterapêutico no tratamento de uma variedade de linfoproliferações, linfomas e leucemia. Os fármacos a base de L-asparaginase estão disponíveis em três formas: duas são formas nativas purificadas a partir de fontes bacterianas e outra, de uma forma nativa modificada (Tabela 3). A enzima nativa a partir de *Escherichia coli* é comercializada pelo medicamento “Elspar” fabricados pela Merck & CO (EUA) e a enzima a partir de *Erwinia carotovora*, encontra-se disponível como “Erwinia L-asparaginase” fabricado pelo Ogden Bioservices Pharmaceutical Repository (EUA) ou “Erwinase” fabricado pelo Porton (Canadá e Europa). Na Europa, há duas preparações diferentes de L-asparaginase de *Escherichia coli*, a L-asparaginase Medac e Crasnitin (KUMAR; SOBHA, 2012b; MAKKY et al, 2010).

Tabela 3 - Medicamentos a base de L-asparaginase para tratamentos clínicos

Fonte	Fabricante	Nome comercial	País
E-coli asparaginase	EUSA Pharama	Kidrolase®	Reino Unido
	Ovation pharmaceuticals Deerfield, Illinois	Elspar®	Estados Unidos
	Bayer AG, Leverkusen		
E-coli asparaginase	Sanofi-Aventis Paris	Crasnitin®	Alemanha
	Kyowa Hakka, Tokyo	Leunase®	França
PEGuilada de *E.coli*	Sigma-Tau pharmaceuticals Inc., Gaithersburg	Asparaginase Medac® Oncaspar®	Japão Estados Unidos
Erwinia	EUSA pharma, Oxford	Erwinase®	Reino Unido

Fonte: Kumar e Sobha (2012b).

2.11 Leucemia linfoblástica aguda e L-asparaginase

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna oriunda por sucessivos defeitos genéticos em células sanguíneas progenitoras da linhagem linfóide, fazendo com que essas células precursoras se multipliquem, sem qualquer tipo de controle de auto-renovação ou de diferenciação, dando origem a células leucêmicas denominadas de linfoblastos. A consequência da proliferação indiscriminada é a supressão da hematopoese normal devido ao acúmulo de linfoblastos que substituem as células normais do sangue. Geralmente acarreta no comprometimento da medula óssea e do sangue periférico (CAZÉ et al., 2010; BHOJWANI; PUI, 2013).

A asparaginase tem mostrado algumas promessas na gestão de doenças malignas, mas o foco é principalmente no tratamento contra a leucemia linfoblástica aguda (LLA), sendo um crucial agente quimioterápico (SOYER et al., 2009; PATIL et al., 2011). A LLA é a forma mais comum de câncer infantil atingindo cerca de 6 crianças a cada 10 casos. O tratamento da LLA é auxiliado pela enzima L-asparaginase na indução da remissão (KUMAR E SOBHA, 2012b).

Embora a enzima L-asparaginase seja extraída de inúmeras fontes, apenas a L-asparaginase proveniente de *Escherichia coli* e *Escherichia chrysanthemi* foram aprovadas pela Organização das Nações States Food and Drug Administration (FDA) para utilização clínica no tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda (POKROVSKAYA et al., 2012; EMADI et al., 2014).

Em geral, os pacientes com recidiva de alto risco recebem multidrogas por quimioterapia seguido de transplante de células-tronco hematopoéticas, enquanto que pacientes com baixo risco ou recaída recebem cerca de dois anos de quimioterapia. Estudos afirmam que quatro doses de asparaginase peguilada (PEG-asparaginase) administrada uma vez por semana é mais eficaz que duas doses a cada duas semanas para induzir a remissão completa, mas não se sabe a melhoria na sobrevivência de pacientes com recaída de alto risco (BHOJWANI; PUI, 2013).

Na terapia de reindução que compreende múltiplas seções de quimioterapia intensiva, são administradas quatro drogas padrões: Prednisona, Doxorrubicina, Vincristina e Asparaginase. Terapia para recaídas é composta por seções intensivas de reindução, seguida de terapia de manutenção de 1 a 2 anos, incluindo altas

doses de Metotrexato, Citarabina, Esteróides, Asparaginase, Intratecal e terapia tripla (BHOJWANI; PUI, 2013).

O uso de medicamentos a base de L-asparaginase no tratamento de LLA, não é administrado isoladamente, necessitando da combinação com outras drogas (Tabela 4). Essa combinação varia de acordo com a idade e o estágio da doença dos pacientes. A ordem preferencial de infusão é que a “Asparaginase” seja injetada primeiro, para que se possa avaliar a ocorrência de reação de hipersensibilidade, seguida de “Vincristina”. É observado um intervalo de 2 horas após a infusão das duas primeiras drogas, só assim, pode-se fazer a administração das demais drogas, de acordo com o protocolo de tratamento de LLA GBTLI-99 (CAZÉ et al., 2010).

Tabela 4 - Etapas para o tratamento de LLA seguindo o protocolo GBTLI-99 utilizando L-asparaginase.

ETAPA (DURAÇÂO)	MEDICAMENTOS (DOSES)
Indução da remissão (4 semanas)	**L-asparaginase (5000 UI/m2/dia)**
Consolidação tardia (8 semanas)	**L-asparaginase (5000 UI/m2/dose)**

Fonte: Gazé et al. (2010), modificado.

2.12 L-asparaginase como aditivo alimentar

Além do potencial antineoplásico da L-asparaginase, já existe estudos voltados para o desenvolvimento de biossensores. Mas foi nos últimos 10 anos, que a L-asparaginase apresentou potencial como aditivo alimentar, reduzindo ou até inibindo a formação de acrilamida em determinados alimentos quando submetidos a altas temperaturas (ARISSETO, 2012b; CHOHAN; RASHID, 2013).

A utilização da asparaginase para reduzir a formação de acrilamida em alimentos fritos e cozidos ainda em muito recente. A acrilamida é considerada uma molécula tóxica com potencial carcinogêneo em humanos (ANESE et at., 2011; MAHAJAN et al., 2012).

A acrilamida (C_3H_5ON) é uma molécula da família das “Amidas”, conhecida como 2-propenamida. Molécula esta, fundamental na síntese das poliacrilamidas que apresentam grande variedade de usos, como indústria de papel, madeira e têxtil, no tratamento de águas, esgotos e efluentes como agentes floculantes, clarificantes e purificante, além de cosméticos e artigos de higiene. A acrilamida é produzida comercialmente pela indústria desde 1950, é considerada neurotóxica ao homem e classificada como possível carcinógeno pelo IARC/OMS e pelo JECFA/Codex Alimentarius (ANVISA, 2007; VACLAVIK et al., 2015).

A ação carcinogênica da acrilamida não atinge apenas humanos. Os demais mamíferos também são vitimas, uma vez que suas rações contêm acrilamida e aminas heterocíclicas. Ambas potentes carcinogênicas, formadas pelos métodos de processamento comercial das rações animais (AYVAZ et al., 2015).

Em abril de 2002, pesquisadores suecos comunicaram a formação de altos níveis de acrilamida em alimentos ricos em carboidratos processados em altas temperaturas, tais como alimentos fritos, assados e torrados, citando Tareke et al. (2002). O que despertou uma grande preocupação mundial em relação aos riscos que a ingestão de acrilamida pela dieta poderia causar à saúde humana, uma vez que esta substância é classificada como um provável carcinógeno ao homem (IARC, 1994).

Neste período, o Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) dirigiu duas avaliações do risco da presença da acrilamida em alimentos. A primeira foi concluída em 2005 ao observarem que a margem entre a ingestão de acrilamida estimada para a população e as doses que provocaram câncer em animais experimentais era baixa para um substância potencialmente genotóxica e carcinogênica, indicando preocupação à saúde humana. A segunda avaliação realizada em fevereiro de 2010, só fez confirmar tais conclusões (FAO/WHO, 2011). Diante destas evidências, o Comitê ressaltou a importância de esforços para a redução do teor de acrilamida em alimentos (ARISSETO, 2012b).

A Comissão do Codex Alimentarius desenvolveu e adotou um código de práticas para a redução de acrilamida em alimentos, no qual, disponibiliza orientações para prevenir e reduzir a formação de acrilamida em produtos à base de batata e cereais. A indústria também tem tomado medidas voluntárias para compreender o mecanismo da formação de acrilamida e sugerir possíveis estratégias de mitigação em alimentos. Uma dessas ações foi o desenvolvimento da

chamada “Acrylamida Toolbox” pela Confederação das Indústrias Agro-Alimentares da Europa (CIAA). Essa caixa de ferramentas propõe medidas de intervenção que poderiam ser voluntariamente aplicadas pelos produtores para reduzir os níveis de acrilamida em diversos produtos (CIAA, 2011).

A presença até então não conhecida da acrilamida em alimentos de consumo habitual pela população, como batata frita, pão e café, motivou uma série de iniciativas internacionais e a realização de inúmeros estudos sobre sua formação, métodos analíticos, ocorrência e riscos à saúde, bem como o desenvolvimento de medidas potenciais para a redução de seus níveis (AYVAZ et al., 2015).

Produtos alimentícios derivados de batatas, cereais e café, são alguns dos alimentos capazes de produzir acrilamida quando submetidos a altas temperaturas. A eficácia da asparaginase na redução de acrilamida é comprovada por inúmeros pedidos de patentes relativos a diferentes alimentos processados, tais como salgadinhos, batatas fritas, diversos tipos de massas, entre outros (ANESE et al., 2011; PEDRESCHI et al., 2011).

A asparaginase comercial utilizada para a inibição de acrilamida é produzida através da clonagem realizada em *Aspergillus oryzae*, técnica reconhecida e aprovada pelos Estados Unidos através da avaliação favorável pela Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA, 2007), ou seja, avaliação do comitê científico internacional de especialistas no qual, é administrado conjuntamente pela Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS).

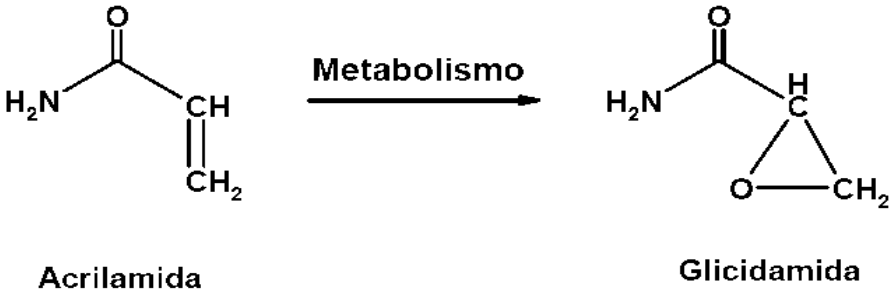
A utilização da L-asparaginase comercial como aditivo alimentar, é permitida nos Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Dinamarca (MAHAJAN et al., 2012). Além de estratégias aplicadas pela indústria e pelas agências regulamentadoras, é importante que a população seja orientada em relação à forma de preparo dos alimentos, uma vez que a acrilamida também pode ser formada durante as práticas domésticas de cozimento. Evitar a estocagem refrigerada de batatas que serão fritas ou assadas, preferir uma coloração amarelo dourado ao invés de marrom dourado para batatas fritas e não tostar excessivamente o pão são recomendações possíveis de serem aplicadas pelo consumidor e que podem resultar em uma menor formação de acrilamida no produto final (ARISSETO, 2012b).

2.13 Mecanismo de ação da L-asparaginase como agente antiacrilamida

A absorção da acrilamida pelo organismo é realizada através das vias dérmica, respiratória ou digestória, seguida de um processo de biotransformação, distribuição e por fim, armazenamento e excreção. Dados da toxicocinética da acrilamida em animais indicam uma rápida absorção pelo trato gastrointestinal e distribuição pelos tecidos, e metabolizada ao epóxido glicidamida através de uma reação catalisada pela enzima citocromo P2E1 (ARISSETO; TOLEDO, 2006a).

O principal metabólito da exposição a acrilamida é a glicidamida (Figura 5) que assume o potencial genotóxico provocando danos ao DNA, desencadeando o processo cancerígeno (ARISSETO; TOLEDO, 2006a).

Figura 5 - Formação de glicidamida a partir da acrilamida



Fonte: https://comidaviva. wordpress.com/category/acrilamida/

A concentração de acrilamida em produtos alimentícios tornou-se um problema muito serio de saúde (BARTKIENE et al., 2013). A maioria dos métodos para atenuar a formação de acrilamida, procura remover os seus precursores (glicose, frutose e asparagina) ou modificando os processos de produção, com intuito de reduzir ou inibir a reação de Maillard (PEDRESCHI, 2011; AYVAZ et al., 2015). Ou seja uma das principais rotas de formação da acrilamida é através da reação de Maillard, sendo o aminoácido asparagina identificado como seu principal precursor.

Diversas técnicas analíticas foram e ainda têm sido propostas para a determinação de acrilamida em alimentos, sendo que as mais utilizadas são aquelas

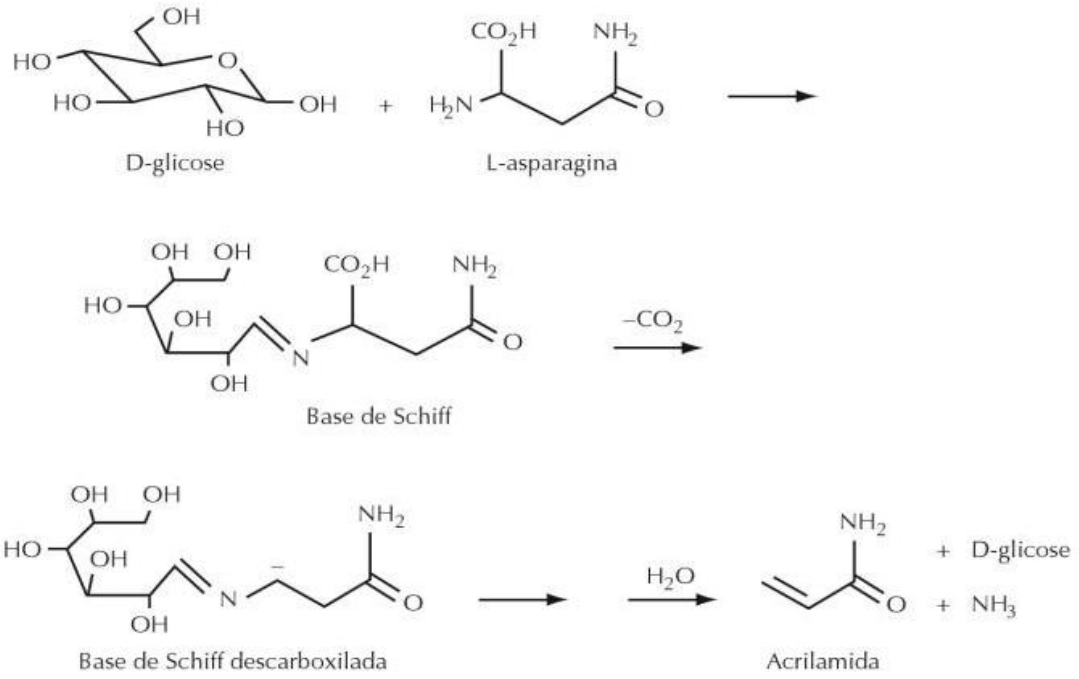
baseadas em cromatografia (líquida ou gasosa) acoplada à espectrometria de massas (ARISSETO, 2012b). Técnicas de pós-frituras também poderia eventualmente, serem implantadas para diminuir a formação de acrilamida. Mas o grande desafio é a redução dos níveis de acrilamida sem comprometer as propriedades sensoriais do produto final (PEDRESCHI, 2011).

