



**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**

**SUZANE MERIELY DA SILVA DUARTE**

**OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger* SUPLEMENTADOS  
COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE  
ANTITUMORAL *IN VITRO***

**São Luís – MA**

**2024**

SUZANE MERIELY DA SILVA DUARTE

**OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger* SUPLEMENTADOS  
COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE  
ANTITUMORAL *IN VITRO***

Defesa de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia no polo da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título DOUTOR em Biotecnologia.

**Área de Concentração:** Biotecnologia em Saúde

**Orientadora:** Prof. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

**São Luís – MA**

**2024**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

DA SILVA DUARTE, SUZANE MERIELY.

OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger*  
SUPLEMENTADOS COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E  
ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL IN VITRO / SUZANE  
MERIELY DA SILVA DUARTE. - 2024.

89 p.

Orientador(a): MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO  
NASCIMENTO.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do  
Maranhão, São Luís, 2024.

1. *Aspergillus niger*. 2. Células HeLa. 3. Células  
SiHa. 4. *Euterpe oleracea* Mart. 5. L-asparaginase. I.  
SOARES BRANDÃO NASCIMENTO, MARIA DO DESTERRO. II. Título.



Universidade Federal do Maranhão  
Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805 Telefone: (98)  
3272-8000 E-mail: [renorbio@ufma.br](mailto:renorbio@ufma.br)  
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

## FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

**ALUNA:** Suzane Meriely da Silva Duarte

**TÍTULO DO PROJETO:** OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger* SUPLEMENTADOS COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

BANCA EXAMINADORA	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento <b>UFMA - Presidente</b>		
Prof. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes <b>UFMA - Titular</b>		
Prof. Dra. Audirene Amorim Santana Paixão <b>UFMA - Titular</b>		
Prof. Dra. Raquel Maria Trindade Fernandes <b>UEMA - Titular</b>		
Prof. Dra. Amanda Mara Teles <b>UEMA - Titular</b>		
Prof. Dr. Marcos Antonio Custódio Neto Da Silva <b>UFMA - Suplente</b>		
Prof. Dra. Flávia Castello Branco Vidal <b>UFMA - Suplente</b>		

**DATA DA APROVAÇÃO:** 28/02/2024

**HORÁRIO:** 12:30h

**LOCAL:** SÃO LUÍS – MA

**SUZANE MERIELY DA SILVA DUARTE**

**OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger* SUPLEMENTADOS  
COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE  
ANTITUMORAL *IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biotecnologia - Área de Concentração em Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento  
UFMA – Orientadora

---

Prof. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes  
UEMA – 1º Examinador

---

Profa. Dra. Audirene Amorim Santana Paixão  
UFMA - 2º Examinador

---

Prof. Dra. Raquel Maria Trindade Fernandes  
UEMA – 3º Examinador

---

Profa. Dr. Amanda Mara Teles  
UEMA – 4º Examinador

---

Profa. Dr. Marcos Antonio Custódio Neto Da Silva  
UFMA – Suplente

---

Prof. Dra. Flávia Castello Branco Vidal  
UFMA – Suplente

*Ele chamará a mim, e eu lhe darei resposta,  
e na adversidade estarei com ele;  
vou livrá-lo e cobri-lo de honra.*

SALMO 91:15

## DEDICATÓRIA

*Dedico ao amado e sublime Deus, pois somente por Ele que consegui chegar até aqui.*

*Dedico a minha amada e querida mãe, que não mediu esforços para que eu chegasse até aqui, muitas vezes viajando quilômetros para cuidar de meu filho, enquanto eu me isolava estudando.*

*Ao meu querido pai, que sempre acreditou em mim, e me ensinou desde cedo a lutar pelos meus sonhos.*

*Ao meu esposo, que sonhou este sonho junto comigo, compreendendo meus momentos de ausência e auxiliando no que fosse necessário para que eu chegasse até aqui.*

*Ao meu pequeno filho, que durante o doutoramento nasceu, e me dá forças todos os dias para continuar.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu grandioso e misericordioso Deus.

À Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), em especial ao ponto focal do Maranhão, que desde o começo sempre se mantiveram a disposição para ajudar no que fosse preciso.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento que sempre muito técnica e profissional colaborou do início ao fim nesse projeto de pesquisa, sempre disponível para me ajudar.

Ao meu grande amigo Allysson Kayron de Carvalho Silva, que guerreou junto comigo essa batalha, fazendo parte de todo o processo, sendo muitas vezes meu ponto de apoio nas dificuldades encontradas no caminho.

A queria amiga Kátia Regina Assunção Borges, por seu companheirismo e contribuiu em diversos passos dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Micologia localizado no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão, por ter cedido toda a infraestrutura necessária para obtenção dos experimentos durante a realização deste trabalho.



DUARTE, SUZANE MERIELY DA SILVA. **OBTENÇÃO DA L-ASPARAGINASE de *Aspergillus niger* SUPLEMENTADOS COM A SEMENTE DE *Euterpe oleracea* Mart E ANÁLISE DE SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO***. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2024.

## RESUMO

O câncer de colo do útero provocado pelo papilomavírus humano (HPV) é diagnosticado em mulheres por todo o planeta, principalmente em países em desenvolvimento, observando-se que problemas como escassez ou mesmo falta de serviços de saúde e educação informativa e preventiva, acabam contribuindo para o avanço desse tipo de câncer. Diversas pesquisas são constantemente realizadas para a criação de produtos farmacêuticos que reduzam a proliferação de células cancerígenas, e nesse estudo viu-se a enzima L-asparaginase como promissora, tendo em vista sua capacidade anticarcinogênica contra diferentes alterações oncogênicas, dentre elas, as linfoproliferativas, como é o caso da leucemia linfoblástica aguda (LLA). O fungo *Aspergillus niger* foi escolhido para este estudo por ser uma fonte com potencial capacidade de produção de L-asparaginase, sendo amplamente distribuído na natureza. O objetivo deste trabalho foi obter a L-asparaginase produzida por *A. niger* suplementados com a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, analisando a atividade antitumoral *in vitro* da enzima em linhagens de células RAW, GM, HeLa e SiHa. Foi realizada a obtenção da farinha da semente de *E. oleracea* Mart e posterior análise dos compostos fenólicos, flavonoides e atividade biológica *in vitro* do substrato da farinha semente; bioprospecção da enzima em diferentes tipos de fungos; verificação da produção de L-asparaginase em fermentação Semi-sólida e Submersa; identificação molecular do *A. niger* por meio da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR); purificação da L-asparaginase; caracterização bioquímica (pH e temperatura ótimos, cinética enzimática, influência de íons e surfactantes e estabilidade em solventes orgânicos); análise da citotoxicidade enzimática em linhagens celulares RAW, GM, HeLa e SiHa; viabilidade morfológica em células HeLa e ensaio de migração celular em células HeLa e SiHa. Os resultados encontrados mostraram que *A. niger* apresenta maior atividade enzimática e concentração de proteína na fermentação semissólida, utilizando farinha de semente de *E. oleracea* Mart como fonte de nutrientes. A enzima apresentou pH ótimo de 9,0 e temperatura ótima de 50°C, resistência a diversos íons e surfactantes e redução da atividade proliferativa das células HeLa, mostrando que a L-asparaginase de *A. niger* pode ser uma alternativa futura para o tratamento do câncer de colo do útero provocado pelo HPV 18.

**Palavras-chave:** *Aspergillus niger*, L-asparaginase, *Euterpe oleracea* Mart, células HeLa, células SiHa.

DUARTE, SUZANE MERIELY DA SILVA. **OBTAINING L-ASPARAGINASE from *Aspergillus niger* SUPPLEMENTED WITH SEED OF *Euterpe oleracea* Mart AND ANALYSIS OF ITS ANTI-TUMOR ACTIVITY *IN VITRO***. Thesis (Doctorate in Biotechnology). Postgraduate Program in Biotechnology of the Northeast Biotechnology Network, Focal Point of the Federal University of Maranhão, São Luís - MA, 2024.

## **ABSTRACT**

Cervical cancer caused by the human papillomavirus (HPV) is diagnosed in women all over the planet, mainly in developing countries, and problems such as scarcity or even lack of health services and informative and preventive education end up contributing for the advancement of this type of cancer. Several researches are constantly carried out to create pharmaceutical products that reduce the proliferation of cancer cells, and in this study the enzyme L-asparaginase was seen as promising, given its anticarcinogenic capacity against different oncogenic alterations, among them, lymphoproliferative, as is the case with acute lymphoblastic leukemia (ALL). The fungus *Aspergillus niger* was chosen for this study because it is a source with potential capacity for L-asparaginase production, being widely distributed in nature. The objective of this work was to obtain L-asparaginase produced by *A. niger* supplemented with *Euterpe oleracea* Mart seed flour, analyzing the in vitro antitumor activity of the enzyme in RAW, GM, HeLa and SiHa cell lines. *E. oleracea* Mart seed flour was obtained and subsequent analysis of phenolic compounds, flavonoids and in vitro biological activity of the seed flour substrate; bioprospecting of the enzyme in different types of fungi; verification of L-asparaginase production in semi-solid and submerged fermentation; molecular identification of *A. niger* using the Polymerase Chain Reaction (PCR); purification of L-asparaginase; biochemical characterization (optimum pH and temperature, enzyme kinetics, influence of ions and surfactants and stability in organic solvents); analysis of enzymatic cytotoxicity in RAW, GM, HeLa and SiHa cell lines; morphological viability in HeLa cells and cell migration assay in HeLa and SiHa cells. The results found showed that *A. niger* presents greater enzymatic activity and protein concentration in semisolid fermentation, using *E. oleracea* Mart seed flour as a source of nutrients. The enzyme presented an optimum pH of 9.0 and an optimum temperature of 50°C, resistance to various ions and surfactants and a reduction in the proliferative activity of HeLa cells, showing that L-asparaginase from *A. niger* may be a future alternative for treatment of cervical cancer caused by HPV 18.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, L-asparaginase, *Euterpe oleracea* Mart, HeLa cells, SiHa cells.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*A. Niger* – *Aspergillus niger*

ABTS – 2,2 AZINO BIS (3-ethylbenzo thiazoline. 6 sulfonic acid

AAD – Anticorpos Antidrogas

ASSN – Asparaginase sintetase

AlSO<sub>4</sub> – Sulfato de alumínio

BaCl<sub>2</sub> – Cloreto de bário

*C. albicans* – *Cândida albicans*

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

CuSO<sub>4</sub> – Sulfato de Cobre

DEAE – dietilaminoetil

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsufóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil

EAG – equivalente em ácido gálico

*E. oleracea* – *Euterpe oleracea*

EQ – Equivalente de quercetina

FeCl – Cloreto de Ferro

FeSO<sub>4</sub> – Sulfato de Ferro

FSBm – Fermentação submersa

FSS – Fermentação semi-sólida

GM – Células derivadas de fibroblasto humano

HCl – Ácido clorídrico

HDACi – Histona Desacetilase

HPV – Human Papilon Vírus

IC50 – Concentração inibitória para 50%

ITS – região interna transcrita

KCl – Cloreto de Potássio

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - Sulfato de Amônio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MnCl<sub>2</sub> – Cloreto de manganês

MTT – (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

NaCl – Cloreto de Sódio

NIBA – Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada

PBS – Tampão fosfato-salino

PDA – Agar Potato Dextrose

RNA – Desoxirobonucleico

RPM – Rotação por minuto

SDS – Docedil sulfato de sódio

TBE – Tris/Borato/EDTA

TCA – Ácido Tricloroacético

TRIS – Tris (Hidroximetil) Aminometano

UFMA – Universidade Federal do Maranhão

V<sub>max</sub> – Velocidade máxima

ZnSO<sub>4</sub> – Sulfato de Zinco

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Palmeira da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	21
<b>Figura 2</b> – Fruto de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	22
<b>Figura 3</b> – Semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	22
<b>Figura 4</b> – Caroços da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	23
<b>Figura 5</b> – Representação esquemática da ação de L-asparaginase após tratamento do câncer.....	24
<b>Figura 6</b> – Respostas imunológicas adaptativas a microrganismos extracelulares....	25
<b>Figura 7</b> – <i>Aspergillus niger</i> via microscopia de ótica infinita.....	27
<b>Figura 8</b> – Representação espacial das taxas estimadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, ajustadas por idade pela população mundial, por 100 ml mulheres.....	29
<b>Figura 9</b> – Etapas da preparação da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	30
<b>Figura 10</b> – Resultado da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	41
<b>Figura 11</b> – Atividade de L-asparaginase de produzida por diferentes fungos.....	45
<b>Figura 12</b> – Resultados do FSBm com os caldos nutrientes comerciais em comparação com a farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	46
<b>Figura 13</b> – Morfologia das colônias e estruturas de reprodução assexual de <i>A. niger</i> .....	48
<b>Figura 14</b> – pH ótimo (A) e estabilidade (B) da L-asparaginase de <i>A. niger</i> .....	51
<b>Figura 15</b> – Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) da L-asparaginase de <i>A.</i> .....	52
<b>Figura 16</b> – Tempo de armazenamento da L-asparaginase de <i>A.niger</i> .....	56
<b>Figura 17</b> – Viabilidade celular após tratamento com a L-asparaginase de <i>A. niger</i> (A) RAW, (B) GM, (C) SiHa, (D) HeLa e (E) Imagem representativa do ensaio de MTT..	58
<b>Figura 18</b> – Linhagem celular de HeLa controle (A) e após o tratamento de com L-asparaginase de <i>A. niger</i> em 72h (B).....	61

**Figura 19** – Ensaio de Migração celular teste controle tempo zero (A) 72h (B) sem tratamento e com tratamento da L-asparaginase em tempo zero (C) 72h (D) em HeLa.....62

**Figura 20** – Ensaio de Migração celular teste controle tempo zero (A) 72h (B) sem tratamento e com tratamento da L-asparaginase em tempo zero (C) 72h (D) em SiHa.....63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais do substrato da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	41
<b>Tabela 2</b> – Atividade antioxidante do substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart pelo método do DPPH e ABTS equivalente ao Trolox.....	42
<b>Tabela 3</b> – Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart pelo método do DPPH e ABTS.....	43
<b>Tabela 4</b> – Resultados da purificação parcial da L-asparaginase de <i>A. niger</i> da fermentação submersa (FSBm) e semi-sólida (FSS).....	47
<b>Tabela 5</b> – Influência de tipo de meios de precipitação na fermentação semi-sólida de <i>A. niger</i> .....	50
<b>Tabela 6</b> – Efeito de agentes surfactantes sobre a atividade da L-asparaginase F2 de <i>A. niger</i> .....	52
<b>Tabela 7</b> – Influência dos íons sobre a atividade de L-asparaginase de <i>A. niger</i> .....	53
<b>Tabela 8</b> – Efeito de solventes orgânicos sobre a L-Asparaginase de <i>A. niger</i> .....	54
<b>Tabela 9</b> – Parâmetros cinéticos de L-asparaginase de <i>A. niger</i> em comparação com L-asparaginase de outros microrganismos.....	56
<b>Tabela 10</b> – IC50 da concentração de L-asparaginase de <i>A. niger</i> nas linhagens HeLa e SiHa.....	60