A utilização da asparaginase é uma ótima alternativa para tal desafio, uma vez que a utilização dessa enzima não causa efeitos sobre as propriedades nutricionais e sensórias dos produtos alimentícias.

A acrilamida é formada durante o processo de aquecimento dos alimentos ricos em hidratos de carbono contendo açúcares redutores (glicose e frutose) e o aminoácido asparagina (Figura 6) (MAHAJAN et al., 2012). Contudo, a enzima L-asparaginase atua na disseminação do seu precursor, (asparagina) o que impede a sua reação junto aos açúcares redutores dos alimentos, consequentemente evita a formação da acrilamida (MAHAJAN et al., 2012).

Estudos com L-asparaginases de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, e *Bacillus subtilis* apresentaram capacidade de reduzir a formação de acrilamida em alimentos ricos em amido (ZUO et al., 2014).

Figura 6 - Formação de acrilamida a partir da reação entre o aminoácido asparagina com açucares redutores mediante aquecimento



Fonte: http://www.toxicologia.unb.br/?pg=desc-noticias_foco&id=27

3. Objetivos

3.1 Geral

Selecionar, produzir, identificar e caracterizar a levedura nativa isoladas de pólen coletados de *Melipona* spp. da região Amazônica como produtora de L-asparaginase.

3.2 Especificos

- Selecionar leveduras produtoras de L-asparaginase;
- Identificar a levedura selecionada;
- Obter o extrato bruto enzimático produzido por fermentação submersa da levedura selecionada;
- Realizar dosagem de proteína;
- Medir a atividade enzimática para L-asparaginase;
- Avaliar os parâmetros de produção para melhorar o desenvolvimento enzimático;
- Avaliar a influência da glicose na produção de biomassa e de L-asparaginase;
- Caracterizar bioquimicamente a atividade enzimática em relação ao pH e temperatura ótimos e estabilidade ao pH e a temperatura, além de analisar a influência de íons metálicos sobre a enzima;
- Realizar pré-purificação da L-asparaginase através de precipitação com sulfato de amônia;
- Avaliar o grau de pureza da enzima através de eletroforese utilizando SDS-PAGE;
- Realizar testes com L-asparaginase obtida, contra a formação de poliacrilamida.

Considerações Finais

O presente trabalho selecionou e identificou uma levedura nativa isolada de pólen coletados de abelhas na região Amazônica como uma nova fonte produtora de L-asparaginase. Foi possível encontrar parâmetros de produção capaz de elevar a atividade enzimática, além de avaliar a fonte de carbono a ponto de livrar a repressão catabolica. O trabalho obteve uma pré-purificação enzimática satisfatória comprovada em gel de SDS-PAGE para L-asparaginase com um potencial contra a formação de poliacrilamida a partir de uma solução de acrilamida a 30%.

Referências Bibliografia

ABDEL-FATTAH, YASSER R.; OLAMA, ZAKIA A. L-asparaginase production by Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, 115 – 122p., 2002.

ALBERTS, BRUCE; JOHNSON ALEXANDER; LEWIS, JULIAN; RAFF, MARTIN; ROBERTS, KEITH; WALTER, PETER. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre – RS: Artmed, 2004.

AMENA, S; VISHALAKSHI, N; PRABHAKAR, M; DAYANAND, A; LINGAPPA, K. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41,173 – 178p., 2010.

ANESE, MONICA; QUARTA, BARBARA; FRIAS, JESUS. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, 435 – 440p., 2011.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Perguntas e respostas sobre a acrilamida**. Informe Técnico nº. 28, de 2 de julho de 2007. Capiturado em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/28_020707.htm.

ARAÚJO, L. G.; MENDANHA, R. A.; GONÇALVES, F. J.; SILVA, G. B.; FILIPPI, M. C. C.; PRABHU, A. S. Antibiose de fungos do filoplano de plantas de arroz a *Magnaporthe oryzae*. **Revista de Biologia Neotropical**, v. 7, 1 – 6p., 2010.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F. Acrylamide in Foods: A Review, **Brazilian Journal of Food Technology**, v.9, 123 – 134p., 2006.

ARISSETO, A. P.; TOLEDO, M. C. F.; GOVAERT, Y.; VAN, LOCO J.; FRASELLE, S.; WEVERBERGH, E.; DEGROODT, J. M. Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, 236 – 241p., 2007.

ARISSETO, A. P. Uma década da descoberta da acrilamida, **Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 3., 2012.

ARRIVUKKARASAN, S.; MUTHUSIVARAMAPANDIAN, M.; ARAVINDAN, R.; VIRUTHAGIRI, T. Effect of Medium Composition and Kinetic Studies on Extracellular and Intracellular Production of L- asparaginase from Pectobacterium carotovorum. **Food Science and Technology International**, v. 16, 115p., 2010.

AYVAZ, HUSEYIN; RODRIGUEZ-SAONA, LUIS E. Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. **Food Chemistry**, v. 174, 154 – 162p., 2015.

BARIC, S.; LINDNER, L.; MARSCHALL, K.; VIA, J. D. Haplotype diversity of *Tilletiopsis* spp. causing white haze in apple orchards in Northern Italy. **Plant Pathology**, v. 59, 535 – 541., 2010.

BARTKIENE, ELENA. JAKOBSONE, IDA; JUODEIKIENE, GRAZINA; VIDMANTIENE, DAIVA; PUGAJEVA, IVETA; BARTKEVICS, VADIMS. Study on the reduction of acrylamide in mixed rye bread by fermentation with bacteriocin-like inhibitory substances producing lactic acid bacteria in combination with *Aspergillus niger* glucoamylase, **Food Control**, v. 30, 35 – 40p, 2013.

BASKAR, G.; SRIHARINI, C.; SRIPRIYA, R.; RENGANATHAN, S. Statistical Screening of Supplementary Nitrogen Source for Enhanced Production of L-Asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 24, 467 – 472p., 2010a.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal L-asparaginase. **Chiang Mai Journal** Science, v. 38, 270 – 279p., 2011b.

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, 50 – 58p., 2011c.

BHOJWANI, DEEPA; PUI, CHING-HON. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. Review. **www.thelancet.com/oncology**, v. 14, 2013.

BOEKHOUT, TEUN; GOOL, JOLANDA VAN; BOOGERT, HANS VAN DEN; JILLE, TAMARA. Karyotyping and G +C composition as taxonomic criteria applied to the systematics of *Tilletiopsis* and related taxa, **Mycological Research**, v. 95, 331 – 342p., 1992a.

BOEKHOUT, T. Tilletiopsis Derx ex Derx. Vic. Descriptions ofanamorphic basidiomycetous genera and species In: The Yeasts: a taxonomic study. Elservier Science, 1998b. p. 848 – 853.

BON, ELBA P. S.; FERRARA, MARIA ANTONIETA; CORVO, MARIA LUISA. **Enzimas em Biotecnologia**: Produção, Aplicações e Mercado. 1. ed. Rio de Janeiro – RJ: Interciência, 2008.

CAC (Codex Alimentarius Commission). **Code of Practice for the reduction of acrylamide in foods**. CAC/RCP 67-2009.

CAMPBELL, NEIL A.; REECE, JANE B. **Biologia**, 8. ed. Porto Alegre – RS: Artmed, 2010.

CAZÉ, M.O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E.F. Referential study of a chemotherapy protocol acute lymphocytic leukemia in childhood. **Revista HPCPA**, v. 30, 5 – 12p., 2010.

CHOHAN, SHAHID MAHMOOD; RASHID, NAEEM. TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, 438 – 443p., 2013.

CIAA (Confédération des Industries Agro-Alimentaires de l'Union Européenne). **Acrylamide Toolbox** , 2011. Capiturado em: http://ec.europa.eu/food/food/chemical safety/contaminants/ciaa_acrylamide_toolbox09.pdf.

DRAINAS, D.; DRAINAS, C. A conductimetric method for assaying asparaginase activity in *Aspergillus nidulans*. **European Journal of Biochemistry**. v. 5, 591 – 593p., 1985.

EBRAHIMINEZHAD, ALIREZA; RASOUL-AMINI, SARA; GHOSHOON, MOHAMMAD BAGHER; GHASEMI, YOUNES. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L-asparaginase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, 214 – 217p., 2014.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, MOHAMED; MANSOUR, J. Production, Isolation, and Purification of L-Asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa* 50071 Using Solid-state Fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, 387 – 393p., 2004.

EMADI, ASHKAN; ZOKAEE, HANIA; SAUSVILLE, EDWARD A. Asparaginase in the treatment of non‐ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, 875 – 883p., 2014.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Acrylamide. In: **Safety Evaluation of Certain Contaminants in Foods / prepared by the Sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. WHO Food Additives Series: 55. FAO Food and Nutrition, n. 82., 2006a.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Acrylamide. In: **Safety Evaluation of Certain Contaminants in Foods / prepared by the Seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. WHO Food Additives Series: 63. FAO JECFA Monographs n. 8., 2011b.

FERRARA, M.A.; SEVERINO, N.M.B.; MANSURE, J.M.; SOTERO-MARTINS, A.; OLIVEIRA, E.M.M.; SIANI, A.C.; PEREIRA JR, N.; TORRES, F.A.; BOM, E.P.S. Asparaginase production by a recombinant *Pichia pastoris* strain harbouring *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, 1457 – 1463p., 2006a.

FERRARA, M. A.; SEVERINO, N. M. B.; VALENTE, R. H.; PERALES, J.; BON, E. P. S. High-yield extraction of periplasmic asparaginase produced by recombinant *Pichia pastoris* harbouring the *Saccharomyces cerevisiae* ASP3 gene. Enzyme and Microbial Technology, v. 47, 71 – 76p., 2010b.

GEORGIA, A.K.; NIKOLAOS, E.L. L-asparaginase from *Erwinia Chrysanthemi* 3937: cloning, expression and characterization. **Journal Biotechnology,** v. 127, 657 – 669p., 2007.

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

HAMAMOTO, M.; TAMURA, M.; NAKASE, T. Emended descriptions of *Tilletiopsis washingtonensis*, *Tilletiopsis cremea* and *Tilletiopsis lilacina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, 925 – 930p., 2000.

HEINEMANN, B.; HOWARD, A.J. Production of tumor-inhibitory L- asparaginase by submerged growth of *Serratia marscences*. **Journal Applied Microbiology**, v, 18, 550 – 554p., 1969.

IARC (International Agency for Research on Cancer). **Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans**, v. 60, 389p., 1994.

JANISIEWICZ, W. J.; PETERSON, D. L.; BORS, B. Control of storage decay of apples with *Sporobolomyces roseus*. **Plant Disease**, v. 78, 466 – 470p., 1994.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) **Compendium of Food Additive Specifications**, n. 4, food and agriculture organization of the united nations, Rome. Available from ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1447e/a1447e.pdf , 154p., 2007.

KECHKEKIAN, A.; GARI-TOUSSAINT, M.; GASTAUD, P.; FRETON, A.; GANTIER, J. C. Keratitis due to Tilletiopsis minor post LASIK. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, 119 – 121p., 2007.

KENARI, SEYEDEH LALEH DASHTBAN; ALEMZADEH, IRAN; MAGHSODI, VIDA. Production of l-asparaginase from *Escherichia coli* ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 8, 315 – 321p., 2011.

KISS, L. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. **Pest Management Science**, v. 59, 475 – 483p., 2003.

KUMAR, V. SANJAY; DASU, VENKATA; PAKSHIRAJAN, K. Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Bioresource Technology**, v. 102, 2077 – 2082p., 2011a.

KUMAR, DEVARAI SANTHOSH; SOBHA, KOTA. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review **Advances in Bioresearch**, v. 3, 137 – 157p., 2012b

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

LIU, F.S.; ZAJIC, J.E. Fermentation kinetics and continuous process of L-asparaginase production. **Journal Applied Microbiology Journal Applied Microbiology,** v. 25, 92 – 96p., 1973.

LOUREIRO, Cláudio Batiston. Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por Aspergillus terreus (cepa PC-1.7.A). 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MADIGAN, MICHAEL T.; MARTINKO, JOHN M.; DUNLAP, PAUL V.; CLARK, DAVID P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre – RS: Artmed, 2010.

MAHAJAN, RICHI V.; SARAN, SAURABH; KARTHIKEYA, K.;KUMAR, VINOD; SAXENA, R.K. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminse activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, v. 125, 11 – 16p., 2012.

MAKKY, ESSAM A.; LOH, YEAN CHUN; KARIM, MD. REZAUL. Purification and partial characterization of a low molecular weight L-asparaginase produced from corn cob waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, 265 – 270p., 2014.

MOHAPATRA, B.R.; SANI, R.K.; BANERJEE, U.C.. Characterization of L-asparaginase from *Bacillus* sp. Isolated from an intertidal marine alga (*Sargassum* sp.). **Letteras in Applied Microbiology,** v. 21, 380 – 383p., 1995.

MS (Ministério da Saúde). **Brasil amplia produção de medicamentos biológicos**. Capturado em: http://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/releases/release-gecis-junho-2013-ascom ms.pdf , 2013.

MUKHERJEE, J.; MAJUMDAR, S.; SCHEPER, T.; Studies on nutritional and oxygen requirements for production of L-asparaginase by *Enterobacter erogenes*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.53, 180 – 184p., 2000.

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

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Enzimas Ferramenta na Indústria; Biotecnologia. **Ciência Hoje**, 28 – 33p., 2007.

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

PATIL, SUSHRUT; COUTSOUVELIS, JOHN; SPENCER, ANDREW. Asparaginase in the management of adult acute lymphoblastic leukaemia: Is it used appropriately. **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, 202 – 207p., 2011.

PEDRESCHI, FRANCO; MARIOTTI, SALOMÉ; GRANBY, KIT; RISUM, JORGEN. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in

combination with conventional blanching, **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, 1473 – 1476p., 2011.

PELCZAR JR, MICHAEL; CHAN, E. C. S.; NRIEG, NOEL R. **Microbiologia**: conceitos e aplcações. 2. ed. São Paulo – SP: Pearson, 1997.

PETER, J.D. L-asparaginase Production by *Streptomyces griseus*. **Applied Environ Microbiology**, v. 23, 1163 – 1164p., 1972.

PETERSON, R.E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Journal Applied Microbiology,** v. 18, 64 – 67p., 1969.

POKROVSKAYA, M.V.; ALEKSANDROVA, S.S.; POKROVSKY, V.S.; OMELJANJUK, N.M.; BORISOVA, A.A.; ANISIMOVA, N.YU.; SOKOLOV, N.N. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. **Protein Expression and Purification**, v. 82, 150 – 154p., 2012.

PRISTA, A.A.; KYRIDIO, D.A. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: purification, properties and identification of essential amino acids for catalytic activity. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 216, 93 – 101p., 2001.

QIN, M.; ZHAO, F. L-Asparaginase Release from *Escherichia coli* Cells with Aqueous Two-Phase Micellar Systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 110, 11 – 21p., 2003.

RAMANI, R.; KAHN, B. T.; CHATURVEDI, V. *Tilletiopsis minor*: a New Etiologic Agent of Human Subcutaneous Mycosis in an Immunocompromised Host. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, 2992 – 2995p., 1997.

SANJAY, K.; PAKSHIRAJAN, K.; VENKATA, D.V. Development of medium for enhanced production of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied Microbiology Biotechnology,** v. 84, 477 – 486p., 2009.

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

SHAH, A. J.; KARADI, R. V.; PAREKH, P. P. Isolation, Optimization and Production of L-asparginase from Coliform Bacteria. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, 169 – 177p., 2010.

SHANMUGAPRAKASH, M.; JAYASHREE, C.; VINOTHKUMAR, V.; SENTHILKUMAR, S.N.S.; SIDDIQUI, S.; RAWAT, V., ARSHAD, M. Biochemical characterization and antitumor activity of three phase partitioned L-asparaginase from *Capsicum annuum* L. **Separation and Purification Technology**, v. 142, 258 – 267p., 2015.

SILVEIRA, FERNANDO A.; MELO, GABRIEL A. R.; ALMEIDA, EDUARDO A. B. **Abelhas brasileiras** : sistemática e identificação. 1. ed. Belo Horizonte – MG: Printed in Brazil, 2002.

SOYER, OZGE UYSAL; AYTAC, SELIN; TUNCER, AYFER; CETIN, MUALLA; YETGIN, SEVGI; SEKERE, BULENT ENIS. Alternative algorithm for L-asparaginase allergy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 123, 895 – 899p., 2009.

TAREKE, E., RYDBERG, P., KARLSSON, P., ERIKSSON, S., & TORNQVIST, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, 4998 – 5006p., 2002.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, FRANCOIS N. S.; MORE, S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, 1 – 9p., 2014.

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

TIZZOT, MARIA REGINA P. A.; FRÖHNER, CARLA R. ANDRIGHETTI; GUGELMIN, CRISTIANE; GONÇALVES, DICEZAR; HILL, JOÃO ARI GUALBERTO; LIMA, PAULO GUATAÇARA DA COSTA; DA SILVA, CRISTIANO JOSÉ. Asparaginase [EC 3.5.1.1] de *Herbaspirillum seropedicae* HSZ78 Asparaginase [EC 3.5.1.1] de *Herbaspirillum seropedicae* HSZ78. **Ciência e Cultura**, 53 – 72p., 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**, 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

URQUHART, E.J.; PUNJA, Z. K. Epiphytic growth and survival of *Tilletiopsis pallescens*, a potential biological control agent of *Sphaerotheca fuliginea*, on cucumber leaves. **Canadian Journal of Botany**, v. 75, 892 – 901p., 1997.

VACLAVIK, LUKAS; CAPUANO, EDOARDO; GOKMEN, VURAL; HAJSLOVA, JANA. Prediction of acrylamide formation in biscuits based on fingerprint data generated by ambient ionization mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source. **Food Chemistry**, v. 173, 290 – 297p., 2015.

VIDHYA, M.; AISHWARYA, R.; ALAGARSAMY, S.; RAJESH, T.S. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, 1862 – 1867p., 2010.

VIEIRA, I. C. G.; SILVA, J. M. C.; TOLEDO, P. M. Estratégias para evitar a perda de biodiversidade na Amazônia. **Estudos avançados**, v. 19, 153 – 164P., 2005.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico, **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, 123 – 137p., 2009.

ZUO, SHAOHU; XUE, DONG; ZHANG, TAO; JIANG, BO; MU, WANMENG. Biochemical characterization of an extremely thermostablel-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, 122 – 129p., 2014.

CAPÍTULO I

Tilletiopsis minor nativa isolada de pólen coletado de _Melipona_ spp. da Região Amazônica, Brasil como nova produtora de L-asparaginase

Sheylla Araujo da Silva[(1)], Tatiana Souza Porto[(2)], Anna Carolina da Silva[(1)], Erica Valente Medeiros[(2)], Francisca Simas Teixeira [(3)], José Antônio Couto Teixeira[(4)], Keila Aparecida Moreira[(2)], Ana Lucia Figueiredo Porto[(1)*].

[1]Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE);
[2]Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/UAG (Avenida Bom Pastor, s/n - Boa vista, CEP: 55292-270, Garanhuns-PE);
[3]Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Avenida. Gen. Rodrigo O. Jordão Ramos, 3000 - Campus Universitário, CEP: 69077-000, Manaus-AM);
[5] Universidade do Minho – UMINHO (Largo do Paço – Campos Gualtar, CEP: 04710-057).

RESUMO

O objetivo foi selecionar uma levedura produtora de L-asparaginase e avaliar os parâmetros de produção com intuito de elevar a produção enzimática. Foram utilizadas 21 linhagens de leveduras e a levedura com maior atividade de L-asparaginase foi identificada por sequenciamento de DNA utilizando os primers NL-1 e NL-4, também foram avaliados os parâmetros de produção através de dois planejamentos estatísticos, Plackett-Burman (PB) e Central Composto (CCD). As variáveis analisadas foram L-asparagina, glutamato monossódico, peptona, extrato de levedura, glicose, triptona, K_2HPO_4, $MgSO_4$, pH, temperatura e tempo. A levedura selecionada foi uma *Tilletiopsis minor* e as variáveis significativas apresentadas pelo PB foram L-asparagina, extrato de levedura e $MgSO_4$. Nas melhores condições encontradas para a produção a partir dos planejamentos estatísticos foi possível obter uma atividade de asparaginase de 1975,67 $U.mL^{-1}$ com 25 $g.L^{-1}$ de L-asparagina, 40 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 0,35 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$ com meio ajustado para pH 5,0, a 28°C, durante 72 horas. A *Tilletiopsis minor* estudada demonstrou potencial como nova fonte produtora de L-asparaginase.

Palavras-Chaves: L-asparaginase; produção; levedura; *Tilletiopsis minor*.

1 Introdução

As leveduras estão entre os mais importantes sistemas de expressão eucarióticos disponíveis para a produção enzimática de interesse biotecnológico, devido a fácil manipulação genética que permite a introdução de múltiplas cópias de genes heterólogos de forma estável, elevando os níveis de expressão. Além dos seus processos fermentativos serem amplamente dominâveis, o que permite um fácil escalonamento para os níveis de produção comercial (Bon et al., 2008).

Leveduras do gênero *Tilletiopsis* são fungos basidiomicotas com ID taxonômica NCBI374295, sugeridas em 1930 por Derx, seus estudos ainda são escassos com apenas 48 publicações de acordo com o catálogo global de micro-organismos, sem nenhum relato na literatura de pesquisas voltadas para a produção de L-asparaginase.

L-asparaginase é uma amidohidrolase (CE 3.5.1.1) sendo uma das principais enzimas de uso terapêutico. Sua ação é catalisar a hidrólise de L-asparagina a ácido aspártico e amônia (Mahajan et al., 2012; Chohan e Rashid, 2013). A L-asparagina é um aminoácido importante no requisito nutricional das células normais e cancerosas. A administração da enzima, L-asparaginase, destrói a fonte livre de L-asparagina induzindo as células cancerosas a um colapso metabólico acarretando sua morte. Sua aplicação está destinada principalmente, ao tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) (Kenari et al., 2011; Emadi et al., 2014).

O potencial antitumoral da L-asparaginase tem sido bem documentado (Abdel-Fattah et al., 2002). A L-asparaginase com aplicações biológicas são produzidas a partir de *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas acidivoras* e *Pseudomonas geniculata* sob condições aeróbicas (Verma et al., 2007; Thenmozhi et al., 2011; Zuo et al., 2014). A descoberta de uma nova L-asparaginase sorologicamente diferente, mas com potencial terapêutico é altamente desejada (Abdel-Fattah et al., 2002; Makky et al., 2014).

A enzima L-asparaginase pode ser obtida de plantas, animais e dos mais variados micro-organismos, mas as enzimas comercializadas para o uso clínico são provenientes de *Erwinia chrysanthemi* e *Escherichia coli* (Kumar et al., 2011; Zuo et al., 2014).

Considerando que cada organismo tem suas próprias condições específicas para a produção máxima da enzima, são poucas as informações disponíveis sobre a otimização estatística das condições do meio para a produção de L-asparaginase (Kenari et al., 2011). A avaliação e seleção dos parâmetros de produção de um micro-organismo são etapas importantes para desenvolver e determinar a viabilidade econômica global de bioprocessos (Abdel-Fattah e Olama, 2002; Venil et al, 2009; Shah et al., 2010; Kumar e Sobha 2012).

O uso de métodos convencionais para analisar e selecionar inúmeras variáveis objetivando otimizar o processo de produção, são métodos demorados e de custos elevados (Singh e Satyanarayana, 2008). No desenvolvimento de um processo em busca de um produto, é comum os pesquisadores apresentarem um grande número de variáveis a serem analisadas. Sendo assim, o planejamento fatorial fracionário é uma importante ferramenta para analisar até 8 variáveis. Acima deste número, pode-se fazer o uso do método desenvolvido por Plackett e Burman, através do planejamento estatístico. Este planejamento, se bem utilizado, é muito valioso para o direcionamento de pesquisas. (John, 1996; Rodrigues e Iemma, 2005).

O objetivo deste estudo foi identificar uma nova fonte de L-asparaginase entre leveduras nativas e avaliar parâmetros de produção, através dos planejamentos estatísticos Plackett-Burman e Central Composto, potencializando a produção de L-asparaginase.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismos e Manutenção

As leveduras utilizadas foram isoladas de pólen de *Meliponas* spp. na região Amazônica por representantes do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas - DPUA/UFAM e gentilmente cedidas para este trabalho, pela coleção de cultura do referido Departamento.

As 21 culturas de leveduras foram mantidas em ágar Sabouraud acondicionadas a 4°C. A reativação foi feita em frascos de Erlenmeyer contendo caldo glicosado (peptona de carne 10 $g.L^{-1}$, extrato de carne 3,0 $g.L^{-1}$ e glicose 20 gL^{-1}), incubadas a 28°C, 140 rpm, por 24 horas.

2.2 Condições de cultivo e seleção do micro-organismo

Para a seleção da melhor levedura produtora de L-asparaginase utilizou-se o meio sabouraud líquido adicionado de $MgSO_4$ (1,0 $g.L^{-1}$) e L-asparagina (10 $g.L^{-1}$), autoclavado a 121°C durante 20 minutos. O meio foi inoculado após a padronização do inóculo em espectrofotômetro a 600 nm, seguido de incubação em agitador orbital a 28°C, 140 rpm durante 72 horas. Após o período de fermentação, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e o seu sobrenadante foi utilizado nos demais ensaios enzimáticos para seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase. A escolha da levedura levou em consideração uma alta atividade para L-asparaginase e uma baixa dosagem de proteína. A levedura selecionada foi identificada através de sequenciamento genético pela BIOPREMIER – Inovação e Serviços em Biotecnologia, SA. Lisboa - Portugal.

2.3 Identificação taxonômica por sequenciamento genético

A identificação do micro-organismo selecionado foi realizada através de sequenciamento de DNA em parceria com a empresa de Inovação e Serviços em Biotecnologia, S.A. – BIOPREIMER, Lisboa – Portugal. O método utilizado, foi descrito por Kurtzman e Robnett (1997) através do sequenciamento da região D1/D2 do 28S do rDNA para reconhecimento da espécie. Os “primers” utilizados foram os iniciadores externos NL-1 (5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) e NL-4 (5’-GGTCCGTGTTTCAAGAC GG).

2.4 Dosagem de Proteína

O teor de proteína total foi realizado conforme metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue* G 250, mediante a curva de calibração realizada a partir de soluções estoques de soroalbumina bovina (BSA) em diferentes concentrações (0-100 µg/mL) submetidas à leitura de absorbância a 595nm em espectrofotômetro.

2.5 Atividade de L-asparaginase

A L-asparaginase foi quantificada de acordo com o método descrito por Shinfrin et al. (1974). A reação foi composta por 0,1 mL do extrato enzimático, 1 mL de solução tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,6), 0,9 mL de água deionizada e 0,1 mL de solução de L-asparagina (0,189 M), os quais, foram homogeneizados e incubados a 37°C durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético (1,5 M) e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos. 0,2 mL do sobrenadante foram diluídos em 4,3 mL de água deionizada, acrescido de 0,5 mL de reagente de Nessler's. A densidade óptica foi mensurada no comprimento de onda de 405 nm em espectrofotômetro. Onde, uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de amônia por minuto a 37°C.

2.6 Planejamento experimental Plackett-Burman

Após a seleção da melhor cultura de levedura produtora de L-asparaginase, o planejamento Plackett-Burman, foi aplicado com a ajuda do software estatístico Statistica 8.0, para analisar a significância das variáveis investigadas neste estudo. Os intervalos e níveis de variáveis investigadas estão apresentados na Tabela 1. O planejamento PB é adequado para investigar os efeitos de um grande número de parâmetros de um ensaio experimental, sendo utilizado para determinar os fatores que têm contribuições significativas e uma abordagem linear é considerada suficiente para a seleção:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \ (i = 1,2,3,\ldots,k)$$

Onde Y é a resposta, X_i é uma variável e β_i são os coeficientes de regressão. O efeito de cada variável é a diferença entre a média das medições realizadas com o nível elevado do fator e com a média das medições com o nível baixo do fator, determinada pela seguinte equação:

$$\text{Efeito} = 2[\sum P_{i+} - \sum P_{i-}]/N$$

Onde P_{i+} refere-se a todas as respostas quando o componente for em um dos níveis elevados. Já P_{i-} indica todas as respostas quando o componente for em um dos níveis baixos, e N é o número total de interações.

Tabela 1 - Nível de cada variável analisada pelo planejamento experimental Plackett-Burman para avaliar a produção de L-asparaginase.

Variáveis	Fontes	Menor nível (-1)	Maior nível (+1)
		$g.L^{-1}$	$g.L^{-1}$
A – L-asparagina	Carbono	2,5	15,0
B – GM[(a)]	Nitrogênio	5,0	20,0
C – Peptona	Nitrogênio	0,0	1,0
D – Ext. de Lev.[(b)]	Nitrogênio	2,5	20,0
E – Glicose	Carbono	5,0	30,0
F – Triptona	Nitrogênio	0,0	5,0
G – K_2HPO_4	K^+ e PO_4^{3-}	0,0	1,0
H – $MgSO_4$	Mg^{2+}	0,0	1,0
I – pH		5,0	8,0
J – Temperatura (°C)		28	36
K – Tempo (h)		72	120

[(a)] Glutamato monossódico e [(b)] Extrato de levedura.

2.7 Planejamento Central Composto

Para estudar as interações entre as variáveis significantes apresentadas pelo planejamento Plakett-Burman, foi aplicado um planejamento Central Composto objetivando para melhorar a produção de L-asparaginase. As variáveis significativas foram estudadas em cinco níveis diferentes como apresentado na Tabela 2.

Foi realizado um planejamento central composto, incluindo seis pontos axiais e seis repetições no ponto central, totalizando 20 ensaios. Para a análise dos dados experimentais obtidos foi utilizado o software estatístico Statistica 8.0.

Tabela 2 - Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento central composto para produção de L-asparaginase.

Variáveis Independentes	Níveis ($g.mL^{-1}$)				
	-α	-1	0	+1	+α
L-asparagina	10,0	17,50	25,00	32,50	40,00
Extrato de Levedura	15,0	21,25	27,50	33,75	40,00
$MgSO_4.7H_2O$	0,00	0,175	0,350	0,525	0,70

3 Resultados e discussão

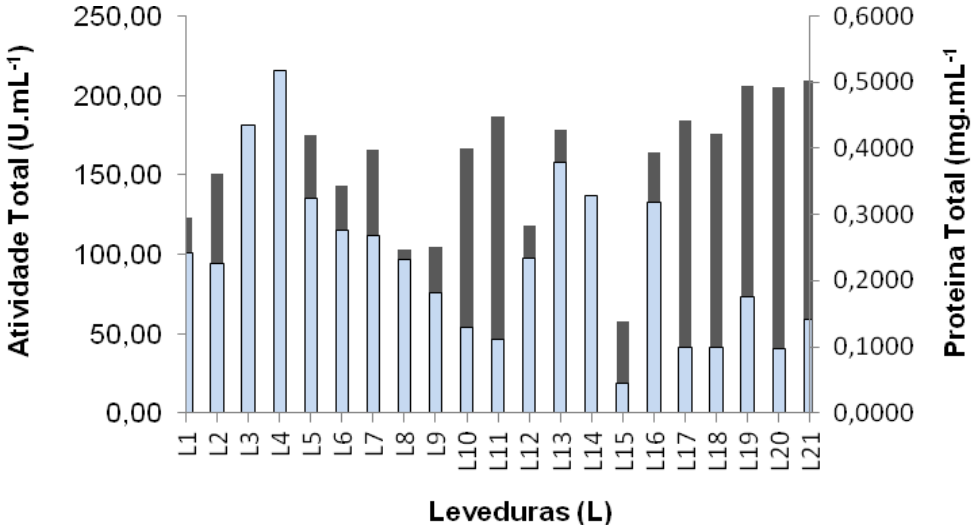
3.1 Seleção de leveduras produtoras de L-asparaginase

Todas as 21 leveduras selvagens isoladas de pólen de *Melipona* spp. da Amazônia, apresentaram produção enzimática para L-asparaginase (Figura 1). No entanto, a L19, L20 e L21 apresentaram as maiores atividades para L-asparaginase. Entre as três leveduras com maior atividade, a selecionada foi a linhagem L20.