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objetivo Geral.....	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
3.1 <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	21
3.2 Atividade antitumoral da enzima L-asparaginase .....	24
3.2.1 Uso biotecnológico das atividades biológicas do <i>Aspergillus niger</i> .....	27
3.3 Câncer de colo do útero e suas prospecções de tratamento com produtos naturais.....	28
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Preparação da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	30
4.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais do substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	31
4.3 Atividade biológica <i>in vitro</i> do substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	31
4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS.....	31
4.4 Rastreamento de Fungos para Produção de L-asparaginase utilizando como substrato a farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	32
4.4.1 Influência do tipo de fermentação para produção de L-asparaginase.....	32
4.4.1.1 Fermentação semi-sólida (FSS).....	32
4.4.1.2 Fermentação Submersa (FSBm).....	33
4.5 Fungo que apresentou melhor produção de L-asparaginase suplementado com a farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	33
4.5.1 Identificação microscópica do Fungo.....	33
4.5.2 Identificação molecular do Fungo.....	34
4.5.2.1 Cultura e isolamento fúngico.....	34
4.5.2.2 Extração de DNA.....	34



4.5.2.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR) na região ITS..	35
4.6 Purificação extratos brutos de L-asparaginase.....	36
4.7 Concentração de proteína.....	36
4.8 Determinação da atividade de L-asparaginase.....	37
4.9 Caracterização bioquímica de L-asparaginase purificada do Extrato de Fungo.....	37
4.9.1 pH ótimo e estabilidade.....	37
4.9.2 Temperatura ótima e estabilidade.....	37
4.9.3 Efeito de agentes surfactantes e íons metálicos presentes nos sais.....	38
4.9.4 Estabilidade em solventes orgânicos.....	38
4.9.5 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	38
4.9.6 Tempo de armazenamento.....	39
4.10 Atividade citotóxica da L-asparaginase em células RAW, GM, HeLa e SiHa.....	39
4.11 Viabilidade morfológica em células HeLa via Microscopia de Luz Invertida.....	39
4.12 Ensaio de Migração celular em células HeLa e SiHa.....	40
4.13 Análise estatística.....	40
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 Farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Marté (açai).....	40
5.2 Quantificação Química de Fenóis e Flavonoides totais do substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	41
5.3 Atividades biológicas do substrato da farinha semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	42
5.3.1 Atividade antioxidante pela técnica DPPH e ABTS.....	42
5.4 Rastreamento e otimização de produção de L-asparaginase por Fungos utilizando como substrato da farinha da semente de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.....	44
5.4.1 Influência do tipo de fermentação de L-asparaginase de <i>Aspergillus niger</i> .....	45
5.5 Identificação do <i>Aspergillus niger</i> .....	48
5.5.1 Identificação microscópica do <i>Aspergillus niger</i> .....	48
5.5.2 Identificação molecular de <i>A. niger</i> .....	48
5.6 Influência de meio de precipitação de L-asparaginase.....	49

5.7 Caracterização bioquímica de L-asparaginase de <i>A. niger</i> .....	51
5.7.1 pH ótimo e estabilidade.....	51
5.7.2 Temperatura ótima e estabilidade.....	51
5.7.3 Efeito de agentes surfactantes e íons metálicos presentes nos sais.....	52
5.7.4 Estabilidade em solventes orgânicos.....	54
5.7.5 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	55
5.7.6 Tempo de armazenamento.....	56
5.8 Atividade citotóxica de L-asparaginase de <i>A. niger</i> em células RAW, GM, Hela e SiHa.....	57
5.8.1 Comparativo de Dose-resposta e concentração inibitória média de L-asparaginase de <i>A. niger</i> em células Hela e SiHa.....	59
5.9 Viabilidade morfológica da linhagem de células HeLa sob tratamento com L-asparaginase.....	60
5.10 Ensaio de Migração celular HeLa e SiHa.....	61
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74
<b>ANEXO I</b> .....	86
<b>ANEXO II</b> .....	89

## 1. INTRODUÇÃO

A cada ano, grandes mudanças no cotidiano dos indivíduos afetam de maneira significativa seu organismo e, conseqüentemente, geram diversas doenças agravantes, causando óbitos (DA SILVA *et al.*, 2022). Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o câncer é uma das principais causas de morte nas Américas (OPAS, 2020) e o câncer de colo do útero é o terceiro mais encontrado, onde mais de 56 mil mulheres na América Latina recebem o diagnóstico, e infelizmente, mais de 28 mil delas não sobrevivem a essa doença. Esses números aumentam para 72 mil diagnósticos e 34 mil óbitos, se considerarmos os Estados Unidos e o Canadá (OPAS, 2019), tornando-se de fato uma estatística expressiva e que necessita de atenção.

Sabe-se que o câncer de colo do útero é causado por uma infecção persistente e de alto grau, que pode ser provocada pelos vírus do *Human Papiloma Virus* (HPV) que, ao entrarem nas células, alteram sua fisiologia e geram graves lesões (DUARTE *et al.*, 2019). Os tipos mais comuns em todo o mundo são provocados pelos HPV's 16 e 18, que são os principais tipos ligados à carcinogênese (OLIVEIRA *et al.*, 2022). Tanto o HPV 16 quanto o HPV 18 são evitáveis, pois existe vacinação disponível (OLESEN *et al.*, 2019), todavia ainda não existem tratamentos medicamentosos que provoquem a cura ou remissão total das lesões provocadas pelos HPV's (EL-SALEM *et al.*, 2019).

Os produtos naturais e a própria matéria-prima destes, são objetos de vários estudos a respeito de formulações para produção de medicamentos e testes que não sejam tão agressivos ao corpo humano (FIGUEIREDO *et al.*, 2023). No caso do câncer do colo do útero, estudos sobre a criação de novas tecnologias para facilitar o tratamento precoce tanto de lesões intraepiteliais quanto do câncer já instalado, são conduzidos para a criação de produtos farmacêuticos que reduzam a incidência de lesões em células, como exemplo, a L-asparaginase, enzima amplamente estudada no combate a células oncogênicas (EL-GENDY *et al.*, 2021).

A indústria farmacêutica sintetiza essa enzima a fim de utilizá-la em medicamentos para leucemia linfoblástica aguda (LLA), todavia diversos efeitos colaterais são provocados em decorrência de sua principal via de produção, que são as bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*, gerando a necessidade de pesquisas de outras fontes de L-asparaginase, destacando a

liberação de metabólitos secundários por microrganismos eucarióticos e procarióticos, que em suma são capazes de produzir uma enzima de alta eficiência, natural e consequentemente causando menos efeitos adversos que um produto sintético (GOMES, 2021).

Para obtenção da L-asparaginase muito se pesquisou a respeito da espécie de fungo *Aspergillus spp.*, que são amplamente distribuídos na natureza e tem a capacidade de desenvolver diversos metabólitos, com destaque para a L-asparaginase (DIAS *et al.*, 2019). Nesse sentido, estudos que comprovem a eficácia desta enzima contra o HPV, podem significar um avanço nos estudos de remissão ou cura de casos de Lesão Intraepitelial de Baixo Grau (LSIL), Lesão Intraepitelial de Alto Grau (HSIL) e carcinoma *in situ*, em mulheres com tal diagnóstico, diminuindo assim a incidência de casos de câncer de colo do útero provocados por HPV.

A escolha da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart como substrato para o *Aspergillus niger*, se justifica pelo fato dela possuir excelente fonte nutricional, tornando-o um potencial produtor de L-asparaginase (SANTOS *et al.*, 2023), além disso o bagaço dos frutos de *E. oleracea* são uma fonte geradora de resíduos agroindustriais, tendo a oportunidade de aproveitamento, passam a ser fonte geradora de substâncias promissoras para o uso terapêutico, alimentício, entre outros, pela indústria (COELHO, 2021).

Esta pesquisa tem como objetivo a produção natural da enzima L-asparaginase pelo fungo *Aspergillus niger*, suplementado com a semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai), para desenvolvimento de alternativas de tratamento do câncer de colo do útero, provocado pelos sorotipos de HPV 16 e 18, criando desta forma, metodologias biotecnológicas com produtos naturais, promovendo benefícios que agregam significativamente ao tratamento de mulheres acometidas por HPV, além de ser um trabalho que muito tem a contribuir para o desenvolvimento sustentável.

Este estudo é o primeiro de seu tipo a relatar a atividade antineoplásica *in vitro* da L-asparaginase produzida por *Aspergillus niger* suplementados com a semente de *Euterpe oleracea* Mart.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Obter L-asparaginase de *Aspergillus niger* suplementados com a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart e analisar sua atividade antitumoral *in vitro*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai) para suplementação de *Aspergillus niger*;
- Analisar os compostos fenólicos e flavonoides e atividade biológica *in vitro* do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart;
- Rastrear fungos através dos tipos de fermentação para produção de L-asparaginase;
- Identificar por meio de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) as características genéticas do *A. niger*;
- Purificar os extratos brutos de L-asparaginase;
- Determinar e caracterizar a atividade enzimática da L-asparaginase;
- Verificar o potencial citotóxico da L-asparaginase de *A. niger* em células RAW, GM, HeLa e SiHa;
- Avaliar a viabilidade morfológica das linhagens de células HeLa e migração celular em células HeLa e SiHa após tratamento com L-asparaginase.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 *Euterpe oleracea* Mart

A *Euterpe oleracea* Mart (açai), conhecida como açai, é uma palmeira de porte médio (OLIVEIRA, 2022), que pode atingir a altura de até 25 m, com caule de 15 a 25 cm de diâmetro, geralmente possuem perfilhos com vários caules estipes em diferentes estágios de desenvolvimento, com características cilíndricas, lisas, de cor acinzentada, manchas de líquens, com cicatrizes deixadas pelas folhas que nascem em sua extensão. Sua altura e diâmetro chegam entre 3 e 20 m e 7 a 18 cm respectivamente, possuindo em sua porção terminal um conjunto de 8 a 14 folhas (CALBO *et al.*, 2000), conforme demonstrado na figura 1:

**Figura 1.** Palmeira da *Euterpe oleracea* Mart



Fonte: Acervo pessoal

A palmeira de *Euterpe oleracea* Mart é muito frequente na região amazônica, principalmente na região Norte e em alguns locais pantanosos da região Nordeste. É uma oleaginosa que possui sua polpa consumida em larga escala tanto pela população brasileira como internacional (OLIVEIRA, 2022). Os frutos (Figura 2) são coletados em todas as estações do ano (PAULA, 1975), fazendo com que sejam

geradas e consumidas grandes quantidades de resíduos agroflorestais, o que potencializa estudos para soluções viáveis, econômica, social e ambiental dessas matérias primas (AUGUSTI *et al.*, 2022).

**Figura 2.** Fruto de *Euterpe oleracea* Mart



Fonte: acervo pessoal

Dando destaque para a semente a *E. oleracea* Mart. (Figura 3) sua estrutura corresponde a um caroço desprovido de epicarpo e mesocarpo, com eixo embrionário diminuto e abundante tecido endospermico, de formato esférico e representando mais de 70% da massa do fruto completo (NASCIMENTO *et al.*, 2010).

**Figura 3.** Semente de *Euterpe oleracea* Mart



Fonte: Acervo pessoal

A semente de *E. oleracea* Mart, é um composto orgânico, rico em fibras, lipídios, proteínas, carboidratos e gorduras, sendo de grande relevância extrativista na região amazônica do Brasil (ZAVARISE, 2020), sabendo que através da semente ocorre a produção de óleos, que atualmente são utilizados para o desenvolvimento de cosméticos, medicamentos pela indústria farmacêutica e nutracêutica, além de seu uso na indústria de biomateriais e alimentícia, que tem explorado com êxito a capacidade deste produto. (LIRA *et al.*, 2021; SERRÃO *et al.*, 2021).

Entretanto, as sementes de *Euterpe oleracea* Mart., ainda podem ser tratadas como resíduos de polpa, sendo encontradas pelas ruas (figura 4), gerando acúmulos nos lixões, e pouco se estudava sobre sua importância para a ciência e possibilidades industriais, todavia, no decorrer dos anos foram ganhando papel de destaque em pesquisas científicas, e potencial valor econômico agregado (OLIVEIRA, 2022).

**Figura 4.** Caroços da *Euterpe oleracea* Mart



Fonte: Acervo pessoal

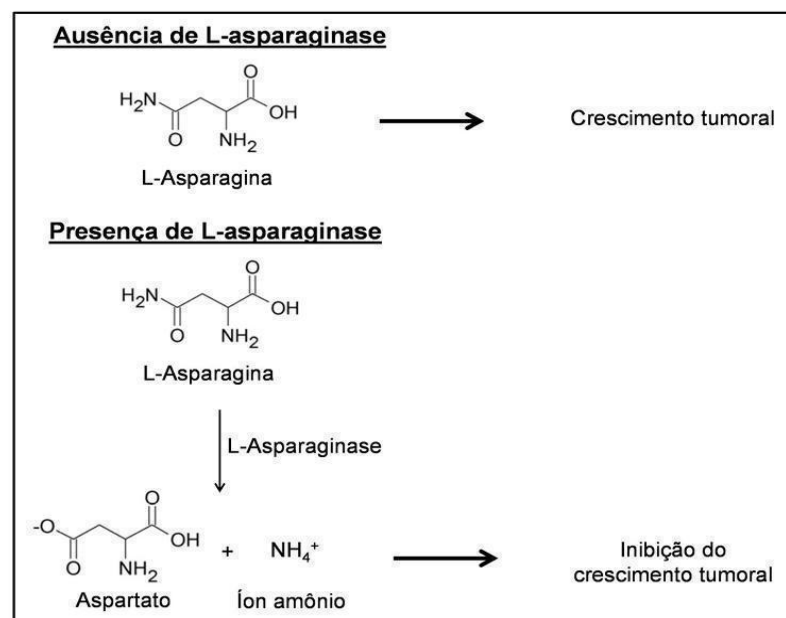


### 3.2 Atividade antitumoral da enzima L-asparaginase

A enzima L -asparaginase nos últimos 40 anos que tem sido estudada através de sua purificação e caracterização (LUBKOWSKI & WLODAWER, 2020), na busca de utilizar e avaliar sua capacidade anticarcinogênica contra diferentes alterações linfoproliferativas, que é o caso da leucemia linfoblástica aguda (LLA) e linfoma de Hodgkin (MUNEER *et al.*, 2020), e no caso da LLA infantil, a L-asparaginase tem conseguido aumentar a taxa de sobrevivência da criança para 90% (FONSECA *et al.*, 2021).

O tratamento da LLA não afeta as células saudáveis, pois estas ainda conseguem sintetizar asparagina endogenamente usando a asparagina sintetase (ASSN), uma enzima que catalisa a conversão do aspartato em asparagina usando a glutamina como fonte (FONSECA *et al.*, 2021). Muneer *et al.* (2020), em seu trabalho, fala da capacidade da enzima de converter a L-asparagina em ácido aspártico (aminoácido essencial) e amônia (composto químico), conforme demonstrado na Figura 5, justificando sua atividade antineoplásica, já que tanto o aminoácido quanto a amônia estão envolvidos em diversas atividades biológicas de regulação do corpo humano.