Na composição do meio de cultivo utilizado na seleção do micro-organismo foi adicionado 10 $g.L^{-1}$ de L-asparagina e 0,5 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$ com objetivo de induzir a produção enzimática. De acordo com o estudo de Chow e Ting (2014), foram utilizadas as mesmas concentrações de L-asparagina e $MgSO_4$ no meio de cultivo para a seleção do melhor micro-organismo produtor de L-asparaginase.

Foi possível realizar com precisão a identificação da espécie de levedura selecionada nesse trabalho, com base na sua sequência de nucleotídeos, identificada como sendo uma *Tilletiopsis minor*. De acordo com Agustini (2014), é comum a variabilidade intraespecífica podendo levar ao insucesso na identificação das linhagens por PCR-RFLP. Desta forma, a técnica de sequenciamento é fundamental para garantir a correta designação das linhagens.

Figura 1 - Níveis de atividade de L-asparaginase (▬) e de proteína total (▬) apresentados pelas leveduras isoladas de pólen coletados de abelhas da Região Amazônica.



3.2 Influência das variáveis na produção de L-asparaginase utilizando Plackett-Burmam

A levedura *Tilletiopsis minor* foi cultivada em meios de produção com diferentes condições. A Tabela 3 apresenta resultados obtidos do planejamento PB tendo como resposta a atividade de L-asparaginase ($U.mL^{-1}$). A maior atividade de L-asparaginase, foi apresentada pelo ensaio 10. Os resultados obtidos variaram de 57,61 $U.mL^{-1}$ a 1044,83 $U.mL^{-1}$, demonstrando a influência que as variáveis têm sobre a produção de L-asparaginase. Deste modo, corroboramos que os parâmetros de produção e as condições de cultivo são essenciais para a biossíntese da L-asparaginase e podem variar de um micro-organismo para outro (Barnes et al., 1978; Kumar e Sobha, 2012).

De acordo com relatos descritos por Kumar e Sobha (2012), as fontes de nitrogênio e de carbono estão relacionadas ao desenvolvimento de biomassa e a presença de glutamato monossódico não influenciaria na produção enzimática. Embora, o estudo realizado por Arrivukkasan et al. (2010) apresenta o glutamato monossódico (20 $g.L^{-1}$) na composição do meio otimizado para a produção de L-asparaginase por *Pectobacterium carotovorum*.

As variáveis significantivas indentificadas pelo Plackett-Burman para produção de L-asparaginase quando tem efeitos positivos, indicam que em concentrações mais elevadas a atividade de L-asparaginase foi maior, enquanto que as variáveis significativas com efeitos negativos apresentaram maiores valores de atividade de L-asparaginase em concentrações mais baixas da variável em questão.

O planejamento Plackett-Burman indentificou a L-asparagina, o extrato de levedura e o $MgSO_4.7.H_2O$ como as variáveis significativas, sendo as duas primeiras com efeito positivo e o $MgSO_4$ com efeito negativo (Figura 2). Resultados semelhantes foram apresentados por Kumar et al. (2010) ao realizar um planejamento fatorial 2^3 identificando L-asparagina e extrato de levedura como variáveis significativas para a produção de L-asparaginase.

Figura 2 - Efeito das variáveis analisadas pelo Plackett-Burman, sobre a atividade de L-asparaginase produzida por *Tilletiopsis minor*.

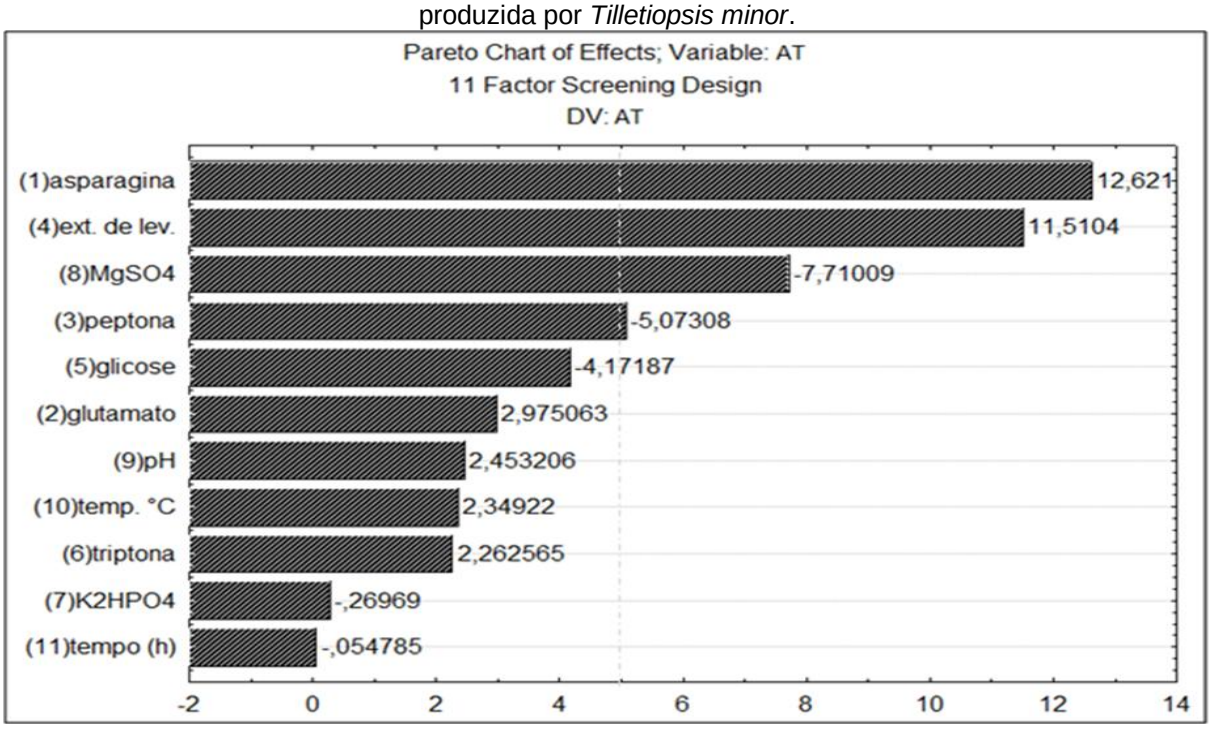


Tabela 3 - Matriz do Planejamento Plackett-Burman utilizado para avaliar a produção de L-asparaginase.

Ensaio	L-asp.[(a)]	GM[(b)]	Peptona	EL[(c)]	Glicose	Triptona	K_2HPO_4	$MgSO_4$	pH	°C[(d)]	h[(e)]	AT[(f)] ($U.ml^{-1}$)
1	15 (+)	5,0 (–)	1,0 (+)	2,5 (–)	5,0 (–)	0,0 (–)	1,0 (+)	1,0 (+)	8,0 (+)	28 (–)	120 (+)	358,72
2	15 (+)	20 (+)	0,0 (–)	20 (+)	5,0 (–)	0,0 (–)	0,0 (–)	1,0 (+)	8,0 (+)	36 (+)	72 (–)	672,33
3	2,5 (–)	20 (+)	1,0 (+)	2,5 (–)	30 (+)	0,0 (–)	0,0 (–)	0,0 (–)	8,0 (+)	36 (+)	120 (+)	249,00
4	15 (+)	5,0 (–)	1,0 (+)	20 (+)	5,0 (–)	5,0 (+)	0,0 (–)	0,0 (–)	5,0 (–)	36 (+)	120 (+)	708,72
5	15 (+)	20 (+)	0,0 (–)	20 (+)	30 (+)	0,0 (–)	1,0 (+)	0,0 (–)	5,0 (–)	28 (–)	120 (+)	969,83
6	15 (+)	20 (+)	1,0 (+)	2,5 (–)	30 (+)	5,0 (+)	0,0 (–)	1,0 (+)	5,0 (–)	28 (–)	72 (–)	385,39
7	2,5 (–)	20 (+)	1,0 (+)	20 (+)	5,0 (–)	5,0 (+)	1,0 (+)	0,0 (–)	8,0 (+)	28 (–)	72 (–)	580,94
8	2,5 (–)	5,0 (–)	1,0 (+)	20 (+)	30 (+)	0,0 (–)	1,0 (+)	1,0 (+)	5,0 (–)	36 (+)	72 (–)	932,06
9	2,5 (–)	5,0 (–)	0,0 (–)	20 (+)	30 (+)	5,0 (+)	0,0 (–)	1,0 (+)	8,0 (+)	28 (–)	120 (+)	407,33
10	15 (+)	5,0 (–)	0,0 (–)	2,5 (–)	30 (+)	5,0 (+)	1,0 (+)	0,0 (–)	8,0 (+)	36 (+)	72 (–)	1044,83
11	2,5 (–)	20 (+)	0,0 (–)	2,5 (–)	5,0 (–)	5,0 (+)	1,0 (+)	1,0 (+)	5,0 (–)	36 (+)	120 (+)	57,61
12	2,5 (–)	5,0 (–)	0,0 (–)	2,5 (–)	5,0 (–)	0,0 (–)	0,0 (–)	0,0 (–)	5,0 (–)	28 (–)	72 (–)	119,83

(a) L-asparagina, (b) Glutamato Monossódico, (c) Extrato de Levedura, (d) temperatura em grau Celsius, (e) hora de cultivo e (f) Atividade Total. As concentrações estão em $g.^{L-1}$.

3.3 Otimização do meio de cultura para produção de L-asparaginase através do Planejamento Central Composto

As variáveis significativas foram combinadas pelo Planejamento Central Composto para avaliar o efeito e a contribuição de cada variável para a produção de L-asparaginase. Porém apenas duas variáveis por vez podem ser combinadas para análise de superfíce de resposta.

Após as análises foram obtidos os resultados apresentados na Tabela 4 com atividade máxima para L-asparaginase de 1975,67 $U.mL^{-1}$ descrita pelo ensaio 12 nas seguintes condições em $g.L^{-1}$: 25 de L-asparagina, 40 de extrato de levedura, 0,35 de $MgSO_4.7H_2O$ e 5,0 de glicose, com pH 5,0, a 28°C, 140 rpm, durante 72 horas, em agitador orbital. Estudo com produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus*, apresentaram melhores condições de cultivo em pH 6,0, 30°C e 160 rpm durante 72 horas (Baskar et al., 2010a).

Os resultados estatísticos obtidos após a análise de variância (ANOVA) estão descritos na Tabela 5. A relação da variação de Fisher (*valor-F*) e *valor-p* de ANOVA foram usadas para confirmar a significância das variáveis estudadas. O maior *valor-F* encontrado aponta que as variáveis explicam adequadamente a variação nos dados sobre sua média, e que os efeitos das variáveis estimadas foram reais.

Observou-se que o extrato de levedura e a interação entre L-asparagina e $MgSO_4$ foram significativos considerando $p < 0,05$. As variáveis analisadas foram significativas e com efeito positivo, indicando que os maiores níveis das variáveis foram melhores para atividade de L-asparaginase. A interação (1x3) entre L-asparagina (1) e a concentração de $MgSO_4$ (3) também foi significativa, indicando que os maiores níveis combinados da L-asparagina e do $MgSO_4$ apresentaram maiores valores de atividade. Resultados semelhantes foram descritos por Mahajan et al. (2012), concluindo que o aumento da L-asparaginase e do sal $MgSO_4$ aumentaram a produção de L-asparagina com atividade máxima com 40 $g.mL^{-1}$ de L-asparagina e 0,5 $g.mL^{-1}$ de $MgSO_4$.

Tabela 4 - Matriz do planejamento Central Composto para atividade de L-asparaginase como variável resposta.

Ensaios	L-asparagina	Extrato Levedura	$MgSO_4$	AT* ($U.mL^{-1}$)
1	1,75 (-1)	2,125 (-1)	0,0175 (-1)	34,83
2	1,75 (-1)	2,125 (-1)	0,0525 (+1)	6,22
3	1,75 (-1)	3,375 (+1)	0,0175 (-1)	231,78
4	1,75 (-1)	3,375 (+1)	0,0525 (+1)	229,83
5	3,25 (+1)	2,125 (-1)	0,0175 (-1)	84,00
6	3,25 (+1)	2,125 (-1)	0,0525 (+1)	640,67
7	3,25 (+1)	3,375 (+1)	0,0175 (-1)	154,56
8	3,25 (+1)	3,375 (+1)	0,0525 (+1)	1344,00
9	1,00 (-α)	2,750 (0)	0,035 (0)	194,00
10	4,00 (+α)	2,750 (0)	0,035 (0)	154,83
11	2,50 (0)	1,500 (-α)	0,035 (0)	154,56
12	2,50 (0)	4,000 (+α)	0,035 (0)	1975,67
13	2,50 (0)	2,750 (0)	0,000 (-α)	227,89
14	2,50 (0)	2,750 (0)	0,070(+α)	105,67
15	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	425,67
16	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	68,17
17	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	413,72
18	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	579,00
19	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	286,50
20	2,50 (0)	2,750 (0)	0,035 (0)	520,67

* Atividade Total. A unidade utilizada está em %.

Tabela 5 - Análise de variância para as variáveis significativas das condições de produção de L-asparaginase pela levedura selvagem *Tilletiopsis minor.*

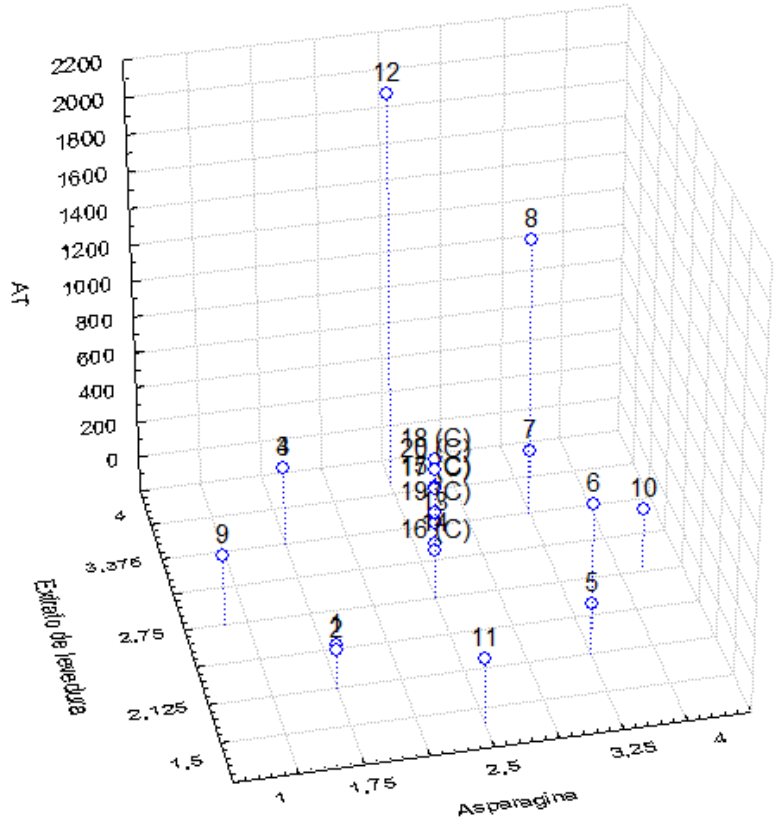
Fatores	SS[a]	df[b]	MS[c]	*F*-value	*p*-value
(1) L-asparagina (L)	200484	1	200484	5,94691	0,058753
L-asparagina (Q)	148815	1	148815	4,41425	0,089638
(2) Extrato de levedura (L)	**1327066**	**1**	**1327066**	**39,36442**	**0,001510**
Extrato de levedura (Q)	**655606**	**1**	**655606**	**19,44708**	**0,006957**
(3) $MgSO_4$ (L)	166957	1	166957	4,95241	0,076606
$MgSO_4$ (Q)	156830	1	156830	4,65201	0,083519
1L x 2L	15606	1	15606	0,46290	0,526492
1L x 3L	**394568**	**1**	**394568**	**11,70397**	**0,018816**
2L x 3L	54358	1	54358	1,61242	0,260039
Falta de ajuste	**990871**	**5**	**198174**	**5,87839**	**0,037158**
Erro Puro	168562	5	33712		
Total SS	4385621	19			

[a] soma dos quadrados; [b] grau de liberdade; [c] media quadrática.

Os resultados experimentais foram representados na forma de gráfico tridimensional (Figura 3). A resposta da análise evidenciou a existência de uma melhor região para a atividade de L-asparaginase, em que há a combinação entre as faixas de 1,0% – 4,0% de L-asparagina e 1,5% – 4,0% de extrato de levedura.

Embora as variáveis tenham apresentado influência sobre a produção da enzima a análise estatística demonstrou que existiu falta de ajuste para explicar o fenômeno de produção de L-asparaginase por um modelo matemático. Devido a isso não foi possível otimizar a produção e uma superfície de resposta não pode ser construída. Porém a Figura 3 apresenta a relação entre as variáveis L-asparagina e extrato de levedura sobre a produção da enzima, o que demonstra claramente a melhor produção da L-asparaginase no ensaio 12.

Figura 3 - Representação tridimensional dos ensaios em função das concentrações de extrato de levedura e L-asparagina para a produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*.



4 Conclusão

O trabalho apresenta uma levedura nativa do gênero *Tilletiopsis minor* como uma nova fonte produtora de L-asparaginase. A técnica de sequenciamento genético foi necessária para a identificação da levedura selecionada e através da avaliação dos parâmetros de produção, a levedura selecionada teve sua atividade de L-asparaginase elevada em 89% quando cultivada nas melhores condições encontradas para L-asparagina, extrato de levedura e $MgSO_4.7H_2O$. A escassez na literatura de leveduras produtoras de L-asparaginase e os poucos estudos de forma geral, com o gênero *Tilletiopsis*, demonstra o potencial científico do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

ABDEL-FATTAH, YASSER R.; OLAMA, ZAKIA A. L-asparaginase production by Pseudomonas aeruginosa in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, 115 – 122p., 2002.

ANESE, MONICA; QUARTA, BARBARA; FRIAS, JESUS. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, 435 – 440p., 2011.

AGUSTINI, Bruna C. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF**, 2014. 128 f. Tese – Doutorado em Ciências Farmacêutica na área de Insumos, Medicamentos e Correlatos – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2014.

BARNES, W. R.; VELA, G. R.; DORN, G. L. Physiology of L-asparaginase synthesis in recombinants of *Escherichia coli* A-1*.* **Applied end Environmental Microbiology**, v. 35, 766 – 770p., 1978.

BASKAR, G.; SRIHARINI, C.; SRIPRIYA, R.; RENGANATHAN, S. Statistical Screening of Supplementary Nitrogen Source for Enhanced Production of L-Asparaginase by *Aspergillus terreus* 1782. **Chemical and Biochemical Engineering**, v. 24, 467 – 472p., 2010a.

BASKAR, GURUNATHAN; RENGANATHAN, SAHADEVAN. Optimization of Media Components and Operating Conditions for Exogenous Production of Fungal L-asparaginase. **Journal-science**, v. 38, 270 – 279p., 2011b.

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, 50 – 58p.2011c.

BON, ELBA P. S.; FERRARA, MARIA ANTONIETA; CORVO, MARIA LUISA. **Enzimas em Biotecnologia**: Produção, Aplicações e Mercado, 1. ed. Rio de Janeiro – RJ: Interciência, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, 248 – 254p., 1976.

CAMPBELL, NEIL A.; REECE, JANE B. **Biologia**, 8. ed. Porto Alegre – RS: Artmed, 2010.

CHOHAN, SHAHID MAHMOOD; RASHID, NAEEM. TK1656, a thermostable L-asparaginase from Thermococcus kodakaraensis, exhibiting highest ever reported

enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, 438 – 443p., 2013.

EMADI, ASHKAN; ZOKAEE, HANIA; SAUSVILLE, EDWARD A. Asparaginase in the treatment of non‐ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, 875 – 883p., 2014.

GECKIL H; GENCER, S. Production of L-Asparaginase in *Enterobacter aerogenes* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for efficient oxygen uptake. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, 691 – 697p., 2004.

JOHN, PETER W. M. Nesting Plackett-Burman designs. **Statistics and Probability Letters**, v. 27, 221 – 223p., 1996.

KENARI, SEYEDEH LALEH DASHTBAN; ALEMZADEH, IRAN; MAGHSODI, VIDA. Production of l-asparaginase from Escherichia coli ATCC 11303: Optimization by response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 8, 315 – 321p., 2011.

KUMAR, V. SANJAY; DASU, VENKATA; PAKSHIRAJAN, K. Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from Pectobacterium carotovorum MTCC 1428. **Bioresource Technology**, v. 102, 2077 – 2082p., 2011a.

KUMAR, DEVARAI SANTHOSH; SOBHA, KOTA. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. **Advances in Bioresearch**, v. 3, 137 – 157p., 2012b

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification of Clinically Important *Ascomycetous* Yeasts Based on Nucleotide Divergence in the 59 End of the Large-Subunit (26S) Ribosomal DNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, 1216 – 1223p., 1997

MAHAJAN, RICHI V.; SARAN, SAURABH; KARTHIKEYA, K.;KUMAR, VINOD; SAXENA, R.K. Efficient production of L-asparaginase from Bacillus licheniformis with low-glutaminse activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, v. 125, 11 – 16p., 2012.

MAKKY, ESSAM A.; LOH, YEAN CHUN; KARIM, MD. REZAUL. Purification and partial characterization of a low molecular weight L-asparaginase produced from corn cob waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, 265 – 270p., 2014.

RODRIGUES, MARIA ISABEL; IEMMA, ANTONIO FRANCISCO. **Planejamento de experimento e otimização de processos**: uma estratégia sequencial de planejamento, 1. ed. Campinas – SP: Casa do Pão, 2005.

SHAH, A. J.; KARADI, R. V.; PAREKH, P. P. Isolation, Optimization and Production of L-asparginase from Coliform Bacteria. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, 169 - 177p., 2010.

SHIFRIN, SIDNEY; PARROTT, CATHERINE L.; LUBORSKY, SAMUEL W W. Substrate Binding and Intersubunit Interactions in L-Asparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, 1335 – 1340p., 1974.

SINGH, BIJENDER.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by a thermophilic mould Sporotrichum thermophile in solid state fermentation and its potential applications, **Bioresource Technology**, v. 99, 2824 – 2830p., 2008.

VENIL, CHIDAMBARAM KULANDAISAMY; NANTHAKUMAR, KUPPANAN; KARTHIKEYAN, KANNAN; LAKSHMANAPERUMALSAMY, PERUMALSAMY. Production of l-asparaginase by *Serratia marcescens* SB08: optimization by response surface methodology. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 7, 10 – 30p. 2009.

VERMA, NEELAM; KUMAR, KULDEEP; KAUR, GURNOOR; ANAND, SNEH. L-asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent. Critical Reviews in **Biotechnology**, v. 27, 45 – 62p., 2007.

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

ZUO, SHAOHUA; XUE, DONG; ZHANGA, TAO; JIANGA, BO; MU, WANMENG. Biochemical characterization of an extremely thermostablel-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, 122 – 129p., 2014.

CAPÍTULO II

Tilletiopsis minor produtra de L-asparaginase termoestável com potencial antiacrilamida

Sheylla Araujo da Silva[(1)], Tatiana Souza Porto[(2)], Thiago Pajeu Nascimento[(3)], Alana Emilia Soares de França Queiroz[(1)], Sara Isabel da Cruz Silvério[(5)], Tatiana de Holanda[(4)], Keila Aparecida Moreira[(2)], José Antônio Couto Teixeira[(5)] e Ana Lucia Figueiredo Porto[(1)*].

[1]Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE (Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, CEP: 52171-900, Recife-PE);
[2]Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE/UAG (Avenida Bom Pastor, s/n - Boa vista, CEP: 55292-270, Garanhuns-PE);
[3]Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Avenida professor Morais Rego, 1235 – Cidade Universitaria, CEP: 5067090, Recife-PE);
[4]Universidade Federal do Ceara – UFC (Avenida da Universidade, 2853 - Benfica, CEP, 60020-181, Fortaleza-CE);
[5] Universidade do Minho – UMINHO (Largo do Paço – Campos Gualtar, CEP: 04710-057, Braga-PT).

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a capacidade da levedura *Tilletiopsis minor* na produção de L-asparaginase, analisando o efeito da concentração de glucose (0,5%, 1,0% e 5,0%) e do arejamento (variando a razão volume do meio de cultura/volume do matraz entre 20 e 40 %) na atividade enzimática obtida. Após uma purificação preliminar da enzima, foi efetuada a sua caracterização bioquímica e avaliado o seu potencial como agente antiacrilamida. Os melhores resultados para a produção de L-asparaginase foram obtidos para uma concentração de glucose de 1% e uma aeração a 40%. A caracterização bioquímica da enzima purificada foi realizada com sulfato de amônia, com um fator de purificação de 7,8 na fração de 20-40%. O pH e temperatura ótima da enzima são 7,0 e 50°C, sendo o Na^+ o íon com maior efeito inibitório na atividade de L-asparaginase. O perfil eletroforético obtido em SDS-PAGE demonstrou a existência de uma banda mais acentuada de 80,5kDa, correspondente à presença da L-asparaginase. Verificou-se também que o

extrato bruto de L-asparaginase inibiu totalmente a formação de poliacrilamida (numa solução de acrilamida a 30%, evidenciando o potencial da L-asparaginase produzida por *Tilletiopsis minor* para aplicações na indústria de alimentos.

Palavras-Chaves: L-asparaginase, acrilamida, *Tilletiopsis*, levedura.

1 Introdução

A enzima terapêutica L-asparaginase (EC.3.5.1.1) além do potencial antitumoral vem sendo utilizada para reduzir a formação de acrilamida em alimentos fritos, de forno ou cozidos. A acrilamida é considerada um "potente" carcinogéno em seres humanos, potencial este, ativado quando alimentos ricos em carboidratos contendo açúcares redutores e o aminoácido asparagina, são submetidos a temperaturas acima dos 100°C, devido à reação de Maillard entre o aminoácido asparagina e uma fonte de carbono (Anese et al., 2011; Pedreschi et al., 2011). A Reação de Maillard é responsável pela cor marrom e sabor dos alimentos fritos, torrados e assados. Estudos descrevem que tal reação é a principal via para a formação de acrilamida em produtos alimentares aquecidos (Lineback & Jones, 2011; Pedreschi et al., 2011; Mahajan et al., 2012; Bartkiene et al., 2013).

A concentração de acrilamida em produtos alimentícios processados tornou-se um sério problema de saúde (Bartkiene et al., 2013). No entanto, a desaminação da asparagina impede a formação da acrilamida (Ciesarova et al, 2006; Mahajan et al., 2012), que pode ser realizada pela asparaginase (JECFA, 2007).

A maioria dos métodos utilizados com o intuito de atenuar a formação da acrilamida, estão associados à remoção dos seus precursores (glicose, frutose e asparagina) e na redução ou até inibição das reações de Maillard através de modificações no processamento dos alimentos. Técnicas de pós-fritura também poderiam ser implementadas para diminuir a formação da acrilamida. Entre todos os alimentos possíveis de formação de acrilamida, o maior desafio é reduzir seus níveis em batatas fritas, sem comprometer as propriedades sensoriais do produto (Pedreschi, 2011). Uma alternativa descrita por Hendriksen e colaboradores (2009) seria a utilização da enzima L-asparaginase, uma vez que sua aplicação sobre os alimentos, não prejudica as propriedades nutricionais e sensoriais dos mesmos.

Comercialmente a L-asparaginase vem sendo utilizada como aditivo em alimentos e é produzida por *Aspergillus oryzae* geneticamente modificado, o qual recebeu reconhecimento com status de seguro pelo GRAS pela FDA (Generally Recognized As Safe and Food and Drugs Admisnistration) e avaliação favorável pela FAO/WHO (Food and Agricultural Organization and World Health Organization) (JECFA, 2007). Este aditivo é permitido nos Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Dinamarca. Enquanto que no Canadá, onde as enzimas usadas em aplicações de alimentos podem ser consideradas aditivos alimentares, já receberam propostas para alterarem os seus regulamentos objetivando a liberação do uso de asparaginase como mais uma enzima aplicada como aditivo (Health Canada, 2009). O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da glicose e arejamento na produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*, efetuar a caracterização bioquímica da enzima produzida e avaliar o seu potencial contra a formação de acrilamida.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo e manutenção

A *Tilletiopsis minor* utilizada foi obtida da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas - DPUA/UFAM. As culturas foram mantidas em meio agar Sabouraud e armazenadas a 4°C. A reativação das culturas foi realizada em caldo glicosado composto por peptona de carne 1% (p/v), extrato de carne 0,3% (p/v) e glicose 4% (p/v), autoclavados a 121°C durante 20 minutos.

2.2 Produção de L-asparaginase

A produção de L-asparaginase foi realizada em meio líquido composto por L-asparagina 2,5% (p/v), extrato de levedura 4,0% (p/v), $MgSO_4$ 0,035% (p/v) e glicose 0,5% (p/v) autoclavados a 121°C durante 20 minutos. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro a 600nm e o cultivo submerso foi realizado em Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de meio, incubado em agitador orbital a 28°C e 140 rpm durante 72 horas. O líquido metabólico produzido, foi submetido à centrifugação em

10.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante obtido, denominado de extrato enzimático bruto, foi utilizado nos demais ensaios analíticos para L-asparaginase.

2.3 Avaliação do efeito da glicose sobre a produção de L-asparaginase e a biomassa.

O efeito da glicose foi avaliada em três etapas envolvendo o cultivo submerso da *Tilletiopsis minor*: na etapa 1, foi utilizado três meios a partir do meio descrito no item 2.2, variando apenas a concentração inicial da glicose em 0,5%, 1,0% e 5,0% os quais, foram cultivados durante 120 horas. O crescimento foi avaliado de acordo com a metodologia descrita por Rodrigues e colaboradores (2006), através da densidade óptica padronizada em espectrofotômetro a 600 nm. Ao longo de todo o tempo de cultivo foram coletadas amostras em diferentes intervalos de tempo para avaliar a concentração de biomassa ($g.L^{-1}$) e quantificar a atividade de L-asparaginase.