**Figura 5.** Representação esquemática da ação de L-asparaginase após tratamento do câncer

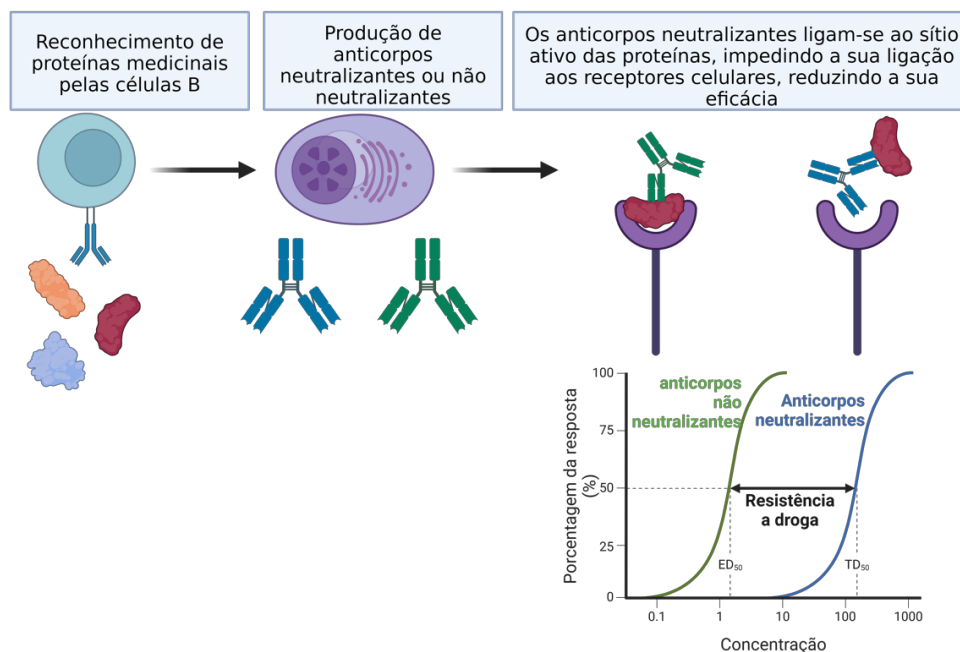


Fonte: EINSFELDT, (2014) adaptado

Outra questão, é que a L-asparaginase faz parte do grupo de compostos antileucêmicos, devido a quantidade de asparagina sintetizada endogenamente pelas células blásticas leucêmicas ser insuficiente, fazendo com que esta dependa de um suprimento externo para crescimento (FONSECA *et al.*, 2021).

Sabe-se que proteínas medicinais são potentes indutores de produção de anticorpos antidrogas (AAD), sendo chamados também de anticorpos neutralizantes (Figura 6) ou não neutralizantes. Ocorre que anticorpos neutralizantes podem se ligar ao sítio ativo da proteína terapêutica, inibindo seu mecanismo de ação e reduzindo sua eficácia, direcionando o tratamento para uso de doses maiores ou mais frequentes, caso contrário, poderá não ocorrer o efeito terapêutico em sua totalidade (BAKER *et al.*, 2010), isso acontece porque é natural que bioprodutos terapêuticos compartilhem semelhanças estruturais com proteínas naturais do organismo receptor (KHANEGHAH & FAKHRI, 2019).

**Figura 6.** Respostas imunológicas adaptativas à microrganismos extracelulares



Proteínas medicinais podem ser reconhecidas por linfócitos B e induzir a produção de anticorpos antidrogas (AAD). Os anticorpos (AC) podem ser classificados em neutralizantes ou não neutralizantes. Os não neutralizantes (em verde) se ligam a molécula alvo sem comprometer suas funções. Os AC neutralizantes (em azul) por sua vez, se ligam aos sítios ativos da molécula, comprometendo suas funções e/ou seu reconhecimento por receptores celulares. A produção de AADs neutralizantes podem comprometer o uso de proteínas medicinais, exigindo doses maiores ou mais frequentes que podem comprometer o tratamento. Fonte: Autor – Criado com BioRender.com

Sobre os anticorpos não neutralizantes, embora não se liguem ao sítio ativo, estes podem acelerar o processo de depuração do fármaco, formando imunocomplexos juntamente com os bioterapêuticos, sendo capazes de removê-los da circulação sanguínea através do sistema reticuloendotelial (FONSECA *et al.*, 2021).

A L-asparaginase embora seja uma enzima de grande potencial terapêutico, se destaca pela sua alta capacidade de provocar respostas imunes em pacientes, por conta do seu tamanho molecular avantajado e muitas vezes por ser de origem bacteriana (FONSECA *et al.*, 2021). No momento em que a L-asparaginase entra em contato com o corpo humano, tanto os linfoblastos normais quanto os leucêmicos poderão fragmentá-las através das proteases lisossômicas catepsina B e asparagina endopeptidase (FUNG *et al.*, 2017), intensificando o processamento antigênico e proporcionando uma resposta imune notável (BATOOL *et al.*, 2016; VERMA *et al.*, 2007).

Muitos tratamentos com a L-asparaginase obtida principalmente de bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*), são interrompidos devido a efeitos colaterais como anafilaxia, urticária, coceira, erupção cutânea, edema, eritema, doença do soro e broncoespasmo (PIETERS *et al.*, 2011). Bowman *et al.* (2011), apresentaram em sua pesquisa que efeitos indesejados como esses, foram observados desde a década de 70, entretanto, cerca de 30 a 75% dos usuários de L-asparaginase apresentam algum tipo de hipersensibilidade, onde até 70% desses pacientes desenvolvem AAD.

Por outro lado, não se tem medido esforços para produção e sintetização da L-asparaginase por diversas fontes naturais, utilizando outras espécies de microrganismos, como é o caso do estudo de Vala *et al.* (2018), que utilizou o *Aspergillus niger* de origem marinha para sintetizar a L-asparaginase e percebeu que a enzima purificada (resultado do produto), apresentou atividade antiproliferativa contra várias linhagens celulares de câncer.

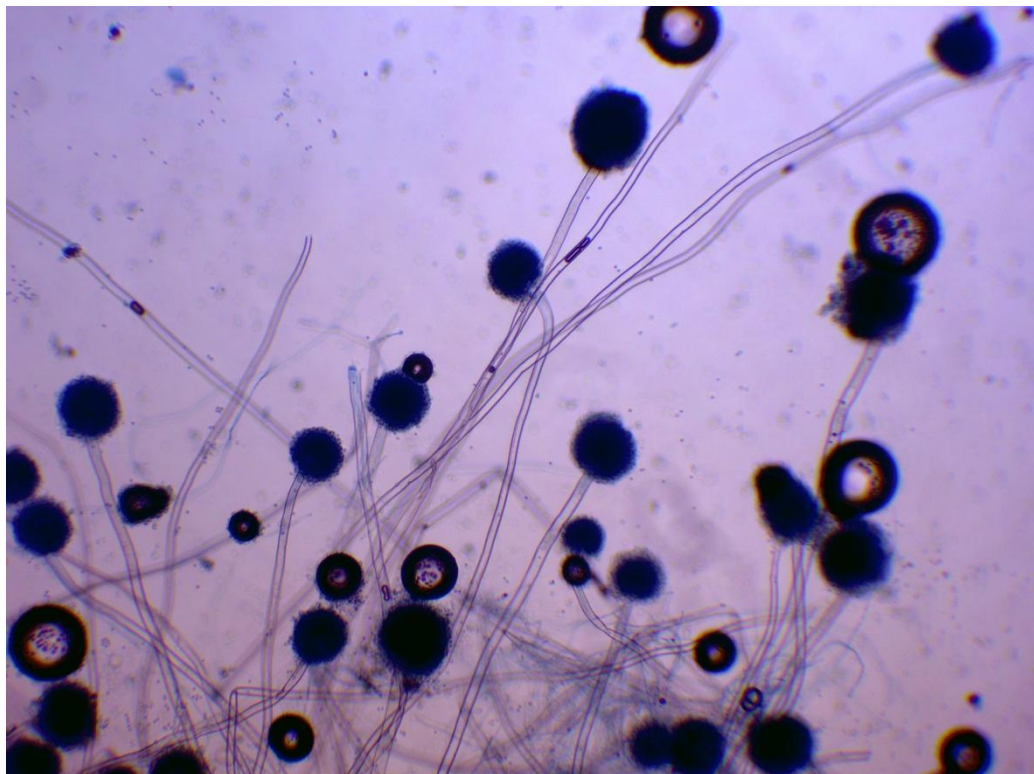
Além disso, a L-asparaginase é amplamente utilizada como fonte terapêutica, e na indústria de alimentos, com o objetivo de combater a acrilamida, um potente carcinógeno humano presente em alimentos industrializados como batata frita, cereais, biscoitos, entre outros (VALA *et al.*, 2018), existindo uma extensa variedade de organismos, incluindo microrganismos, como bactérias, fungos, algas e plantas

que produzem L-asparaginase (MUNEER *et al.*, 2020), o que justifica a escolha dessa enzima associada ao fungo *Aspergillus niger*, para o presente estudo.

### 3.2.1 Uso biotecnológico das atividades biológicas do *Aspergillus niger*

O gênero *Aspergillus* sp. é um fungo cujos conídios são encontrados no ar, seu táxon possui mais de 200 espécies distribuídas na natureza. O gênero *Aspergillus niger*, apresenta fases assexuada ou mitótica de ascomicetos da ordem Eurotiales, subgênero Circumdati, classe dos hyfomicetes, seção niger (BENICIO *et al.*, 2003). O *Aspergillus niger* é um fungo ascomiceto filamentoso (Figura 7) (BAKER, 2006), microrganismo de elevada importância biotecnológica, que é amplamente estudado há mais de 50 anos, ainda mais por produzir enzimas extracelulares (SCHUSTER *et al.*, 2002).

**Figura 7.** *Aspergillus niger* via microscopia de ótica infinita



Fonte: Acervo pessoal

Para a produção de enzimas em larga escala através de microrganismos, se faz necessário avaliar o aspecto custo-eficácia, pois o aproveitamento de resíduos naturais e industriais como substrato para a produção de enzimas gera fatores

econômicos e favoráveis ao meio ambiente (ANDRADE *et al.*, 2022). Rodríguez-zúñiga *et al.* (2011) demonstrou em seu trabalho que a fermentação em estado sólido de diferentes substratos (bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e farelo de trigo), que seriam desprezados no meio ambiente, resultou no aumento da produção enzimática de celulases por *A. niger*, pois são resíduos que seriam desprezados, no entanto, foram aproveitados como substratos fúngicos.

Contudo, vinculada a ampla distribuição do *A. niger* na natureza e sua alta capacidade de produção enzimática, justifica-se a sua utilização frequente associada a resíduos agroindustriais, já que ele demonstra afinidade com esses produtos para produzir enzimas de amplo uso industrial como lipase, L-asparaginase e celulose, (COELHO *et al.*, 2001).

### **3.3 Câncer de colo do útero e suas prospecções de tratamento com produtos naturais**

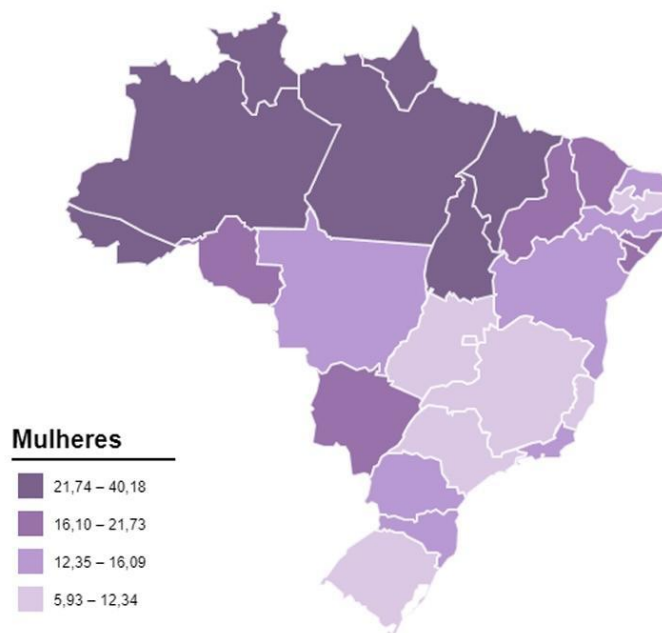
O câncer do colo de útero é diagnosticado em mulheres por todo o planeta, principalmente em mulheres de países em desenvolvimento, como alguns países latino-americanos, notando-se que problemas como escassez ou mesmo a falta de serviços de saúde, educação informativa e preventiva, ações geradas por programas de saúde que intervenham e controlem os dados epidemiológicos, além de acesso a exames preventivos como o teste de Papanicolau, acabam contribuindo para o avanço do câncer cervical (SIMOES *et al.*, 2019).

A infecção por HPV é considerada o principal fator de risco para o câncer de colo do útero, e atrelado a fatores socioeconômicos, ambientais e estilo de vida (início precoce da vida sexual, alcoolismo, tabagismo, múltiplos parceiros sexuais, pouca higiene genital e uso prolongado de contraceptivos orais), o aparecimento dos sintomas se tornam ainda mais acelerados. Existem mais de 200 tipos de HPV catalogados, entretanto somente 13 destes estão relacionados à carcinogênese cervical uterina (INCA, 2019), e os sorotipos 16 e 18 estão envolvidos em 70% dos casos de lesão intraepitelial cervical (SIMOES *et al.*, 2019).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), apenas no ano de 2020, 6.627 mulheres no Brasil foram a óbito, provocado por câncer de colo do útero, sendo que 2058 desses casos, ocorreram na Região Nordeste, perdendo apenas para a Região Sudeste do país, onde foram registrados 2198 casos (INCA, 2023).

Em uma análise regional realizada pelo INCA (2019), o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na região Norte (26,24/100 mil) e o segundo nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil). Já na região Sul (12,60/100 mil) ocupa a quarta posição e, na região Sudeste (8,61/100 mil), a quinta posição (figura 8), demonstrando a necessidade de concentrar esforços para descobertas de novos tratamentos capazes de diminuir esses indicadores.

**Figura 8.** Representação espacial das taxas estimadas de incidência por neoplasia maligna do colo do útero, ajustadas por idade pela população mundial, por 100 ml mulheres



Fonte: INCA, 2019 (adaptado)

Behaker (2021), em seu estudo mostrou que os inibidores de Histona Desacetilase (HDACi) foram capazes de promover a parada do ciclo celular, causando apoptose pela via intrínseca, diminuindo os níveis das proteínas do RNA mensageiro dos oncogenes E6 e E7, reduzindo a atividades do vírus do HPV.

Na pesquisa de FATIMA *et al.* (2019), foi utilizada a enzima L-asparaginase produzida da bactéria *P. aeruginosa* (fonte natural), para inibir o crescimento de células de câncer cervical humano *in vitro*, obtendo resultados promissores, fortalecendo ainda mais a prospecção do uso de enzimas extraídas de fontes naturais para tratamentos de câncer.