Na etapa 2, a *Tilletiopsis minor* foi submetida a uma nova fermentação em meio descrito no item 2.2, exceto pela glicose. Nesse caso, foi utilizada como concentração inicial concentração selecionada na etapa 1 (1%) como sendo a melhor para a produção de L-asparaginase. Nessa etapa, foi feita uma adição extra de glicose as 48 horas de cultivo, afim de avaliar se a adição de glicose por partidas teria efeito na produção da enzima.

A etapa 3 foi feita para avaliar o efeito combinado da glicose e da aeração na produção de L-asparaginase através de um planejamento fatorial. Durante essa etapa foram coletadas amostras a cada 24 horas durante 120 horas (tabela 1). As variáveis independentes glicose e aeração foram avaliadas em três níveis diferentes: -1, 0, +1. Todos os ensaios envolvendo as três etapas descritas foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL submetidos a 28°C e 140 rpm em agitador orbital durante 120 horas.

Tabela 1 Níveis das variáveis independentes utilizadas no planejamento fatorial.

Variáveis Independentes	-1	0	+1
Glicose (%)	1	3	5
Aeração (%)*	20	30	40

* Razão entre a quantidade do meio de cultivo pela capacidade do Erlenmeyer.

2.4 Dosagem de Proteína

O teor de proteína total foi realizado conforme metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando o corante *Coomassie Brilliant Blue* G 250 e a curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoques de soroalbumina bovina (BSA) em diferentes concentrações (0-100 µg/mL) submetido à leitura de absorbância a 595nm em espectrofotômetro.

2.5 Determinação da atividade de L-asparaginase

Para o ensaio enzimático foi utilizado o método descrito por Shinfrin et al. (1974). No qual, 0,1 mL da solução enzimática, 1,0 mL de Tris-HCl (0,05M e pH 8,6), 0,9 mL de água deionizada e 0,1 mL de solução de L-asparagina (0,189 M) foram misturados e incubados a 37°C durante 30 minutos. Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de ácido tricloroacético (1,5 M), seguido de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. 0,2 mL do sobrenadante foram diluídos em 4,3 mL de água deionizada e adicionado de 0,5 mL do reagente de Nessler. A densidade óptica foi determinada no comprimento de onda de 405 nm, considerando que uma unidade (U) da atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de amônia por minuto a 37°C.

2.6 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e a estabilidade da enzima L-asparaginase

O efeito do pH na atividade para L-asparaginase foi determinada pela reação enzimática realizada com diferentes pHs variando de 4,0-10,0 para obtenção do pH ótimo. Para a estabilidade ao pH, o extrato enzimático bruto foi submetido à incubação nos tampões citrato-fosfato (50 mM, pH 4,0-7,0), Tris-HCl (50 mM, pH 7,0-9,0) e glicina NaOH (50 mM, pH 9,0-10,0) durante 3 horas na ausência de substrato e a atividade residual foi determinada sob condições descritas

anteriormente no item 2.5. Para avaliar o efeito da temperatura na atividade de L-asparaginase, a reação enzimática foi realizada em diferentes temperaturas (25-90°C) para obtenção da temperatura ótima. Para a estabilidade a temperatura, o extrato enzimático bruto foi incubado em diferentes temperaturas 25°C, 37°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C, durante 3 horas sendo coletadas amostras a cada 30 minutos, seguido do teste quantitativo para L-asparaginase descrito no item 2.5.

2.7 Efeito de íons sobre a atividade de L-asparaginase

Para determinar os efeitos da adição de íons sobre a atividade de L-asparaginase presente no extrato enzimático bruto, foram utilizados os seguintes sais: sulfato de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de cobre, sulfato ferroso II, cloreto ferroso III, Cloreto de cálcio, cloreto de sódio e cloreto de potássio. Os efeitos das soluções iônicas foram avaliadas em três concentrações: 2,5 mM; 5,0 mM e 10,0 mM, as quais foram descritas como inibidores ou ativadores da atividade de L-asparaginase. O extrato enzimático bruto foi incubado junto com cada solução de sais (1:1) a 37°C, durante 1 hora, em seguida o extrato enzimático foi submetido à atividade para L-asparaginase.

2.8 Precipitação do extrato enzimático bruto com sulfato de amônio

Diferentes concentrações de sulfato de amônio em pó (0-20, 20-40, 40-60, 60-80 e 80-100) foi adicionado ao extrato enzimático bruto, incubado a 4°C, durante 4 horas, seguido de centrifugação em 10.000 rpm durante 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,01M (pH 8,6) e dialisado durante 24 horas sobre refrigeração de 4°C.

2.9 Perfil eletroforético

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com o método de Laemmli (1970), utilizando gel de concentração a 4% e de separação a 12,5%. Os géis foram corados por duas horas em solução de *Comassie briliant blue* R-250 e descorados em solução de metanol 45%, ácido acético 10%, até a visualização das bandas. A massa molecular das bandas foi determinada através do software

LabImage 1D (Loccus Biotecnologia) utilizando como padrão: fosforilase (97 kDa), albumina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (21,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

2.10 Teste antiacrilamida

O teste de inibição da acrilamida na formação do gel de poliacrilamida foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mahajan e colaboradores. (2012) modificada na concentração da solução de acrilamida e persulfato de amônio (APS) para obtenção do branco da amostra polimerizado. Foi utilizado 5,0 mL de solução de acrilamida a 30%, 2,5 mL de água deionizada e 2,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,5, 1,5 M) para formação do branco polimerizado. A utiização do extrato enzimático em diferentes volumes (0,5, 1,0, 2,0, e 3,0) substitui a água da mistura reacional, seguida de incubação a 45°C durante 30 minutos. Após este período, adiciona 0,2 mL de APS a 20% e 0,02 mL de Tetrametiletilenodiamina (TEMED). Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente e marcado o tempo de poimerização.

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação dos efeitos da glicose sobre a biomassa e a produção de L-asparaginase

A produção da biomassa e de L-asparaginase do *Tilletiopsis minor* foram realizadas utilizando diferentes concentrações de glicose (Figura 1a e 1b). Foi observado que nas três concentrações utilizadas. A maior concentração de biomassa foi obtida pelo meio contendo a maior concentração de glicose (5,0%) com 3,23 $g.L^{-1}$ as 120 horas de cultivo, enquanto que nos meios com glicose a 0,5% e 1,0% o crescimento terminou às 48 horas e 108 horas atingindo-se concentrações de biomassa de 2,83 $g.L^{-1}$ e 2.98 $g.L^{-1}$ respectivamente.

Ao avaliar essas concentrações de glicose sobre a produção de L-asparaginase (Figura 1b), observou-se que durante todo o período (120 horas) de cultivo, o meio contendo glicose a 1,0% apresentou maior atividade em relação aos outros meios, com atividade máxima de 1921,39 $U.mL^{-1}$, o que corrobora com a atividade máxima de L-asparaginase relatada por Shah et al. (2010), que ao

estudarem o extrato enzimático de *Citrobacter* sp. para L-asparaginase, obtiveram uma atividade máxima de 650 $U.mL^{-1}$ com glicose a 1,0%.

Ao avaliar a atividade de L-asparaginase do meio fermentado pelo *Tilletiopsis minor*, com menor concentração de glicose (0,5%), observamos atividade mínima de 14,44 $U.mL^{-1}$ e máxima de 637,33 $U.mL^{-1}$, enquanto que Kumar et al. (2010a) ao estudarem a produção de L-asparaginase a partir de *Pectobacterium carotovorum*, variaram a concentração de glicose de 0,1 a 1,0% e obtiveram uma atividade máxima de apenas 9,52 $U.mL^{-1}$. com glicose a 0,2% e Thakur et al. (2014) conseguiram a maior atividade de L-asparaginase a partir de *Mucor hiemalis* utilizando glicose a 0,4%.

Em relação ao comportamento da *Tilletiopsis minor* cultivada no meio com maior concentração de glicose (5,0%), foi observado a ausência de atividade de L-asparaginase durante as primeiras 24 horas, com menor atividade em relação aos outros meios cultivados com glicose a 0,5% e 1,0%, até às 84 horas. Entendemos que a maior concentração de glicose utilizada, aumentou a fase de adaptação da *Tilletiopsis minor*, às condições físicas de cultivo e aos nutrientes disponíveis. E que, à medida que a *Tilleiopsis minor* tornou-se adaptada ao meio começa a metabolizar os nutrientes e a realizar síntese celular.

De acordo com Shah e colaboradores (2010), os componentes do meio de fermentação devem ser fornecidos numa quantidade suficiente para o crescimento do micro-organismo e sua síntese enzimática.

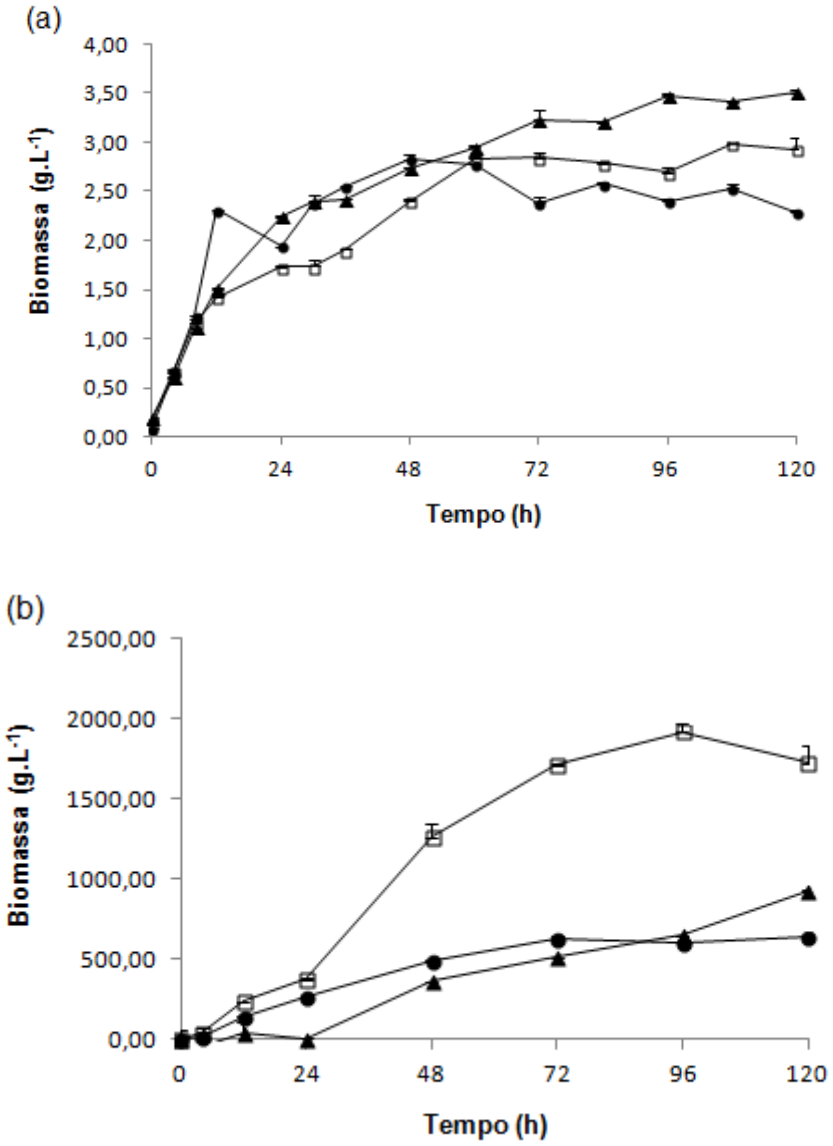


Figura 1 Efeito da concentração inicial de glicose, sobre a produção de biomassa (a) e L-asparaginase (b) do *T. monir*. Glicose 0,5% (●), glicose 1,0% (□) e glicose 5,0% (▲).

A fim de elevar a atividade de L-asparaginase, foram realizados outros dois testes envolvendo glicose, por ser a principal fonte de energia para as células. Após avaliar a influência da concentração inicial da glicose no meio de cultivo para a produção de L-asparaginase, o presente estudo submeteu a *Tilletiopsis minor* a uma nova fermentação na melhor concentração de glicose apresentada no processo anterior, modificada por uma adição extra de glicose no decorrer da fermentação ao atingir 48 horas.

Observamos que a adição extra de glicose elevou a produção de L-asparaginase quando comparado ao meio fermentado apenas com glicose inicial (Figura 2). Após as 72 horas de cultivo, observa-se que o meio que não levou pulso de glicose apresentou diminuição da produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*, provavelmente pelo esgotamento de nutrientes no meio.

Na fermentação efetuada com o meio que foi submetido ao pulso de glicose durante a fermentação, observou-se após uma primeira fase de produção sobreposta com o ensaio sem adição de glicose, um período de 12 horas de fase estacionaria como tempo necessário para a *Tilletiopsis minor* adaptar-se as novas condições nuticionais fornecida ao meio. Após este período, a produção de L-asparaginase foi retomada, tendo sido obtida uma a atividade máxima de L-asparaginase de 1786,11 $U.mL^{-1}$ enquanto que no meio cultivado apenas com glicose inicial a atividade foi de 1110,50 $U.mL^{-1}$.

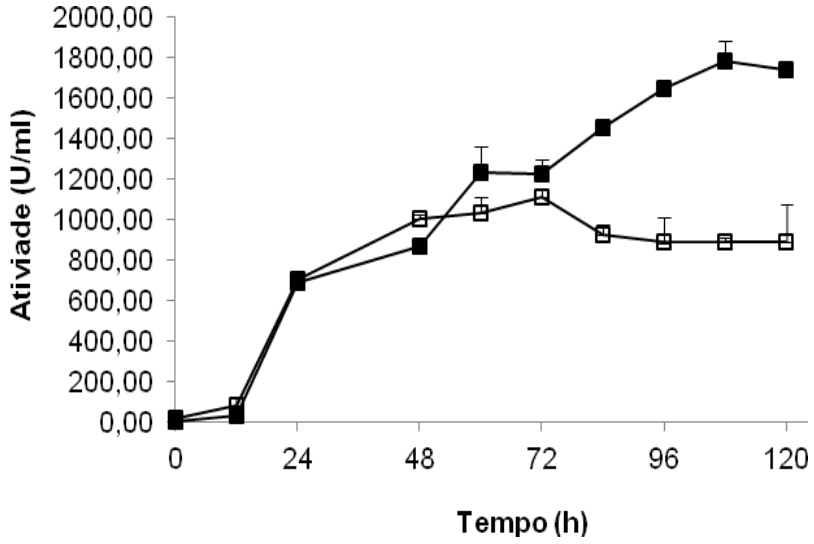


Figura 2 Comportamento do *T. minor* na produção de L-asparaginase com adição extra de glicose (■) ao meio com 48 horas de cultivo. (□) meio sem adição extrato de glicose.

Foi efetuado mais um conjunto de ensaios que através de um planejamento fatorial 2^2 permitiu avaliar o efeito das variáveis independentes, glicose e aeração no meio de cultivo na produção de L-asparaginase. Cada variável foi testada em três níveis diferentes (Tabela 1). A tabela 2 apresenta o planejamento entre os 4 ensaios

gerados e os 3 pontos centrais tendo como respostas a atividade de L-asparaginase em $U.mL^{-1}$. Os resultados foram obtidos a cada 24 horas durante 120 horas de cultivo e a melhor atividade foi apresentada com 72 horas nas condições descritas pelo ensaio 3.

Tabela 2 Planejamento fatorial variando a aeração e a concentração de glicose na produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor* ao longo do tempo.

Ensaios	Glicose (%)	Aeração* (%)	Atividade de L-asparaginase ($U.mL^{-1}$)				
			24h	48h	72h	96h	120h
1	1,0	20	803,56	1333,00	1333,11	1115,22	971,06
2	5,0	20	223,50	254,78	432,17	834,50	572,17
3	1,0	40	724,72	1308,44	1759,17	1715,89	1689,56
4	5,0	40	457,22	686,28	1180,72	1247,06	1368,17
5	3,0	30	461,89	913,44	1345,78	1453,06	1592,33
6	3,0	30	433,67	972,89	1411,89	1564,11	1596,22
7	3,0	30	498,50	846,11	1417,56	1426,28	1445,72

* Razão entre a quantidade (mL) do meio de cultivo pela capacidade do Erlenmeyer.

O ensaio 3 com glicose a 1,0% e aeração a 40% foi o que levou à melhor produção de L-asparaginase, evidenciando a maior atividade de $U.mL^{-1}$ com 72 horas de cultivo (Tabela 2). O maior e o menor valor de atividade encontrados no planejamento estatístico apresentaram-se de forma inversamente proporcional, ou seja, a maior atividade (ensaio 3) foi apresentada com a menor concentração de glicose e maior aeração, enquanto que o menor atividade (ensaio 2) foi apresentada nas condições com maior concentração de glicose e menor aeração. Pode-se observar ainda que o ensaio 4 com maior concentração de glicose (5,0%) e a maior aeração apresentou uma perda acentuada na atividade, o que podemos concluir que a aeração não apresenta influência tão significativa na produção de L-asparaginase como a glicose.

Os resultados encontrados, mas uma vez apresentam o ótimo de atividade para L-asparaginase com glicose a 1,0%. Enquanto que a menor atividade foi representada pelo ensaio 2 com glicose a 5,0% como demonstra a Figura 3. Kumar

e Sobha, (2012c) relataram que a glicose provoca uma redução significativa na atividade de asparaginase, quando utilizada a 3,0% no meio basal.

Em todos os testes realizados para avaliar o efeito da glicose sobre a produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*, observa-se perda acentuada na atividade de L-asparaginase quando submetido a cultivos com 5,0% de glicose. De acordo com Baskar e Renganathan (2011), a diminuição da atividade enzimática pode está relacionada com a repressão catabólica na produção de L-asparaginase inibida pelo excesso de glicose.

Desde o século XX, os primeiros estudos relataram que a glicose inibe a síntese de L-asparaginase em *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* e *Serratia marcescens* e *Serratia aroideae* devido à repressão catabólica (Cedar e Schwartz, 1967; Heinemann e Howard, 1969; Peterson e Ciegler, 1972) o que é também confirmado em *Tilletiopsis minor* no presente trabalho.

A tabela 3 descreve os efeitos dos fatores glicose e aeração e suas significâncias. Os resultados demonstram que a variável glicose apresentou efeito significativo na produção de L-asparaginase durante 96 horas de cultivo. Enquanto que a significância do fator aeração, foi apresentada a partir das 72 horas. A aeração passa a ser sigificativa com o passar do tempo provavelmente, pelo consumo dos nutrientes do meio e as interações entre as variáveis só foram significativa nas primeiras 24 horas.

O interesse de avaliar o fator aeração na produção de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor* está relacionado ao fato de que o arejamento faz parte dos parâmetros críticos para a produção da L-asparaginase de acordo com Kumar e Sobha (2012c) afirmação que diverge com os resultados encontrados e descritos na Tabela 2. Os resultados encontrados nesse trabalho sobre aeração, também vão contra os apresentados por Geckil e Gencer (2014) ao avaliarem a produção de L-asparaginase, sob diferentes condições de cultura, verificaram que a maior atividade apresentada foi em culturas com baixa aeração. Nesse contexto, o presente trabalho apresenta a importância de se estudar os parâmetros de produção, concordando com a observação feita por Shah e colaboradores (2010) ao falarem que a importância de avaliarmos os parâmetros de produção de uma biomolécula está entre as principais exigências para um alto rendimento do micro-organismo auxiliando na aplicação de processos biotecnológicos.

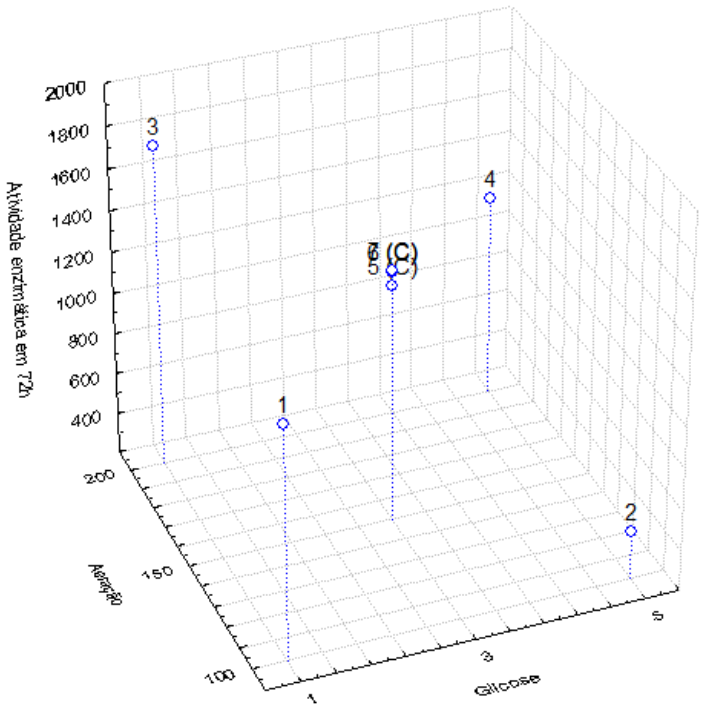


Figura 3 Parâmetros de produção para L-asparaginase de *Tilletiopsis minor* e a maior atividade encontrada pelo planejamento fatorial 2^2.

Tabela 3 Valores referentes a gráficos de Pareto gerados para cada 24 horas de cultivo durante 120 horas do planejamento fatorial 2^2.

	24h	48h	72h	96h	120h
Glicose	- 13,03*	- 13,40*	- 18,53*	- 5,13*	- 4,20
Volume	2,38	3,21	14,71*	6,93*	8,82*
1x2	4,81*	3,59	4,04	-1,28	0,45

*Significancia.

3.2 Efeito do pH e temperatura sobre a atividade e estabilidade da L-asparaginase

O pH ótimo encontrado para a atividade de L-asparaginase produzida por *Tilletiopsis minor* foi 7,0 (Figura 4a). Resultado semelhante ao de Pokrovskaya et al. (2012) ao estudarem a produção de L-asparaginase a partir de *Yersinia*

pseudoturberculosis encontrando pH 6,8 como ótimo e idêntico ao apresentado por Basha et al. (2009). Estudos com *Thermococcus gammatolerans* e *Thermococcus kodakaraensis* para a produção de L-asparaginase relataram uma atividade ótima em pH alcalino de 8,5 e 9,5, respectivamente (Chohan e Rashid, 2013; Zuo et al., 2014).

Ao avaliarmos a estabilidade ao pH (Figura 4b) da L-asparaginase produzida pelo *Tilletiopsis minor* com 180 horas de incubação nos diferentes tampões e pHs, observamos uma ativação da enzima em pH 6,0 com 115% de atividade residual. Durante toda a faixa de pH avaliada a L-asparaginase estudada apresentou estabilidade com atividade acima dos 88% exceto pelo pH 10,0 com perda de 47% de atividade. Estudos com *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* descrevem uma estabilidade para L-asparaginase entre pH 6,0 a 9,0 com cerca de 80% da atividade (Pokrovskaya et al., 2012). Outro estudo a partir de L-asparaginase produzida por *Pectobacterium carotovorum* apresentaram estabilidade a pH alcalino de 8,0 a 10,0 e uma queda acentuada na atividade em pH 6,5 (Kumar et al., 2011b).

Os resultados apresentados em relação ao efeito do pH sobre a atividade de L-asparaginase por *Tilletiopsis minor*, demonstra um grande potencial de aplicação devido a sua alta atividade em pH tanto ácido como alcalino. De acordo com Kumar et al. (2011b), a asparaginase comercializada provem da modificação genética de *Erwinia* sp. com maior atividade em pH ácido, e com *E. coli* com atividade máxima em pH alcalino.

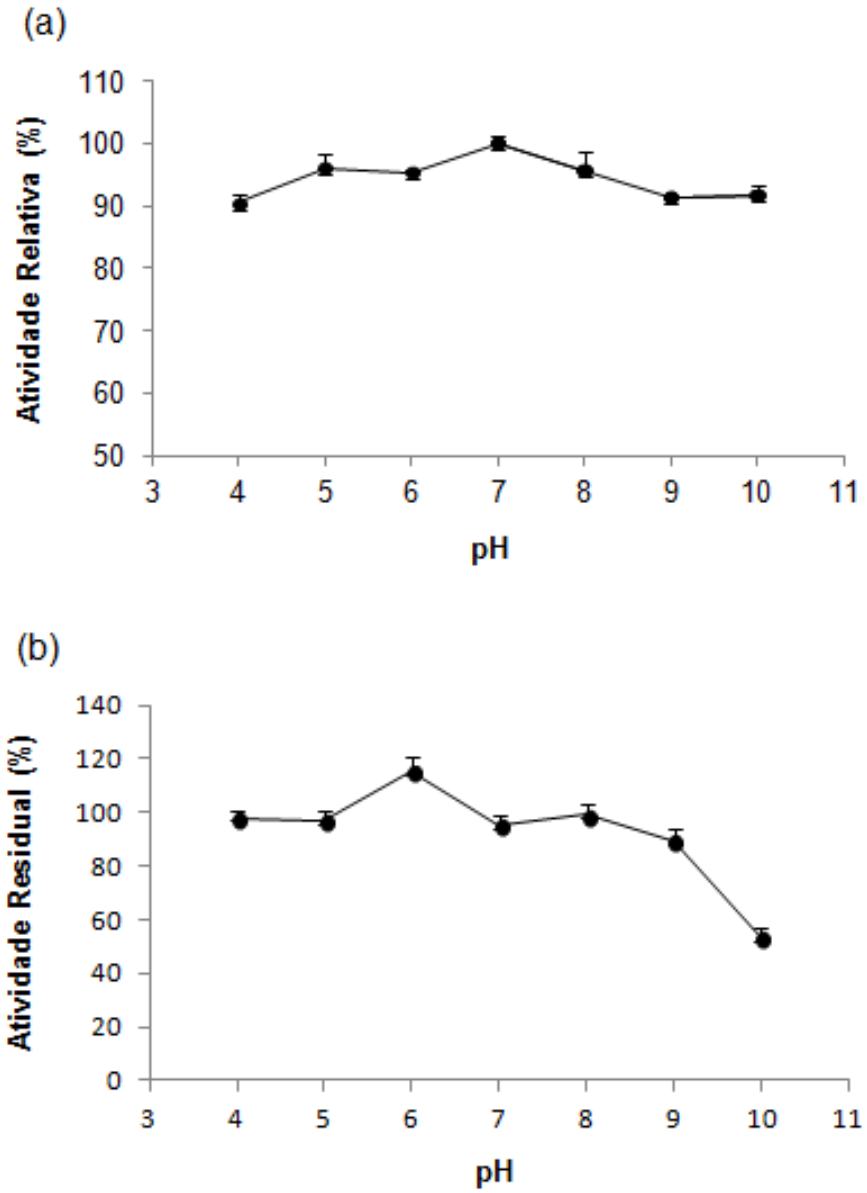


Figura 4 Efeito do pH sobre a atividade de L-asparaginase. (a) pH ótimo e (b) estabilidade da L-asparaginase ao pH.

Ao analisar o efeito da temperatura (Figura 5a) sobre a atividade de L-asparaginase, pode-se observar que até os 50°C a atividade não sofreu grandes alterações, sendo considerada como ótima. Acima dos 50°C foi observada uma diminuição de 10% na atividade e entre 60°C - 90°C a enzima se mostrou termotolerante com atividade de 85% - 90%. O estudo relatado por Kumar et al. (2011b) com L-asparaginase purificada, apresentou temperatura ótima de 40°C com perda acentuada na atividade acima dos 45°C. Enquanto que outros estudos com L-

asparaginase provenientes de *Thermococcus gammatolerans* e *Thermococcus kodakaraensis* relataram temperatura ótima de 85°C (Chohan e Rashid, 2013; Zuo et al., 2014).

Ao analisarmos a L-asparaginase de *Tilletiopsis minor* em relação a estabilidade a temperatura, foi observado que aos 37°C a enzima sofreu ativação apresentando 141,00% de atividade. A L-asparaginase de *Tilletiopsis minor* apresentou um perfil termoestável ao longo de todo o tempo de incubação (180 horas), mantendo-se acima de 80% de atividade residual (Figura 5b). Estudo de estabilidade à temperatura com L-asparaginase a partir de *Yersinia pseudotuberculosis*, apresentou atividade acima de 80% entre 57 – 73°C (Pokrovskaya et al., 2012).

De acordo com Zuo et al. (2014), a termoestabilidade é uma propriedade importante na seleção de enzimas para aplicações industriais, o que demonstra potencial da L-asparaginase produzida pela *Tilletiopsis minor* isolada de pólen apícula da região Amazônica. A termotolerância apresentada pela L-asparaginase estudada, pode está diretamente relacionada ao seu habitat natural, considerando ser uma levedura selvagem propícia a condições extremas de temperatura.

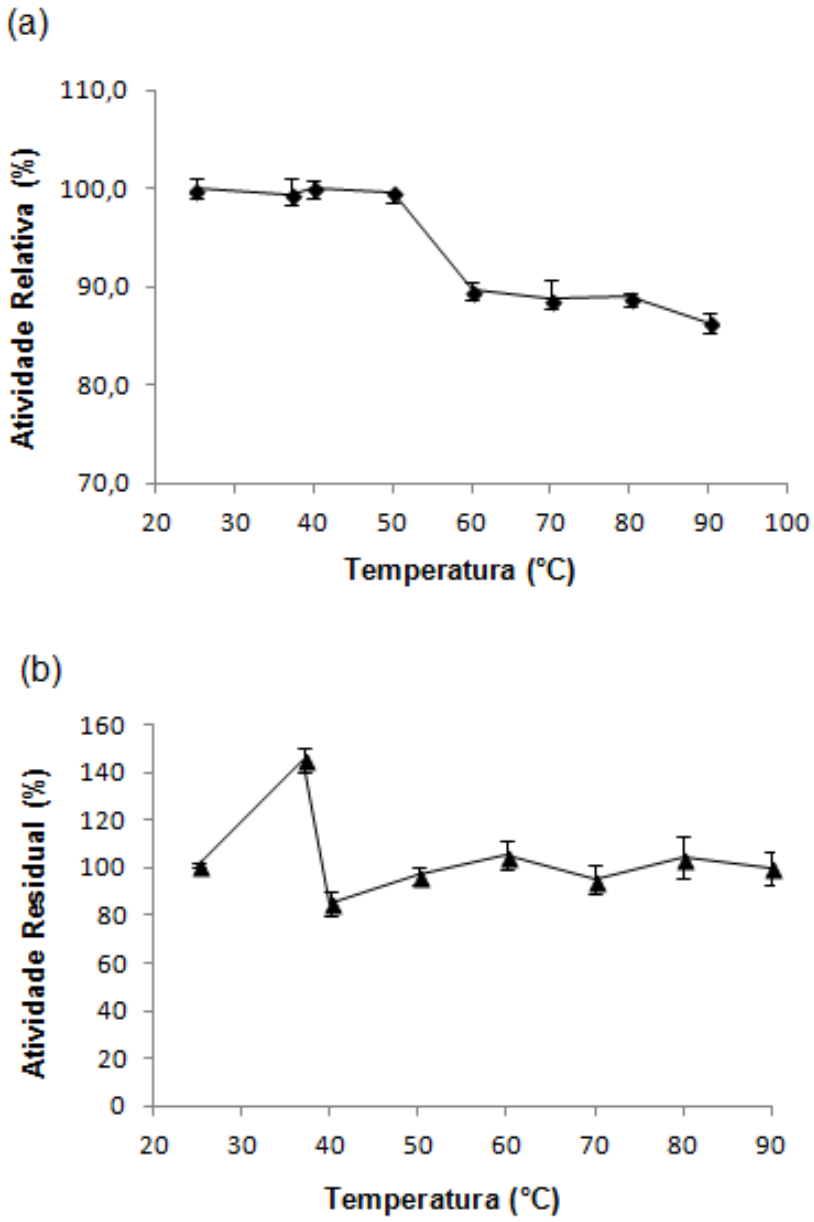


Figura 5 Efeito da temperatura sobre a atividade de L-asparaginase. (a) temperatura ótima e (b) estabilidade da L-asparaginase a temperatura.