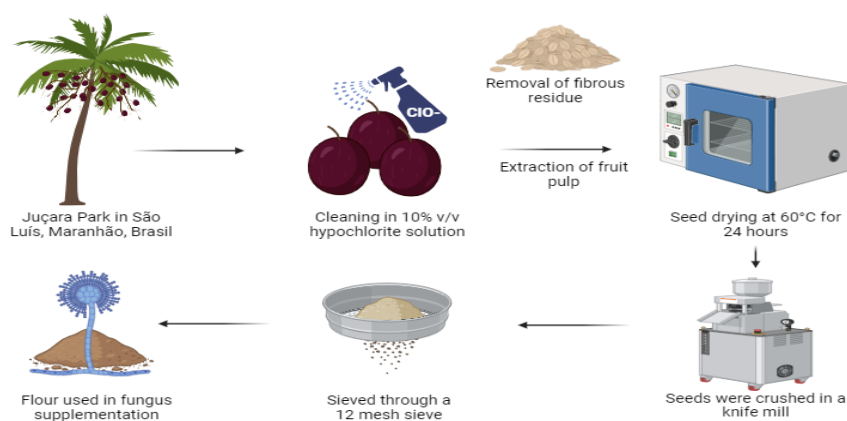
Os extratos *Euterpe oleracea* Mart e *Geissospermum vellosii* foram aplicados nas células SiHa e HeLa, para verificação de sua atividade antitumoral, na pesquisa de Pinto *et al.* (2023), e constatou-se que os efeitos de citotoxicidade sobre as duas linhagens estudadas, forem promissores com o uso do extrato alcoólico de *Geissospermum vellosii*, mostrando que são válidos e necessários os esforços para descobertas de tratamentos extraídos de produtos presentes na natureza.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparação da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai)

Os frutos de *Euterpe oleracea* Mart são provenientes do Parque do Juçara (Av. Principal - Maracanã, São Luís - Maranhão, Brasil, 65000-000), e foram manipulados no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os frutos foram selecionados e higienizados em solução de hipoclorito a 10% v/v, logo em seguida foram despulpados, a parte fibrosa foi removida e as sementes limpas. A secagem das sementes foi realizada em estufa de circulação de ar (SL-100 de 27 a 150 litros) em 60 °C durante 24h. Após a secagem as sementes foram trituradas em moinho e peneiradas em peneira de 12 *mesh*, para a obtenção da farinha utilizada na suplementação dos fungos utilizados neste estudo (Figura 9) (SILVA *et al.*, 2016).

**Figura 9.** Etapas da preparação da farinha semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai)



Passo a passo das etapas de preparação da farinha da semente de *E. oleracea* Mart. Fonte: Autor – Criado com BioRender.com

## **4.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos e flavonoides totais do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart**

A determinação de fenólicos totais do substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart, foi realizada através do método colorimétrico quantitativo de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2002). Com curva padrão expressa em ácido gálico (5 a 100  $\mu\text{g}$  ácido gálico  $\text{mL}^{-1}$ ). Em que o teste foi realizado com 2,0 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v), e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) e 100 $\mu\text{L}$  da concentração 500  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$  da amostra (substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart), após homogeneização e abrigo de luz por 30 min., foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 760nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida a partir da curva de ácido gálico.

A determinação dos teores de flavonóides totais foi realizada segundo o método descrito por Woisky e Salatino (1998) com adaptações. Para o estudo utilizou-se alíquotas de 3,0 mL das amostras em estudo na concentração de 500  $\mu\text{g}$   $\text{mL}^{-1}$  com a adição de 300  $\mu\text{L}$  de solução etanólica de Cloreto de alumínio 5% ( $\text{AlCl}_3$ ), foi homogeneizada e colocada sob abrigo de luz por 30 min. Para posterior leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 420 nm. O conteúdo de flavonoides totais foi determinado usando uma curva padrão de quercetina (5 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides totais, sendo os resultados expressos em mg de quercetina por grama da amostra.

## **4.3 Atividade biológica *in vitro* do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart**

### **4.3.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH e ABTS**

A avaliação da atividade antioxidante do substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart., foi conduzida utilizando as técnicas de DPPH com base na metodologia de Brand-Williams & Berset (1995) e ABTS conforme proposto por Re *et al.* (1999) com adaptações de Teles *et al.* (2021).



Inicialmente, as amostras foram medidas em triplicata, com concentrações variando de 500 a 125 µg/mL para ambas as técnicas (DPPH e ABTS). Para realizar as medições, 200 µL de cada solução foram transferidos para tubos de ensaio, seguidos pela adição de 3000 µL da solução do respectivo radical a ser testado, foram homogeneizados, e mantido em ambiente escuro por 6 minutos para a técnica ABTS e por 30 minutos para a técnica DPPH. O etanol foi utilizado como controle (branco). Após o abrigo de luz as absorbâncias foram lidas para o DPPH (517nm) e ABTS (734nm), foi possível construir a curva "concentração vs. absorbância" para cada amostra.

#### **4.4. Rastreamento de Fungos para Produção de L-asparaginase utilizando como substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai)**

Com o objetivo de obter possíveis fontes de produção de L-asparaginase com alta atividade enzimática quando utilizado como substrato a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, foram verificadas as atividades enzimáticas dos extratos brutos produzidos pelos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvulária*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens* e *Rhizopus sp.* Todos os microrganismos do estudo foram obtidos da micoteca (isolados do ar e ambiente marinho) da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil.

##### **4.4.1 Influência do tipo de fermentação para produção de L-asparaginase**

Os extratos brutos foram obtidos de dois tipos de fermentação: Fermentação semi-sólida (FSS) e Fermentação Submersa (FSBm) e produzidos pelos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Curvulária*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens* e *Rhizopus sp.*

##### **4.4.1.1 Fermentação Semi – sólida (FSS)**

Os fungos foram submetidos à fermentação FSS para produção de L-asparaginase segundo a metodologia de Dias *et al.*, (2015) adaptada, 50g de farinha da semente de açai e 20mL de solução L-asparagina 100 mMol/L<sup>-1</sup>, foram adicionados 5 fragmentos do meio de cultura, aproximadamente 5mm<sup>2</sup> de cultivo, foram mantidos

por 120h em temperatura de 30°C. Após o período de fermentação, os cultivos foram adicionados de 50 mL de tampão tris – HCl 50 mMol/L<sup>-1</sup> pH 8,0 sob agitação a 190 rpm em temperatura de 25°C, por 60 min. Após a agitação, os cultivos foram filtrados e centrifugados a 14.000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi considerado como extrato bruto de FSS.

#### **4.4.1.2 Fermentação Submersa (FSBm)**

No estudo conduzido por FSBm, foi seguida abordagem metodológica adaptada de Mahajan *et al.* (2013). Com objetivo de avaliar o potencial da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart. Para isso, foram utilizados diferentes caldos nutrientes comerciais (Caldo Czapek®, Peptona de Carne Bacteriológica®, Khanna®, Vogel®, Meio SR®) como referência e comparação dos resultados. Os frascos com caldos nutrientes comerciais e o frasco com a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, continha o meio tampão tris – HCl 50 mMol/L<sup>-1</sup> pH 8,0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (2 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,52 g/L), CuSO<sub>4</sub> (0,001 g/L), ZnSO<sub>4</sub> (0,001 g/L), FeSO<sub>4</sub> (0,001 g/L) e L-asparagina (10 g/L), adicionados 5 fragmentos do meio de cultura, aproximadamente 5mm<sup>2</sup> de cultivo. Os meios líquidos foram mantidos sob agitação orbital a 190 rpm em temperatura de 30°C durante 7 dias, amostras foram coletadas a cada 24 horas, com o objetivo de verificar o tempo de maior atividade enzimática. As amostras coletadas foram filtradas, centrifugadas em 10.000 rpm a 4°C em 25 minutos e o sobrenadante foi considerado como extrato bruto de FSBm.

### **4.5 Fungo que apresentou melhor produção de L-asparaginase suplementado com a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart**

#### **4.5.1 Identificação microscópica do Fungo**

O Fungo obtido da coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão, isolados do ar do ambiente marinho da cidade universitária da UFMA, foram analisados via microscopia de óptica infinita, em objetiva de 40x. Sendo colocada uma gota do reagente Azul de Amann, sobre uma lâmina perfeitamente limpa, para colorir os esporos e outras estruturas do fungo. Com o estilete limpo e flambado, foram removidas pequenas porções de material a ser examinado e depositado sobre a gota.

A lâmina foi comprimida com batidas suaves e rápidas, executadas com o cabo do estilete, depois coberta com lamínula.

#### **4.5.2 Identificação molecular do Fungo**

##### **4.5.2.1 Cultura e Isolamento fúngico**

A amostra ambiental do fungo filamentosso identificado previamente como pertencente à espécie *A. niger* da coleção da micoteca (isolados do ar e ambiente marinho) da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brasil. foi utilizado para essas análises. O cultivo dos fungos foi realizado em placas de Petri de meio cultura Sabouraud Dextrose 4% (MERCK) e incubados em estufa bacteriológica (SOLAB SL-101) a 37 °C por 5 dias. Todos os procedimentos de cultivo e repicagem ocorreram em capela de fluxo laminar próximo ao bico de Bunsen.

##### **4.5.2.2 Extração de DNA**

A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia de Valenzuela-Lopez *et al* (2017). As cepas foram colocadas em tubos de Falcon contendo esférulas de vidro e dissolvidas em *lysis fungal solution* (LFS) 1%. Foram agitadas 2.000 rpm por 5 minutos e colocadas em banho-maria a 65°C por 1 hora. Foram adicionados 500 µl de tampão de lise e novamente agitadas em *vortex* por 40 segundos. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm. Foram adicionados 275 µl de acetato de amônio (pH 7) e as amostras foram incubadas por 5 minutos em banho-maria a 65°C. Após esse procedimento, foram incubadas em gelo por 5 minutos.

Foram adicionados 500 µl de fenol clorofórmio e as amostras centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm. 600 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 2mL e adicionou-se 1 ml de álcool isopropílico. Após agitação de 2.000 rpm por 5 minutos o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 400 µl de etanol 70% e posterior centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado por decantação sobre um papel de filtro. Após 24 horas as amostras foram dissolvidas em 50 µl de H<sub>2</sub>O ultrapura e incubadas por 20 minutos a 37°C. As amostras foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, as amostras foram quantificadas. A pureza e a concentração do DNA foram determinadas por meio do espectofotômetro Nano

Drop2000/2000c UV-Vis. Quando as relações entre as densidades ópticas, A260/A280, foi igual ou maior que 1.7, o material foi considerado puro.

#### 4.5.2.3 Reação da cadeia em polimerase (PCR) da região ITS

Para análise molecular foram utilizados primers espécie específicos (Thermofisher- Scientific) da região do espaçador interno transcrito (ITS) e fragmentos ITS1-5.8S-ITS2 (White et al., 1990). As sequências de nucleotídeos utilizados foram ITS 1 (5'- GCTCATTAAATCAGTTATCG-3') e ITS 2 (5'- GTTATTATGATTCACCAAGG-3' -3') de acordo com Alabdall et al., (2020).

Reação da cadeia em polimerase (PCR) das regiões tiveram volume final de 25ul, com a utilização de Conjunto para PCR MasterMix (Ludwig Biotecnologia) contendo Tris-KCl, pH 8,4; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM DNTP mix e 2,5 U de Taq DNA polymerase; 12,5 µl de Pré-Mix; 6,5 µl de água ultrapura; 2,5 µl dos primers ITS1-5.8S-ITS2 (Termofisher Invitrogen 10 pmol mL<sup>-1</sup>) 1,0 µl DNA (5 ng mL<sup>-1</sup>) e seguindo as seguintes condições de termociclagem no equipamento Termocicladores Biocycler MJ96G.

A descrição dos ciclos de PCR realizados para amostras de *A. niger* foi de 95°C por 8 min, 34 ciclos 94° C por 1 min, 57° C por 1 min e 72 C por 1 min e depois 72 C por 7 min para extensão e finalizando em 4 °C. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel agarose a 1,5 % a 90 V por 120 minutos em TBE 1X (Ludwig Biotecnologia) e marcador molecular (Ladder 100 pb – 0,1 µg/µl-Ludwig Biotecnologia). Os produtos foram avaliados quanto a qualidade em transluminador (Loccus L-PIX TOUCH) (Vilber Lourmat ECX-F20.M).

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese para verificar se houve amplificação. Em seguida, foi realizada a eletroforese de gel de agarose acordo com Sambrook & Russel (2001), uma quantidade de 1g de agarose foi pesada e, simultaneamente, 40 mL de solução tampão contendo Tris, Borato e EDTA (TBE) 1X foram medidos em uma proveta. A agarose foi então dissolvida na solução de TBE 1X, cuja saída estava vedada com filme plástico. A mistura foi levada ao micro-ondas por 1 minuto e 30 segundos. Após o período de aquecimento, a solução foi agitada vagarosamente até que a agarose estivesse completamente dissolvida e foi acrescentado 3 µl de brometo de etídio à solução de agarose.

Após essas etapas, foram misturados 4 µl de cada produto de PCR e 3,5 µl do corante *DNA Loading Buffer (6X)* (*Ludwig Biotec*). Em seguida, foram pipetados 7,5 µl dos volumes de cada uma das amostras nos poços do gel e 3 µl de marcador *Ladder* separadamente. As amostras serão então submetidas à eletroforese em gel agarose a 1% a 90 V por 40 minutos em TBE 1X. Os produtos foram avaliados em transluminador quanto a sua quantidade e qualidade.

#### **4.6 Purificação dos extratos brutos de L-asparaginase**

Os extratos brutos das FSBm e FSS obtidos foram precipitados segundo a metodologia de Vala et al. (2018) adaptada, em diferentes frações da L- asparaginase: (0 - 40%) e (40 - 80%) de etanol, isopropanol e sulfato de amônio, com o objetivo de evitar perdas significativas de proteínas e verificar quais métodos de precipitação são mais adequados para L-asparaginase, otimizando a sua extração. Os precipitantes foram adicionados nos extratos brutos de L-asparaginase e mantidos a 4 °C por 24 horas em agitação branda, sendo depois centrifugada a 14.000 rpm por 25 min a 4 °C.

O precipitado foi ressuspendido em um volume na proporção ¼ do volume total do extrato centrifugado com tampão tris - HCl 50 mMol/L<sup>-1</sup> pH 7.0. Em seguida, foi realizado o processo de diálise, a suspensão foi dialisada em 5 litros contra o mesmo tampão utilizado para preparação dos extratos brutos a 4 °C por 6h, com duas trocas a cada 3 horas e a última troca foi mantida em “overnight”.

Após a diálise, os precipitados foram centrifugados a 10.000 rpm por 25 minutos a 4°C e foram ressuspendidos com o mesmo tampão utilizado para preparação dos extratos e armazenados a - 34°C para os estudos seguintes classificados como: L-asparaginase F1 (Fração 0 – 40%) e L-asparaginase F2 (Fração 40 – 80%). As purificações das frações foram realizadas através de cromatografia de troca iônica utilizando a coluna dietilaminoetil celulose (DEAE celulose).

#### **4.7 Concentração de proteína**

A concentração de proteínas foi estimada pelo método de Warburg & Christian (1941) em espectrofotômetro nas absorvâncias de 260 nm e 280 nm, utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{concentração de Proteína}] \text{ mg/mL} = A_{260\text{nm}} \times 1,55 - A_{280\text{nm}} \times 0,75$$

#### **4.8 Determinação da atividade de L-asparaginase**

A atividade da L-asparaginase foi avaliada pela formação de  $\beta$ -hidroxamato aspártico a partir de asparagina e hidroxilamina, de acordo com DRAINAS *et al.* (1977). A mistura de reação foi constituída de 300  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup>, pH 8,0; 100  $\mu\text{L}$  de L-asparagina 100 mmol L<sup>-1</sup>; 100  $\mu\text{L}$  de hidroxilamina 1M e 500  $\mu\text{L}$  da amostra enzimática. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C, por 15 min, sendo a reação interrompida com adição de 250  $\mu\text{L}$  de solução constituída de HCl (2,4%), cloreto férrico (10%) e TCA (5%).

A reação enzimática entre o hidroxamato aspártico e cloreto férrico produz uma coloração avermelhada, cuja absorbância foi medida em espectrofotômetro a 500 nm. A curva analítica foi feita utilizando-se uma solução de  $\beta$ -hidroxamato aspártico (0,1  $\mu\text{mol/mL}$  a 3  $\mu\text{mol/mL}$ ). Uma unidade de atividade de L-asparaginase (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -hidroxamato aspártico por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica da L-asparaginase foi expressa como  $\mu\text{mol}$  de  $\beta$ -hidroxamato aspártico formado por minuto por miligramas de proteína.

#### **4.9 Caracterização bioquímica de L-asparaginase purificada do Extrato de Fungo**

##### **4.9.1 pH ótimo e estabilidade**

Foram testados diferentes faixas de pH com variações de pH 3,0 a 9,0 das soluções de tampão acetato 0,1M, tris – HCl 0,1M e citrato fosfato 0,1M. Para estabilidade, a reação de cada faixa de pH foi mantida por 1 h a 37°C, os testes foram feitos em triplicata nas condições reacionais descritas no item 4.8.

##### **4.9.2 Temperatura ótima e estabilidade**

Para determinação da temperatura ótima, a solução de L-asparaginase 100 mmol L<sup>-1</sup> foi mantida durante 30 minutos em temperaturas de 10 a 90 °C e para

estabilidade a enzima foi mantida por 1h nas mesmas faixas de temperaturas. Os testes foram feitos em triplicata nas condições reacionais descritas no item 4.8.

#### **4.9.3 Efeito de agentes surfactantes e íons metálicos presentes nos sais**

Para avaliar a estabilidade frente a diferentes surfactantes e íons, foi utilizado a metodologia de VALA *et al.* (2018) adaptada, a L - asparaginase foi incubada durante 1 h em diferentes proporções 0,01%, 0,10% e 0,50% (p/v) dos seguintes surfactantes: Triton X-100, Tween-20 e Tween-80 (não-iônicos) e dodecil sulfato de sódio SDS (iônico). O efeito dos íons metálicos na atividade enzimática, foram realizados através da pré-incubação L-asparaginase em tampão Tris-HCl de 50 mM (pH 8.0) com 0,01 mM de CoSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> a 35 °C por 1h. Os testes foram feitos em triplicata e atividade residual foi medida segundo item 4.8.

#### **4.9.4 Estabilidade em solventes orgânicos**

Para determinar a estabilidade da L-asparaginase F2 de *A. niger* em acetona, etanol, metanol e isopropanol utilizou a metodologia de Oliveira *et al.* (2020) adaptada para L-asparaginase, a enzima foi incubada por 1 h a 37°C em diferentes concentrações de solventes (25, 50, 80 e 100%, v/v). Após a incubação, a atividade residual foi medida segundo item 4.8.

#### **4.9.5 Determinação dos parâmetros cinéticos**

Os parâmetros cinéticos foram testados pela Constante de Michaelis (Km), velocidade máxima (Vmax) e da L-asparaginase purificada foram determinados segundo a metodologia de Vala *et al.* (2018) usando substrato L-asparagina na faixa de concentração de 0,1 a 6 mMol/L<sup>-1</sup> por 30 min a 35°C e sua atividade residual foi determinada segundo o item 4.8.

#### 4.9.6 Tempo de armazenamento

Com o objetivo de determinar o tempo de armazenamento da L-asparaginase de *A. niger* em temperatura de 34°C, foi verificada a atividade enzimática a cada 15 dias para determinar a sua atividade residual.

#### 4.10 Atividade citotóxica da L-asparaginase em células RAW, GM, HeLa e SiHa

A citotoxicidade da enzima foi verificada utilizando a metodologia El-Gendy *et al.* (2018) e Mosman (1983) com adaptação, as células humanas derivadas de fibroblasto humano (Células GM) e macrófagos murinos (RAW 264.7) como controle em células saudáveis, carcinoma epitelial cervical (HeLa) e células de câncer uterino (SiHa) foram cultivadas em meio DMEM - Low Glucose suplementada a 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico incubadas em estufa a 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Após o período de cultivo, as células foram tripsinizadas, centrifugadas a 1.200 RPM por 10 minutos, contadas em câmara de Neubauer e posteriormente aliquotadas em uma densidade de inoculação de 1x10<sup>4</sup> células/ml, utilizando placas de 96 poços e tratadas nas concentrações de L - asparaginase de *A. niger* 100 a 6,25 µg/mL<sup>-1</sup> no período de 24, 48 e 72h. A viabilidade celular foi estimada usando 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolium brometo (MTT) como:

$$[(\text{amostra} - \text{em branco}) / (\text{controle} - \text{em branco}) \times 100\%]$$

A quantidade de enzima que inibiu 50% da viabilidade (IC<sub>50</sub>) foi calculada. A viabilidade celular na presença de DMSO em vez de enzima foi medida como um controle.

#### 4.11 Viabilidade morfológica em células HeLa via Microscopia de Luz Invertida

A morfologia celular foi analisada por microscopia de luz invertida (Optika Microscope, Eco, Estados Unidos da América), após tratamento com L-asparaginase na concentração de 100 µg/mL. A análise de imagens foi realizada utilizando o software Axiovision Release 4.8.1 (Carl Zeiss Inc., Jena, Alemanha). As células foram



cultivadas em placas de 12 poços na presença e ausência de L-asparaginase por 24, 48 e 72 horas e depois observadas ao microscópio.

#### **4.12 Ensaio de Migração celular em células HeLa e SiHa**

O ensaio de migração celular foi realizado segundo a técnica de migração Transwell, nas células HeLa e SiHa, que foram cultivadas em placas de 24 poços a  $1,5 \times 10^5$  células/poço suplementadas com 10% de soro fetal bovino e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para permitir que as células se fixassem e formassem uma monocamada. Os riscos retos foram feitos na monocamada celular usando ponta de pipeta de 200 µl.

O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS 1X para remover os resíduos celulares. Em seguida, as células foram tratadas com 1,731 µg/mL (IC50) na Linhagem HeLa e 74,498 µg/mL (IC50) na linhagem SiHa de L-asparaaginase de *A. niger* e mantidas por 72 horas, as células tratadas com meio de cultura sem L-asparaginase foram utilizadas como controle negativo. As lacunas das fendas foram fotografadas nos intervalos de 0 e 72 horas, usando um microscópio invertido Axiovert 200M (Zeiss; Alemanha) e medidas utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) nas imagens tiradas dos poços com os testes controle e com a enzima no meio de cultura. A área da lesão foi determinada em milímetros (mm).

#### **4.13 Análise estatística**

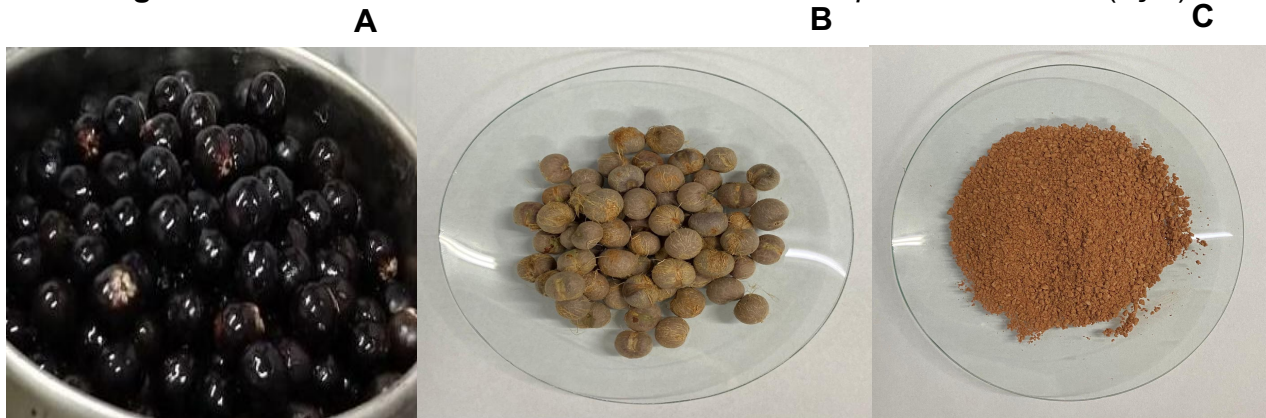
Os resultados deste estudo foram analisados através de uma análise com ANOVA e Tukey ( $p < 0.05$ ) pelo software GraphPad Prism 8.0.1. Os resultados foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) das determinações triplicadas.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai)**

Após trituração em moinho e peneiradas em peneira de 12 *mesh*, as sementes da *E. oleracea* Mart foram transformadas em farinha (Figura 10), que foi utilizada na suplementação dos fungos empregados neste estudo.

**Figura 10** Resultado da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart (açai)



A: Sementes após a coleta; B: Sementes após a higienização; C: Farinha produzida com a semente

## 5.2 Quantificação Química de Fenóis e Flavonoides totais do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart

O teor de compostos fenólicos totais encontrados para substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart, como observado na (Tabela 1), calculados através da equação de regressão  $y = 0,0009x - 0,0681$ , com  $R^2$  de (0,9961). O teor de Flavonóide totais foi calculado através da equação de regressão  $y = 0,028x - 0,0625$ , com  $R^2$  de (0,9938).

**Tabela 1.** Teores de compostos fenólicos e flavonoides totais do substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

Amostra Analisada	Quantificação Química	
	fenólicos totais (mg EAG g <sup>-1</sup> )*	flavonoides totais (mg EQ g <sup>-1</sup> )*
<b>Substrato da farinha da semente de açai</b>	56,75 ± 0,353	27,74 ± 0,8046

\*EAG = equivalente em ácido gálico. \*EQ = equivalente em quercetina. Valores das médias das triplicatas ± desvio padrão.

Fonte: autores, (2023).

A análise química realizada no substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, revelou conteúdos significativos de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Os fenólicos totais foram quantificados em aproximadamente 56,75 miligramas de equivalente de ácido gálico por grama (mg EAG g<sup>-1</sup>), com uma margem de erro de ± 0,353. Esses compostos são reconhecidos por suas propriedades

antioxidantes e têm sido associados a benefícios para a saúde, devido à capacidade de combater o estresse oxidativo no organismo.

Além disso, os flavonoides totais foram medidos em cerca de 27,74 miligramas de equivalente de quercetina por grama (mg EQ g<sup>-1</sup>), com uma margem de erro de  $\pm 0,8046$ . Os flavonoides são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e são relacionados a diversos potenciais benefícios à saúde, incluindo a redução do risco de doenças crônicas.

Esses resultados sugerem que o substrato da farinha semente de *Euterpe oleracea* Mart, possui uma concentração significativa desses compostos benéficos. A presença desses fenólicos e flavonoides na amostra pode indicar potenciais efeitos positivos para a saúde humana, principalmente devido às propriedades antioxidantes, que podem contribuir para a proteção celular e redução do risco de certas condições patológicas. A margem de erro associada às medições ressalta a precisão desses resultados, garantindo uma compreensão mais completa da quantificação desses compostos na amostra analisada.

### 5.3 Atividades biológicas do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart

#### 5.3.1 Atividade antioxidante pela técnica DPPH e ABTS

Os resultados da atividade antioxidante do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, determinado pelo teste DPPH e ABTS comparando com o antioxidante sintético (trolox) estudadas são demonstrados na tabela 2:

**Tabela 2.** Atividade antioxidante do substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart pelo método do DPPH e ABTS equivalente ao Trolox

Amostras Analisadas	Atividade antioxidante ( $\mu\text{M ET /g}$ )*	
	DPPH	ABTS
Substrato da farinha da semente de açaí	1112 $\pm$ 4,211	3358 $\pm$ 12,72

\*ET = equivalente do Trolox. Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de Student para amostras pareadas.

Fonte: autores, (2023).

A análise da atividade antioxidante no substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, revelou dados expressivos, indicando sua notável capacidade antioxidante.

No método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), a atividade antioxidante foi determinada em aproximadamente 1112  $\mu\text{M}$  ET/g, denotando a quantidade de Trolox necessária para atingir o mesmo efeito antioxidante observado na amostra da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart. Este resultado sinaliza uma considerável capacidade da amostra em neutralizar radicais livres, correlacionada à presença de compostos antioxidantes.

Por outro lado, no método ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)), a atividade antioxidante foi ainda mais proeminente, alcançando cerca de 3358  $\mu\text{M}$  ET/g. Essa quantificação denota uma capacidade antioxidante ainda mais substancial, indicando uma presença expressiva de compostos capazes de neutralizar os radicais livres na amostra analisada.

Essa relação direta entre a quantidade de equivalentes de Trolox e a atividade antioxidante evidencia que valores mais elevados indicam uma maior capacidade antioxidante na amostra analisada, corroborando a sua eficácia na neutralização de radicais livres e, por conseguinte, na proteção contra danos oxidativos celulares.

Na Tabela 3, apresentam-se os resultados da atividade antioxidante expressa como a concentração efetiva de 50% (EC50) do substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart, utilizando os métodos do DPPH e ABTS, com comparação ao Trolox como antioxidante de referência.

**Tabela 3.** Atividade antioxidante da concentração efetiva de 50% (EC50) substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart pelo método do DPPH e ABTS.

Amostras Analisadas	EC50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	DPPH	ABTS
<b>Substrato da farinha da semente de açaí</b>	505 <sup>a</sup> $\pm$ 6,697	417,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1,407
<b>Trolox</b>	10,50 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1922	4,683 <sup>b</sup> $\pm$ 0,1657

Valores das médias das triplicatas  $\pm$  desvio padrão/ Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste t de Student para amostras pareadas.

Fonte: autores, (2023).

Os resultados da análise da atividade antioxidante das amostras de substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart, expressos como EC50 (concentração efetiva em 50%), foram obtidos através dos métodos DPPH e ABTS. A EC50 é a concentração necessária de um agente antioxidante para reduzir em 50% a atividade do radical livre ou do composto reativo em ensaios de atividade antioxidante.

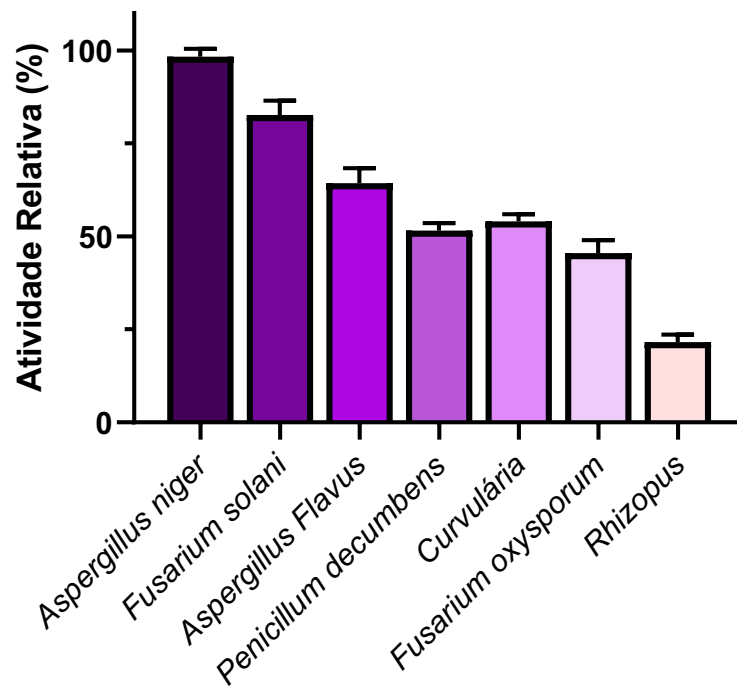
A EC50 encontrada no substrato da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart, foi de aproximadamente 505 microgramas por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ), com uma margem de erro de  $\pm 6,697$ . Isso significa que essa concentração foi necessária para reduzir a atividade do radical DPPH em 50%. Comparativamente, a EC50 do Trolox, um padrão antioxidante, foi de  $10,50 \mu\text{g/mL}$ . Portanto, quanto menor o valor de EC50, maior é a atividade antioxidante, indicando que o Trolox é mais eficaz na neutralização do radical DPPH do que o substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart.