3.3 Efeito de íons metálicos sobre a atividade de L-asparaginase

Na análise dos efeitos apresentados pelos íons sobre a atividade de L-asparaginase, as atividades residuais foram calculadas em relação ao controle na ausência de sais (Tabela 4). Foi observado que os íons Ca^{+}, Zn^{+} e Na^{+}, apresentaram efeitos inibitórios em todas as concentrações testadas, sendo o Na^{+} o

de maior efeito negativo quando testado a 10 mM. Enquanto que o Cu^{+}, Fe^{++} e Fe^{+++} foram os únicos que não apresentaram inibição da L-asparaginase em nenhum das concentrações. O efeito do K^{+} foi inibitório apenas com 10mM e o Mg^{+} quando utilizado com 5,0mM e 10mM também agiu inibindo a L-asparaginase do *Tilletiopsis minor*. Estudo avaliando o efeito de íons sobre a L-asparaginase apresentaram o íon Ca^{+} e Zn^{+} como inibidores corroborando com os nossos resultados (Basha et al., 2009), enquanto que o Na^{+} demostrou efeito inverso ao desse trabalho, agindo como ativador na atividade de L-asparaginase (Kumar et al., 2011b). Outro estudo que avaliou o comportamento da L-asparaginase na presença de íons foi descrito por Chohan e Rashid (2013), no qual descrevem que a enzima não sofreu maiores influências na sua atividade em relação a todos os íons avaliados, incluindo Cu^{+}, Zn^{+}, Mg^{+} e Ca^{+}.

Tabela 4 Efeito de íons sobre a atividade de L-asparaginase

Íons	Atividade Residual (%)		
	2,5 mM	5,0 Mm	10,0 mM
Controle*	100,0	100,0	100,0
K^{+}	-	54,0	32,0
Ca^{+}	27,8	28,8	24,1
Zn^{+}	30,4	27,9	27,1
Mg^{+}	62,0	45,9	49,6
Cu^{+}	-	54,0	66,7
Fe^{++}	60,1	64,0	59,4
Fe^{+++}	99,4	72,5	72,9
Na^{+}	20,0	30,1	11,1

* Extrato enzimático sem adição de ions considerado como 100% de atividade e utilizados para os demais cálculos. (-) não foi possível detectar a atividade.

3.4 Pré-pruficação de L-asparaginase

Entre as frações avaliadas na precipitação com sulfato de amônia, a saturação de 20-40% apresentou melhor fator de purificação de 7,8 e maior atividade especifica de 2334,58 ($U.mg^{-1}$) (Tabela 5, Figura 6). Enquanto que estudos com pré-purificação de L-asparaginase de *Streptomyces gulbargensis* (Amena et al.,

2010) e *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428 (Kumar et al., 2011b) utilizando sulfato de amônia, apresentaram como melhor fator de purificação (FP) e atividade específica 1,8 e 6,8 (FP) e 45 $U.mg^{-1}$ e 192,12 $U.mg^{-1}$, em saturações de 40-60% e 60-80%, respectivamente.

Tabela 5 Precipitação enzimática com sulfato de amônia.

Amostras	Atividade Total ($U.mL^{-1}$)	PT ($mg.mL^{-1}$)	Atividade Especifica ($U.mg^{-1}$)	FP	AR (%)
Extrato Bruto	747,50	4,98	150,10	1,0	100
0-20	96,93	0,11	908,55	6,1	13
20-40	46,03	0,04	1167,29	7,8	6
40-60	80,52	0,08	1048,20	7,0	11
60-80	84,93	0,40	213,24	1,4	11
80-100	203,13	0,43	445,17	3,2	27

PT (proteína total), FP (fator de purificação) e AR (atividade recuperada).

3.5 Perfil eletroforético do extrato enzimático pré-purificado

A avaliação eletroforética por SDS-PAGE (Figura 6) representa o perfil protéico do extrato enzimático precipitado nas diferentes concentrações de sulfato de amônio. O perfil em gel demonstra melhor purificação justamente para as três frações que apresentaram melhor fator de purificação como descrito na tabela 4. A linha 4 representa a melhor fração encontrada na pré-purificação confirmando a baixa quantidade de proteína e o alto fator de purificação. A banda apresentada na linha 4 representa uma massa molecular de 80,5 kDa de acordo com o programa LabImagem 1D da Loccus Biotecnologia. Semelhantes ao estudo realizado por Amena et al. (2010) que apresentou uma L-asparaginase com massa molecular de 85 kDa a partir de *Streptomyces gulbargensis*. Kavitha e Vijayalakshmi (2010) ao analisarem L-asparaginase de *Streptomyces tendae* TK-VL333 encontraram massa molar de 97,4 kDa.

Resultados diferentes ao nosso, com massa molar de L-asparaginase inferior foram apresentados por Zuo et al. (2014) e Kumar et al. (2011b) que ao purificarem L-asparaginase de *Thermococcus gammatolerans* e *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428, respectivamente, encontraram uma enzima com peso molecular de

36,5 kDa. Chorhan e Rashid et al. (2013) ao avaliar a massa molecular da L-asparaginase produzida por *Thermococcus kodakaraensis*, encontrou 35,6 kDa.

A massa molecular encontrada de 80,5 kDa referente a banda destacada no gel de SDS-PAGE pela fração 20-40 pode ser explicada pelo fato da L-asparaginase ser tetramérica com subunidades que variam de 32-38 kDa (Kumar e Sobha, 2012c). Este valor pode ser explicado pela perda de alguma subunidade da molécula referida.

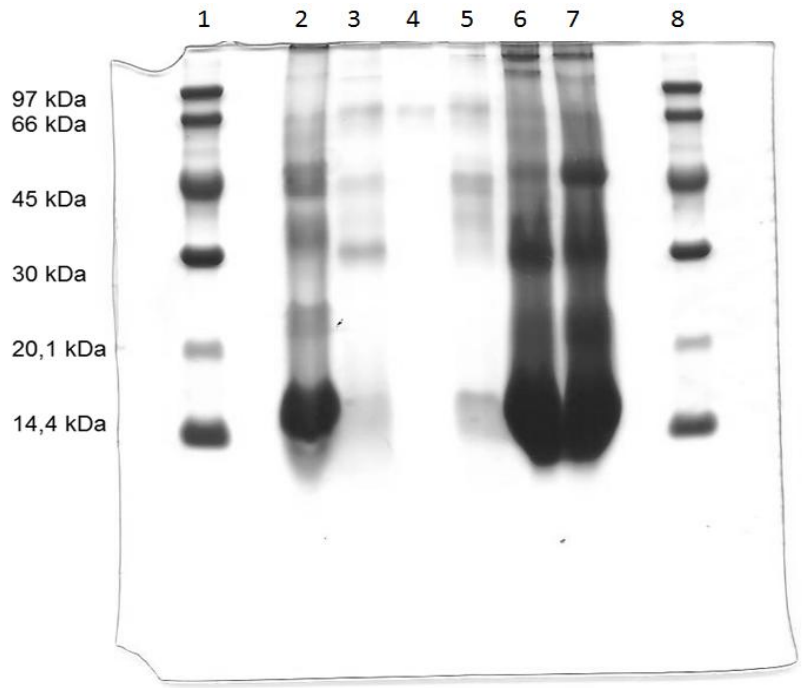


Figura 6 Perfil eletroforético por SDS-PAGE do extrato enzimático bruto e pré-purificado com sulfato de amônia. Padrão (linha 1 e 8), extrato bruto (linha 2), concentrações 0-20 (linha 3), 20-40 (linha 4), 40-60 (linha 5), 60-80 (linha 6) e 80-100 (linha 7).

3.6 Efeito da L-asparaginase na formação de poliacrilamida

A inibição da polimerização da acrilamida foi avaliada na presença de uma solução de acrilamida a 30% utilizando o extrato enzimático bruto em diferentes volumes em substituição da água utilizada na reação (Tabela 6). Na ausência da enzima, o tempo necessário para a polimerização da solução de acrilamida foi de 8 minutos. As amostras referentes aos números 2 e 3 retardaram a polimerização em

22 minutos. Enquanto que a amostra 4 retardou a polimerização durante 24 horas. A polimerização não ocorreu quando o ensaio foi realizado utilizando somente o extrato enzimático. Estudos semelhantes (Mahajan et al., 2012) com a mesma variação de volume do extrato enzimático, mas com a concentração da solução de acrilamida inferior (10%), apresentaram solidificação imediata na ausência da enzima, e quando, testado os 3 mL do extrato, equivalente à nossa amostra de número 5, apenas retardou a polimerização em 25 minutos, e mesmo assim teve resultados positivos quando testada contra a formação de acrilamida em batatas fritas. Tais ensaios demonstram o potencial da L-asparaginase proveniente de *Tilletiopsis minor* como agente antiacrilamida.

Tabela 6 Inibição da polimerização da acrilamida diante diferentes níveis de enzima.

Amostra	Solução de acrilamida (30%) em mL	Extrato Enzimático (mL)	H2O da reação (mL)	Tempos de solidificação da acrilamida
1	5,0	-	2,5	8 minutos
2	5,0	0,5	2,0	30 minutos
3	5,0	1,0	1,0	30 minutos
4	5,0	2,0	0,5	24 horas
5	5,0	3,0	-	Não polimerizou

4 Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que a levedura *Tilletiopsis minor* apresenta um elevado potencial para ser utilizada na produção de L-asparaginase tendo sido obtidos, nas condições avaliadas, valores de atividade bastante superiores aos descritos na literatura. Foi também verificado que a concentração ótima de glucose para a produção de enzima é 1 % (p/v) e que é importante que a produção ocorra com aeração. A estabilidade ao pH e termotolerância da L-asparaginase obtida bem como a sua capacidade para inibir a polimerização da acrilamida indicam que reuni os requisitos necessários para aplicações no setor industrial como aditivos alimentares contra a formação de poliacrilamida.

Referências Bibliográficas

AMENA, S; VISHALAKSHI, N; PRABHAKAR, M; DAYANAND, A; LINGAPPA, K. Production, purification and characterization of l-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41,173 – 178p., 2010.

ANESE, MONICA; QUARTA, BARBARA; FRIAS, JESUS. Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. **Food Chemistry**, v. 126, 435 – 440p., 2011.

BARTKIENE, ELENA; JAKOBSONE, IDA; JUODEIKIENE, GRAZINA; VIDMANTIENE, DAIVA; PUGAJEVA, IVETA; BARTKEVICS, VADIMS. Study on the reduction of acrylamide in mixed rye bread by fermentation with bacteriocin-like inhibitory substances producing lactic acid bacteria in combination with *Aspergillus niger* glucoamylase, **Food Control**, v. 30, 35 – 40p., 2013.

BASHA, N.; REKHA, R.; KOMALA, M.; RUBY, S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 8, 353 – 360p., 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Analytical Biochemistry***, v. 72, 248 – 254p, 1976.

CEDAR, H; SCHWARTZ, J. H. Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **Journal Biological Chemistry**, v. 242, 3753 – 3754p., 1967.

CHOHAN, SHAHID MAHMOOD; RASHID, NAEEM. TK1656, a thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakaraensis*, exhibiting highest ever reported enzyme activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, 438 – 443p., 2013.

CIESAROVÁ, Z.; KISS, E.; BOEGL, P. Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products. **Journal of Food Nutrition and Research**, v. 45, 141 – 146p., 2006.

HEALTH CANADA - HC. **Health Canada's Proposal to Amend the Food and Drug**. Capturado em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/consult/dec2009-asparaginase/asp-niger-draft-ebauche-ng.php, 2009.

HEINEMANN, B.; HOWARD, A. J. Production of tumor-inhibitory L- asparaginase by submerged growth of *Serratia marscences*. **Applied Microbiology**, v. 18, 550 – 554p., 1969.

HENDRIKSEN, H. V.; KORNBRUST, B. A.; OSTERGAARD, P. R.; STRINGER, M. A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, 4168 – 4176p., 2009.

JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) **Compendium of Food Additive Specifications**, n. 4, food and agriculture organization of the united nations, Rome. Capturado em: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1447e/a1447e.pdf, 154p., 2007.

KAVITHA, A; VIJAYALAKSHMI, M. Optimization and purification of L-asparaginase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65,528 – 31p.,2010.

KUMAR, SANJAY; DASU, V. VENKATA; PAKSHIRAJAN, KANNAN. Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Process Biochemistry**, v. 45, 223 – 229p., 2010a.

KUMAR, V. SANJAY; DASU, VENKATA; PAKSHIRAJAN, K. Purification and characterization of glutaminase-free L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Bioresource Technology**, v. 102, 2077 – 2082p., 2011b.

KUMAR, DEVARAI SANTHOSH; SOBHA, KOTA. L-Asparaginase from Microbes: a Comprehensive Review. **Advances in Bioresearch**, v. 3, 137 – 157p., 2012c.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, 680 – 685p., 1970.

LINEBACK, D. R.; JONES, J. M. Acrylamide in foods: data and more questions. **Nutrition Today**, v. 46, 216 – 223p., 2011.

MAHAJAN, RICHI V.; SARAN, SAURABH; KARTHIKEYA, K.;KUMAR, VINOD; SAXENA, R.K. Efficient production of L-asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminse activity: Optimization, scale up and acrylamide degradation studies. **Bioresource Technology**, v. 125, 11 – 16p., 2012.

PEDRESCHI, FRANCO; MARIOTTI, SALOMÉ; GRANBY, KIT; RISUM, JORGEN. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching, **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, 1473 – 1476p., 2011.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. Factors influencing L-Asparaginase production by *Erwinia aroideae*. **Applied Microbiology**, v. 23, 671 – 673p., 1972.

POKROVSKAYA, M.V.; ALEKSANDROVA, S.S.; POKROVSKY, V.S.; OMELJANJUK, N.M.; BORISOVA, A.A.; ANISIMOVA, N.YU.; SOKOLOV, N.N. Cloning, expression and characterization of the recombinant *Yersinia pseudotuberculosis* L-asparaginase. **Protein Expression and Purification**, v. 82, 150 – 154p., 2012.

RODRIGUES, LÍGIA; MOLDES, ANA; TEIXEIRA, JOSÉ; OLIVEIRA, ROSÁRIO. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, 109 – 116p., 2006.

SHAH, A. J.; KARADI, R. V.; PAREKH, P. P. Isolation, Optimization and Production of L-asparginase from Coliform Bacteria. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 2, 169 - 177p., 2010.

SHIFRIN, SIDNEY; PARROTT, CATHERINE L.; LUBORSKY, SAMUEL W. Substrate Binding and Intersubunit Interactions in L-Asparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, 1335 – 1340p., 1974.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, FRANCOIS N. S.; MORE, S. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, 1 – 9p., 2014.

ZUO, SHAOHUA; XUE, DONG; ZHANGA, TAO; JIANGA, BO; MU, WANMENG. Biochemical characterization of an extremely thermostablel-asparaginase from *Thermococcus gammatolerans* EJ3. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 109, 122 – 129p., 2014.