A EC50 do substrato da farinha semente de *Euterpe oleracea* Mart, para o método ABTS foi de cerca de  $417,7 \mu\text{g/mL}$ , com uma margem de erro de  $\pm 1,407$ . O Trolox, neste caso, mostrou uma EC50 de  $4,683 \mu\text{g/mL}$ . Novamente, menores valores de EC50 indicam uma maior capacidade antioxidante. Nesse contexto, o Trolox demonstrou ser mais eficiente do que o substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart na neutralização do radical ABTS.

#### **5.4 Rastreamento e otimização de produção de L-asparaginase por Fungos utilizando como substrato a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart**

Verificou-se o potencial de produção de L-asparaginase, dos fungos da micoteca da Universidade Federal do Maranhão, com o objetivo de se tornar uma fonte nacional e internacional de produção dessa enzima. Os fungos selecionados para o rastreamento da produção de L-asparaginase apresentaram maior atividade enzimática na FSS, em comparação com a FSBm, e o fungo que se destacou foi o *Aspergillus niger*, onde apresentou maior atividade e concentração dessa proteína em comparação com os fungos *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium decumbens*, *Curvularia* sp, *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus* sp. (Figura 11).

**Figura 11.** Atividade de L-asparaginase de produzida por diferentes fungos

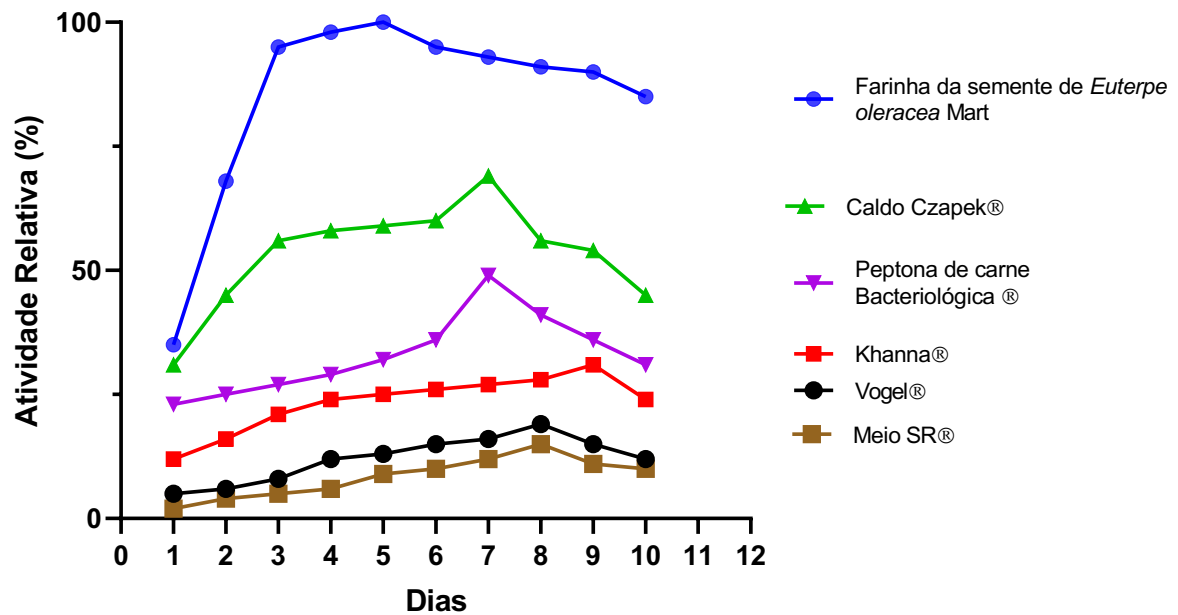


Os resultados são apresentados como atividade relativa  $\pm$  desvio padrão foram realizados em cada amostra, a atividade enzimática realizada utilizando asparagina como substrato a 37 °C por 15 min. Testes em triplicata.

#### 5.4.1 Influência do tipo de fermentação de L-asparaginase de *Aspergillus niger*

Para obter alta atividade enzimática e concentração de L-asparaginase, foi analisada a produção de L-asparaginase em dois tipos de fermentação, onde a fermentação FSS apresentou maior atividade enzimática, em comparação com a FSBm. Todavia, durante o processo de FSBm, foi notado que a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart exibiu atividade enzimática de L-asparaginase superior à dos caldos nutrientes disponíveis comercialmente (Figura 12).

**Figura 12.** Resultados do FSBm com os caldos nutrientes comerciais em comparação com a farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart.



Os resultados são apresentados como atividade relativa  $\pm$  desvio padrão foram realizados em cada amostra, a atividade enzimática realizada utilizando asparagina como substrato a 37 °C por 15 min. Testes em triplicata.

Essa descoberta ressalta a notável capacidade da farinha da semente de *Euterpe oleracea* Mart., como uma alternativa promissora para a produção de L-asparaginase ou para outras enzimas, tanto no contexto do processo de FSS quanto de FSBm. Essa superioridade na atividade enzimática sugere um potencial significativo da farinha de *Euterpe oleracea* Mart para aplicações biomédicas e industriais, destacando-a como uma opção viável e eficaz nesse campo.

A FSS, apresentou em todas as etapas de purificação total, maior atividade de L-asparaginase, quando comparadas com a fermentação FSBm, nas etapas de Fração (0 – 40%) e (40 – 80%), demonstrando atividade específica (187,19 U/mg) respectivamente com rendimento (52,25%) e purificação de 17,08 na fração (40 – 80%) em comparação com as frações da FSBm (Tabela 4).

Com esses resultados, a FSS do *A. niger* foi escolhida para as etapas seguintes do estudo.

**Tabela 4.** Resultados da purificação parcial da L-asparaginase de *A. niger* da fermentação submersa (FSBm) e semi-sólida (FSS)

<b>Tipo de fermentação</b>	<b>Etapa de purificação</b>	<b>Atividade total (U/mL)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade Específica (U/mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Purificação</b>
<b>Submersa</b>	<b>Extrato bruto</b>	3711,50	480,00	7,73	100	1
	<b>Fração 40%</b>	363,96	18,95	19,21	9,81	2,48
	<b>Fração 80%</b>	767,20	44,93	17,07	20,67	2,21
<b>Semi-sólida</b>	<b>Extrato bruto</b>	5261	480	10,96	100,00	1,00
	<b>Fração 40%</b>	888,58	84,63	10,50	16,89	0,96
	<b>Fração 80%</b>	2748,9	14,685	187,19	52,25	17,08

Proteína total e as atividades enzimáticas foram estabelecidas, respectivamente de acordo com Warburg & Christian (1941) e DRAINAS *et al.* (1977) utilizando L - asparagina como substrato. Extrato bruto, fração 1 (F1 (0-40%)), fração 2 (F2 (0-80%)) da fermentação submersa (FSBm) e fermentação semi-sólida (FSS).

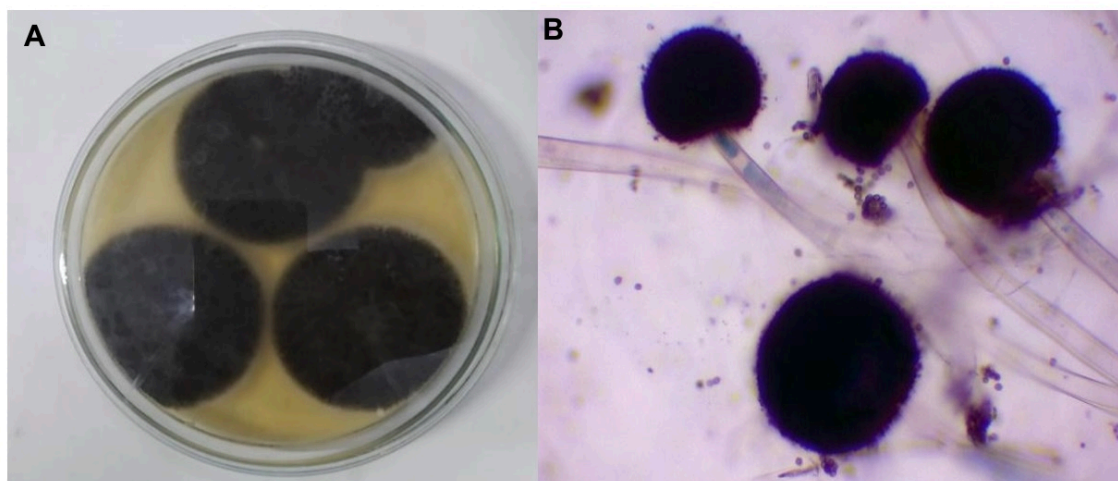


## 5.5 Identificação do *Aspergillus niger*

### 5.5.1 Identificação microscópica do *Aspergillus niger*

O *Aspergillus niger* da coleção de fungos da Universidade Federal do Maranhão, isolados do ar do ambiente marinho da cidade universitária da UFMA, apresentaram características básicas morfológicas semelhantes às outras demais espécies de *Aspergillus* em meio de cultura ágar batata. Com cobertura de conídios pretos com textura cremosa com reverso incolor (Figura 13 – A), (Figura 13 – B), hifas hialinas e com septos muito próximos, microconídios com crescimento rápido entre 4 e 7 dias.

**Figura 13.** Morfologia das colônias e estruturas de reprodução assexual de *A. niger*



A: Morfologia macroscópica da colônia; B: Morfologia microscópica presente no microcultivo

### 5.5.2 Identificação molecular de *A. niger*

Após extração de DNA as amostras foram quantificadas e obteve-se a quantidade 138 ng/ $\mu$ l para *A. niger*. Com a amplificação houve a identificação molecular da espécie. A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNAr para os isolados de *Aspergillus* spp, utilizando os primers universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990) originou um fragmento de aproximadamente 295 pb. Identificando como *Aspergillus niger*.

## 5.6 Influência de meio de precipitação de L-asparaginase

Já que a FSS apresentou maior atividade específica de L-asparaginase e maior concentração de proteína por mL de extrato produzido pelo *A. niger*, foi realizado a purificação e a otimização do método de precipitação através dos tipos de precipitantes, para verificar qual dos tipos de precipitante aumenta a taxa de concentração da L-asparaginase. Os resultados obtidos mostraram que o etanol quando utilizado como precipitante de proteína para obtenção L-asparaginase produzida pelo *A. niger*, obtém maior concentração de L-asparaginase na fração de 40 - 80%, maior atividade específica de 34,35 U/mg em comparação isopropanol utilizado como precipitante 12,33 U/mg e sulfato de amônio 6,39 U/mg (Tabela 5). Mostrando que o etanol é o precipitante ideal para aplicação da purificação da L-asparaginase de *A. niger*.

**Tabela 5.** Influência de tipo de meios de precipitação na fermentação semi-sólida de *A. niger*

<b>Tipo de precipitação</b>	<b>Etapa de purificação</b>	<b>Atividade total (U/mL)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Atividade Específica (U/mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Purificação</b>
<b>Etanol</b>	<b>Extrato bruto</b>	5520,50	3367,5	1,64	100,00	1,00
	<b>Fração 1 (0 - 40%)</b>	1205,68	84,63	14,25	21,84	8,69
	<b>Fração 2 (40 - 80%)</b>	2671,90	114,18	23,40	48,40	14,27
	<b>DEAE coluna celulose</b>	1092,30	31,8	34,35	19,79	20,95
<b>Sulfato de amônio</b>	<b>Fração 1 (0 - 40%)</b>	182,16	57,09	3,19	3,30	1,95
	<b>Fração 2 (40 - 80%)</b>	826,20	152,01	5,44	14,97	3,32
	<b>DEAE coluna celulose</b>	265,00	21,5	12,33	4,80	7,52
<b>Isopropanol</b>	<b>Fração 1 (0 - 40%)</b>	113,40	64,35	1,76	2,05	1,07
	<b>Fração 2 (40 - 80%)</b>	306,60	143,955	2,13	5,55	1,30
	<b>DEAE coluna celulose</b>	104,10	16,3	6,39	1,89	3,90

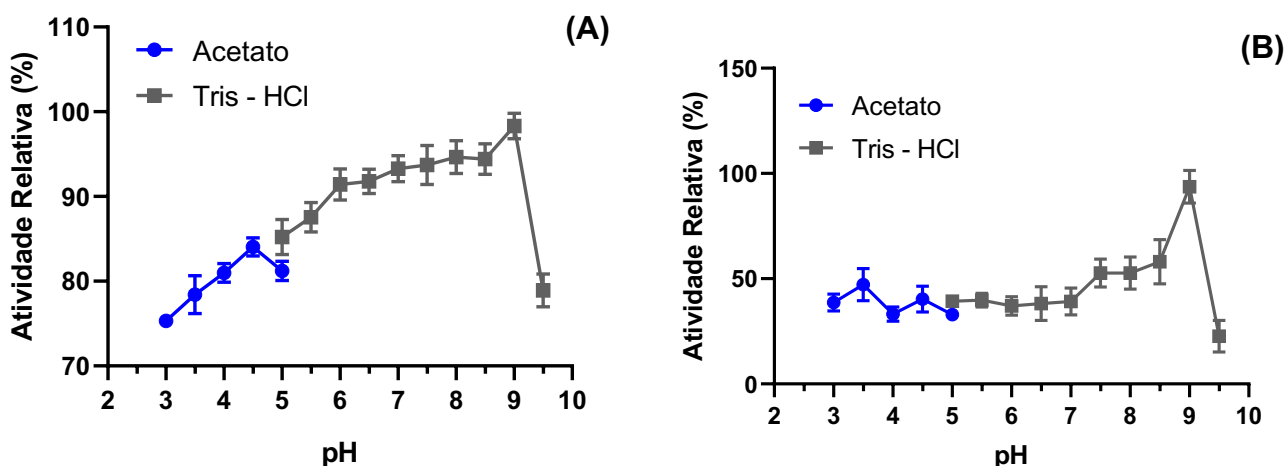
Proteína total e as atividades enzimáticas foram estabelecidas, respectivamente de acordo com Warburg & Christian (1941) e DRAINAS et al. (1977) utilizando L - asparagina como substrato. Extrato bruto, fração 1 (0-40%), fração 2 (0-80%) 2 e DEAE coluna celulose da fermentação semi-sólida (FSS).

## 5.7 Caracterização bioquímica de L-asparaginase de *A. niger*

### 5.7.1 pH ótimo e estabilidade

Uma vez que o pH da solução afeta a geração de radicais hidroxila e influencia a carga de superfície e as propriedades potenciais de interface do catalisador, é um dos fatores importantes. Cada enzima tem um pH ótimo no qual sua atividade é máxima. (POURKHANALI *et al.* 2022). Assim, foi verificada a atividade enzimática de L-asparaginase produzida pelo *A. niger* sobre o pH 3,0 a 9,0 para determinar o pH ótimo dessa enzima, os resultados encontrados mostram que o pH ótimo da L - asparaginase é o pH 9,0 (Figura 14 A). A L - asparaginase produzida por *A. niger* mostrou atividade acima de 80% na faixa de pH 5,5 a 8,5 em comparação com pH ótimo. A estabilidade de pH (Figura 14 B), da L-asparaginase produzida por *A. niger* apresentou atividade máxima no pH 9,0 semelhantes ao seu pH ótimo.

**Figura 14.** pH ótimo (A) e estabilidade (B) da L-asparaginase de *A. niger*



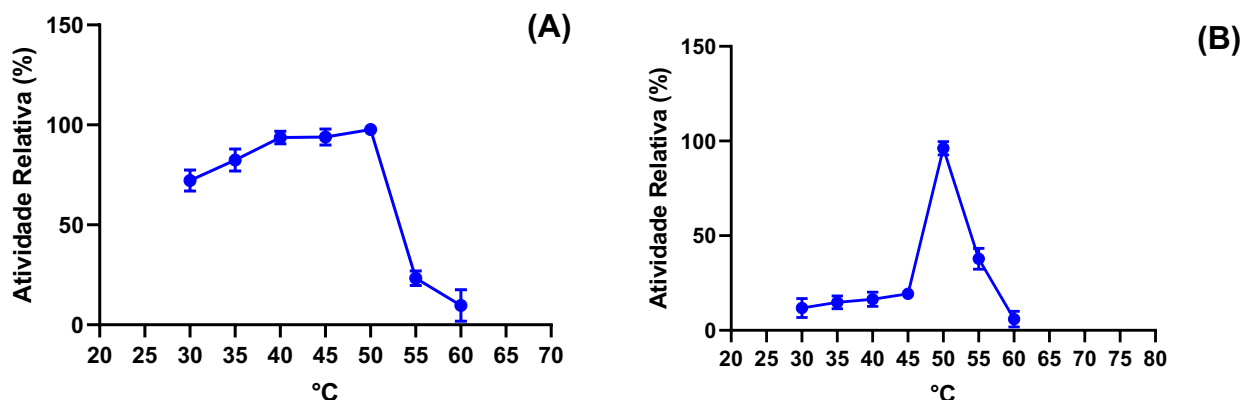
Os resultados são apresentados como atividade relativa  $\pm$  desvio padrão foram realizados em cada amostra, a atividade enzimática realizada utilizando asparagina como substrato a 37 °C por 15 minutos para a determinação do pH ótimo e 1h para determinação da estabilidade. Testes realizados em triplicata.

### 5.7.2 Temperatura ótima e estabilidade

A Temperatura ótima da L-asparaginase produzida pelo *A. niger*, mostrou atividade máxima na temperatura de 50°C e resistência a outras temperaturas de 30 a 45°C (Figura 15 A), já na estabilidade da temperatura, a L-asparaginase de *A. niger* mostrou atividade máxima de 50°C, semelhante a

temperatura ótima, em seguida, houve um declínio e perda completa da atividade enzimática (Figura 15 B).

**Figura 15.** Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) da L-asparaginase de *A. niger*



Os resultados são apresentados como atividade relativa  $\pm$  desvio padrão. Foram realizados em cada amostra, a atividade enzimática, utilizando asparagina como substrato a 37 °C por 15 min para a determinação da temperatura ótima e 1h para determinação da estabilidade. Testes em triplicata.

### 5.7.3 Efeito de agentes surfactantes e íons metálicos presentes nos sais

A atividade relativa de L-asparaginase produzida por *A. niger* sobre diferentes surfactantes mostrou aumento significativo de atividade enzimática sobre o Tween 20, onde apresentou aumento de 16,41% na concentração 0,10% e 8,15% de aumento de atividade enzimática na concentração de 0,50% (tabela 6).

**Tabela 6.** Efeito de agentes surfactantes sobre a atividade da L-asparaginase F2 de *A. niger*

Tipo	Concentrações	U/mL	Atv relativa (%) $\pm$ SD
	<b>Controle</b>	47,48	100 $\pm$ 0,014
<b>Tween 20</b>	0,01%	44,98	94,73 $\pm$ 0,035
	0,10%	55,27	116,41 $\pm$ 0,084
	0,50%	51,35	108,15 $\pm$ 0,028
<b>Triton - X - 100</b>	0,01%	45,91	96,69 $\pm$ 0,013

	0,10%	36,56	77,00 ± 0,018
	0,50%	33,92	71,44 ± 0,020
<b>Tween 80</b>	0,01%	41,61	87,64 ± 0,011
	0,10%	42,45	89,41 ± 0,006
	0,50%	38,01	80,05 ± 0,027
<b>SDS</b>	0,01%	35,02	73,76 ± 0,012
	0,10%	24,13	50,82 ± 0,009
	0,50%	24,43	51,45 ± 0,025
<b>E.D.T. A</b>	0,01%	31,1	65,50 ± 0,005
	0,10%	22,12	46,59 ± 0,004
	0,50%	19,13	40,29 ± 0,003

Os valores percentuais correspondem à quantidade de surfactante em tampão fosfato de 50 mMol pH 7,0. Testes em triplicata. As amostras de L - asparaginase foram misturadas com surfactantes (0,01%, 0,10% e 0,50% p/v) e incubadas por 1 hora a 37 °C antes de determinar a atividade residual. Os resultados são apresentados como atividade enzimática ± desvio padrão.

Os resultados encontrados mostram aumento significativo na atividade da enzima na presença dos íons  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  e  $\text{Na}^+$  (Tabela 7), com destaque para o  $\text{Co}^{2+}$ , que apresentou um aumento de 53,94% em comparação com o controle.

**Tabela 7.** Influência dos íons sobre a atividade de L-asparaginase de *A. niger*

<b>Tipo</b>	<b>U/mL</b>	<b>Atv relativa (%) ± SD</b>
<b>Controle</b>	31,31	100 ± 0,04
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	46,4	148,20 ± 0,02
<b>Co<sup>2+</sup></b>	16,89	153,94 ± 0,01
<b>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	15,05	48,07 ± 0,03
<b>Zn<sup>+2</sup></b>	16,21	51,77 ± 0,01
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	46,13	47,33 ± 0,01
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	27,63	88,25 ± 0,01

<b>Na<sup>+</sup></b>	28,47	90,93 ± 0,02
-----------------------	-------	--------------

As L - asparaginases foram incubadas com íons (1mM) em tris – HCl 50mMol pH 7,0 e incubadas por 1 hora a 37°C antes de determinar a atividade residual. Testes em triplicata. Os resultados são apresentados como atividade residual ± desvio padrão.

Alguns íons metálicos podem atuar como inibidores, alterando a orientação do grupo funcional associado ao sítio ativo da molécula da enzima (CASTRO, 2019), no caso do íon Ca<sup>2+</sup>, a atividade funcional da enzima diminuiu mais de 50% em contato com o íon, indicando que este pode ser classificado como um inibidor da L-asparaginase.

#### 5.7.4 Estabilidade em solventes orgânicos

Segundo Grodowska & Parczewski (2010) o solvente tem forte influência na estabilização da estrutura proteica. Além disso, os solventes solubilizam substratos hidrofóbicos, facilitando a hidrólise enzimática (DACHURI *et al.* 2016). Por este motivo, foi verificada a influência dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática de L-asparaginase produzida por *A. niger* (tabela 8).

**Tabela 8.** Efeito de solventes orgânicos sobre a L-Asparaginase de *A. niger*

<b>Tipo</b>	<b>Concentrações</b>	<b>U/mL</b>	<b>Atv relativa (%) ± SD</b>
	<b>Controle</b>	32,48	100 ± 0,014
<b>Acetona</b>	25	16,79	51,69 ± 0,05
	50	14,53	44,74 ± 0,02
	80	5,76	17,73 ± 0,03
	100	2,49	7,67 ± 0,04
<b>Etanol</b>	25	24,15	74,35 ± 0,04
	50	15,02	46,24 ± 0,01
	80	9,54	29,37 ± 0,02
	100	6,28	19,33 ± 0,02
<b>Isopropanol</b>	25	13,45	41,41 ± 0,03
	50	10,26	31,59 ± 0,01

	80	6,75	20,78 ± 0,03
	100	4,14	12,75 ± 0,01
	25	8,55	26,32 ± 0,09
<b>Metanol</b>	50	7,82	24,08 ± 0,03
	80	5,19	15,98 ± 0,02
	100	2,34	7,20 ± 0,07

Os valores percentuais que acompanham os solventes orgânicos polares correspondem à quantidade de solvente em tampão fosfato de 50 mMol/L pH 7,0. Testes triplicadas. As amostras de L-asparaginase foram misturadas com solventes orgânicos (25%, 50%, 80 e 100% v/v) e incubadas por 1 hora a 37 °C antes de determinar a atividade residual. Os resultados são apresentados como atividade enzimática ± desvio padrão.

Os resultados encontrados mostraram aumento na atividade da L-asparaginase, principalmente no solvente metanol e etanol, onde as concentrações de 80 e 100% apresentaram altas atividades enzimáticas em comparação com o controle. Já os resultados das concentrações utilizando acetona, a enzima teve perda de atividade mostrando que este solvente pode ser classificado como um inibidor da L-asparaginase produzida por *A. niger*.

### 5.7.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Quanto menor o  $K_m$  maior a afinidade da enzima pelo seu substrato e  $V_{max}$  é a velocidade máxima da reação da enzima, formando produtos, quanto maior for o seu valor maior é a afinidade da enzima pelo seu substrato. Valores baixos de  $K_m$  e altos  $V_{max}$  de enzimas encontram utilidade nas indústrias farmacêuticas (MOTTA, 2011). Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  encontrados utilizando a L-asparaginase de *A. niger*, apresentou  $K_m$  de 2,61 valor significativamente baixo em comparação com L-asparaginases e  $V_{max}$  de 5,50, resultado significativamente superior em comparação as L – asparaginases produzidas por outros microrganismos (Tabela 9), mostrando o potencial uso da L- asparaginase de *A. niger* para aplicação farmacêutica.



**Tabela 9.** Parâmetros cinéticos de L-asparaginase de *A. niger* em comparação com L-asparaginase de outros microrganismos

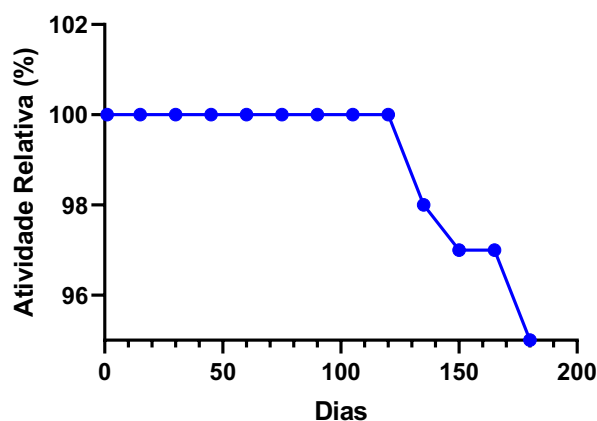
Microrganismo	Parâmetros		pH ótimo	Temperatura Ótima (°C)	Referências
	$K_m$ (Mm)	$V_{max}$ (Mmol)			
<i>A.niger</i>	2,61	5,50	9,0	50	Este trabalho
<i>E. coli</i>	3,79	0,12	-	-	Alam <i>et al.</i> (2021)
<i>Leucosporidium scottii</i>	74	0,376	7,5	55	Moguel <i>et al.</i> (2023)
<i>Streptomyces fradie</i>	10,07	95,08	-	-	Dias <i>et al.</i> (2016)

Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram determinados pela constante de Michaelis-Menten em diferentes concentrações de asparagina (0,1 – 6 mMol/L<sup>-1</sup>) e incubadas por 15 min a 37°C.

### 5.7.6 Tempo de armazenamento

Com o objetivo de verificar o tempo máximo de atividade da L-asparaginase produzida por *A. niger* para fins de caracterização de uso farmacêutico, foi verificada a atividade da enzima a cada 15 dias, para determinar seu tempo de armazenamento em freezer a -34°C. A enzima mostrou resistência com durabilidade de atividade máxima por 120 dias (Figura 16) e perda da sua atividade a partir de 140 dias, tendo a perda de 6% da sua atividade em comparação da atividade do dia 0.

**Figura 16.** Tempo de armazenamento da L-asparaginase de *A.niger*

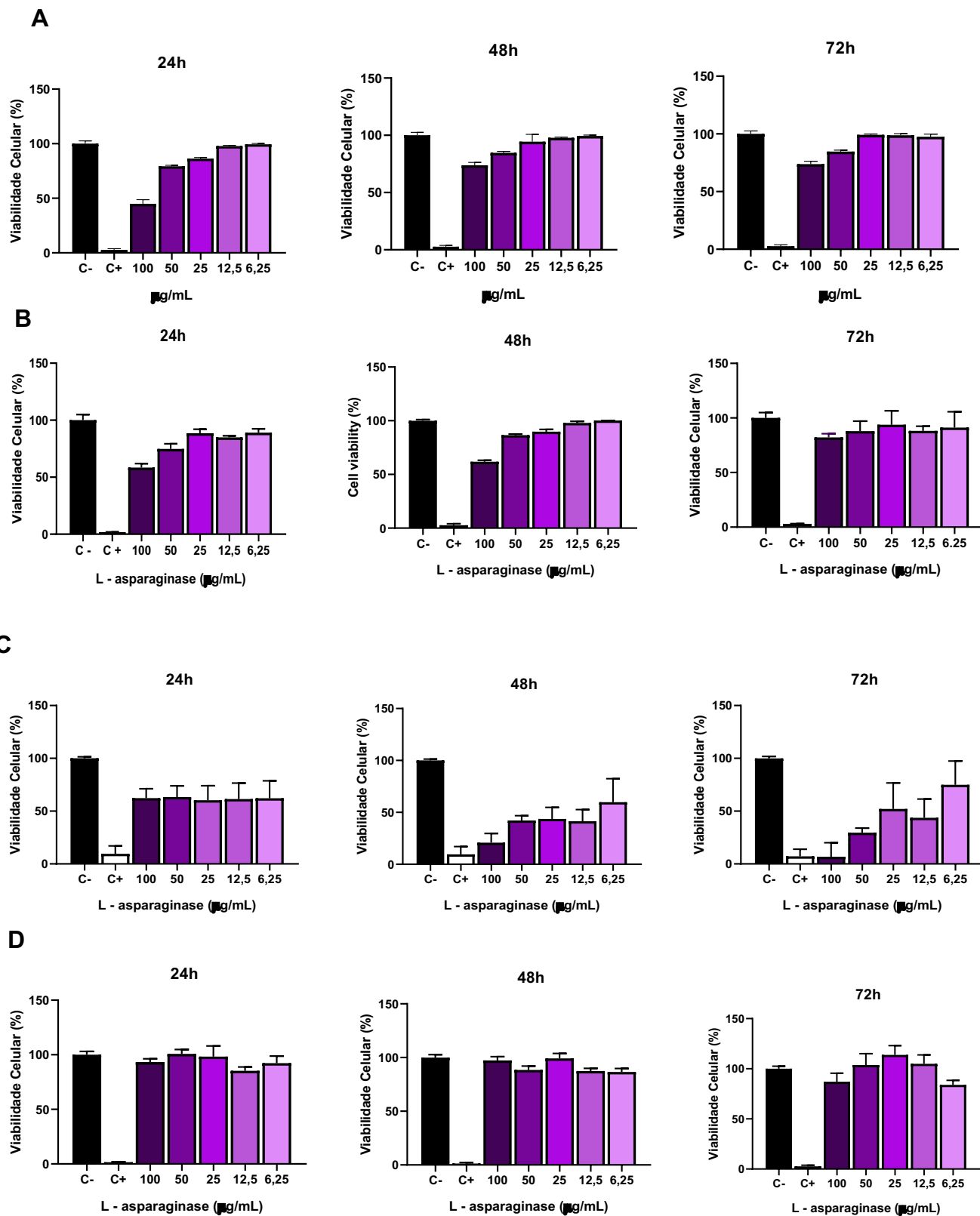


A L-asparaginase foi incubada com o substrato asparagina por 15min a 37°C, antes de determinar a atividade residual. Testes em triplicata. Os resultados são apresentados como atividade residual  $\pm$  desvio padrão.

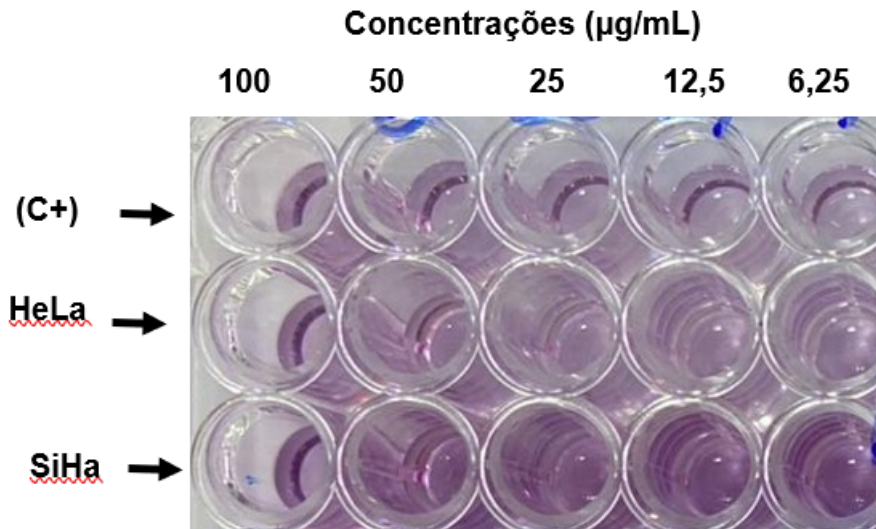
### **5.8 Atividade citotóxica da L-asparaginase de *A. niger* em células RAW, GM, HeLa e SiHa**

As células RAW, GM, HeLa e SiHa, foram avaliadas em diferentes concentrações (figura 17): 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 ug/mL, com a L-asparaginase liofilizada, em 24, 48 e 72h, logo a L-asparaginase nas células RAW e GM apresentaram uma leve atividade citotóxica em 24 e 48h apenas nas concentrações máximas de 100 e 50 ug/mL, entretanto em 72 horas as células RAW e GM testadas se recuperaram, e voltaram a se proliferar. Nas células HeLa, nas primeiras 24h a L-asparaginase não apresentou atividade citotóxica significativa, entretanto a partir de 48h, observou-se citotoxicidade da L-asparaginase nas concentrações até 12,5 ug/mL, e em 72h a citotoxicidade se manteve nas concentrações de 100 e 50 ug/mL. Já nas células SiHa, não houve atividade citotóxica significativa.

**Figura 17.** Viabilidade celular após tratamento com a L-asparaginase de *A. niger*. (A) RAW, (B) GM, (C) HeLa, (D) SiHa e (E) Imagem representativa do ensaio de MTT



E



Teste de MTT analisando a viabilidade das células RAW (A), GM (B), SiHa (C) e HeLa (D) após o tratamento com o L-asparaginase de *A. niger* (E) Imagem representativa do ensaio de MTT. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) feito por One-way analysis of variance (ANOVA). Testes em triplicata. C- (Controle negativo) sem tratamento com L-asparaginase e C+ (Controle positivo) morte celular causada por 10% de DMSO.

### 5.8.1 Comparativo de Dose-resposta e concentração inibitória média de L-asparaginase de *A. niger* em células HeLa e SiHa

Na dose-resposta e concentração inibitória média de L-asparaginase de *A. niger* (tabela 10) nas células HeLa precisou-se da concentração mínima de 23,625 ug/mL de L-asparaginase nas primeiras 24h, para atingir 50% deste grupo de células, com 48h foram utilizadas 2,158 ug/mL e com 72h utilizou-se 1,731 ug/mL de L-asparagiase, ou seja, concentrações mínimas.

Já nas células SiHa precisou-se da concentração mínima de 93,004 ug/mL de L-asparaginase nas primeiras 24h para tal feito, sendo que com 48h ainda foi necessário de 94,514 ug/mL e com 72h foram necessárias 74,498 ug/mL de L-asparaginase para se obter atividade inibitória significativa, diferente das células HeLa, que em baixa concentração (1,731 ug/mL) atingiu-se 50% das células.

**Tabela 10.** IC50 da concentração de L-asparaginase de *A. niger* nas linhagens HeLa e SiHa

Linhagem celular	IC50		
	24h	48h	72h
HeLa	23,625 µg/mL	2,158 µg/mL	1,731µg/mL
SiHa	93,004 µg/mL	94,514 µg/mL	74,498 µg/mL

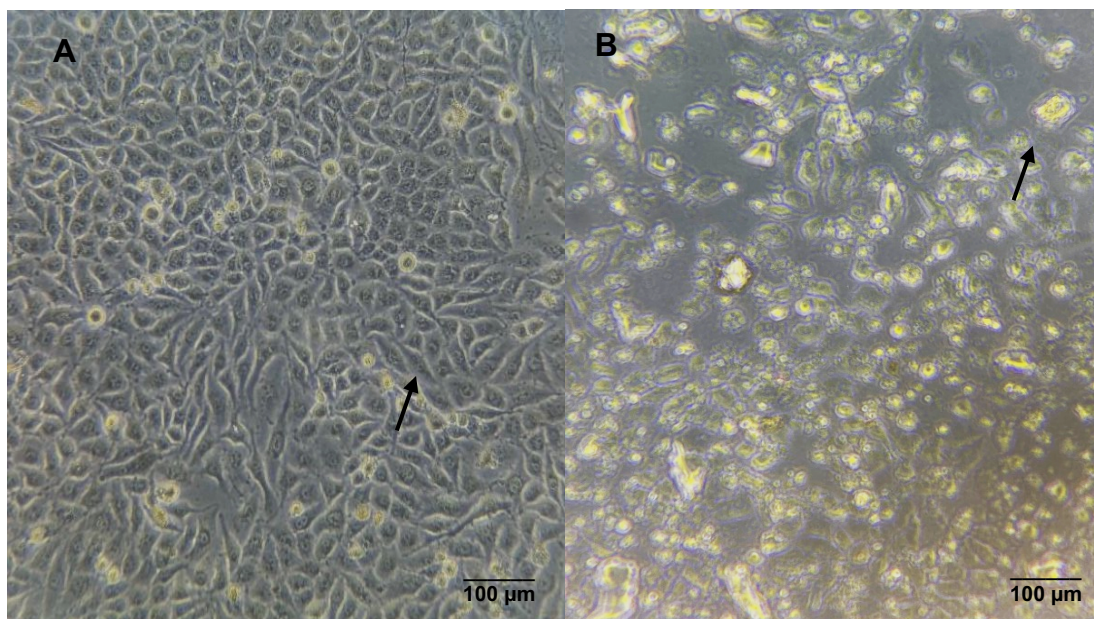
Os valores da concentração inibitória de 50% da viabilidade celular (IC50) foram obtidos a partir de uma regressão não linear usando o programa GraphPad Prism 8.0.1 (Tabela 7) onde mostra a média mais a concentração linear.

### 5.9 Viabilidade morfológica da linhagem de células HeLa sob tratamento com L-asparaginase

A morfologia da linhagem celular HeLa tratadas com a enzima L-asparaginase na concentração de 100 µg/mL após 72h de tratamento foi analisada utilizando um microscópio invertido e analisado utilizando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD) à área de superfície e perímetro. A células HeLa controle (Figura 18 – A), apresentam sua morfologia típica com estrutura alongadas, com crescimento formando uma monocamada e aderência umas às outras.

Já as células tratadas com a enzima (Figura 18 – B), apresentaram alterações morfológicas em comparação com as células controle, exibindo formações circulares e redução de tamanho, aumento da área sem a presença de células, aparência áspera na sua superfície, que pode indicar a perda do seu material citoplasmático, indicando que a enzima afeta sua estrutura morfológica pelo tempo de exposição e as características da enzima com as células.

**Figura 18.** Linhagem celular de HeLa controle (A) e após o tratamento de com L-asparaginase de *A. niger* em 72h (B)



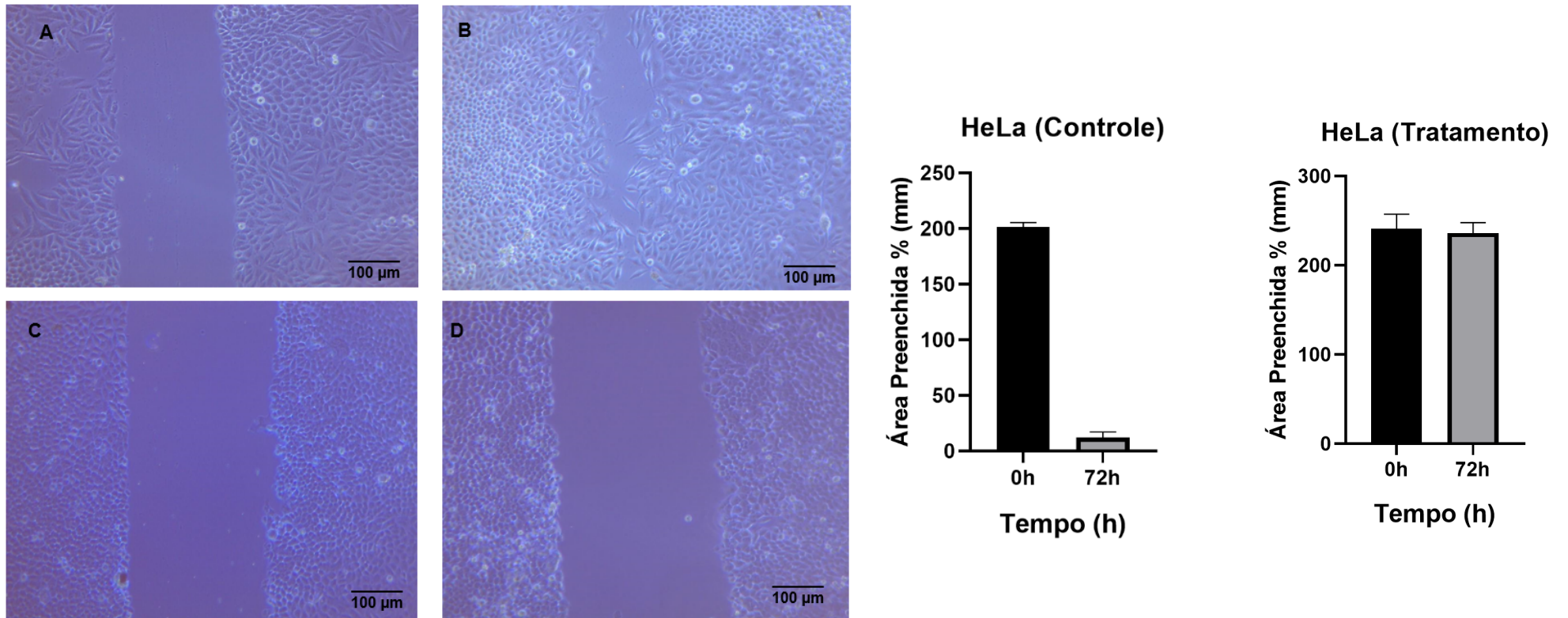
Linhagem celular de HeLa tratada com 100µg/mL em meio DMEM low glucose com 10% de Soro fetal bovino e 1% de antibiótico.

### 5.10 Ensaio de Migração celular em células HeLa e SiHa

Para o teste de migração celular, foi realizada a medição da distância média da largura da fenda entre suas bordas das linhagens celulares com os tratamentos com a L-asparaginase na concentração de IC50 (1,731µg/mL) na linhagem HeLa e IC50 (74,498 µg/mL) na linhagem SiHa dos tempos Zero e 72h.

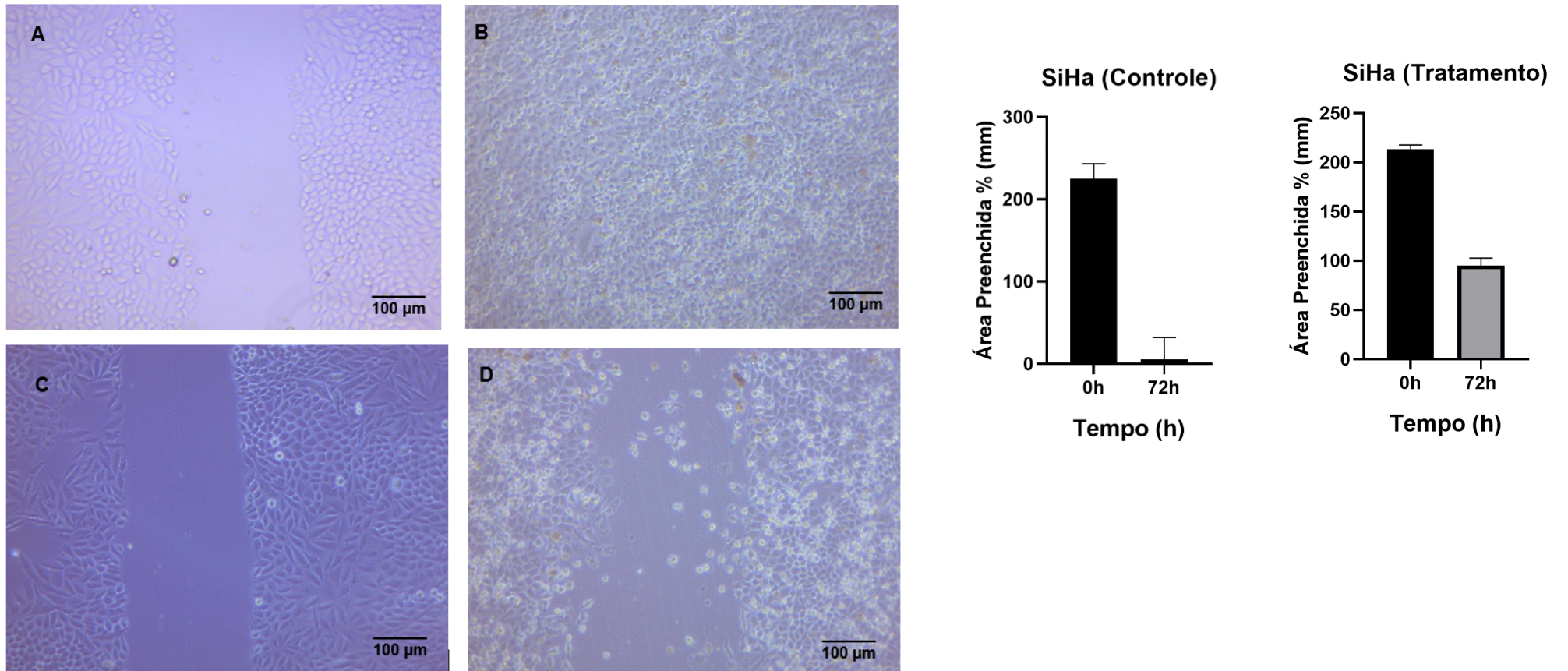
Após 72h do início do ensaio de migração, os controles das células HeLa e SiHa que não continham a L-asparaginase, tiveram mais de 90% do fechamento da fenda. Com a concentração de IC50 da L-asparaginase, a célula HeLa não houve o fechamento da fenda (Figura 19 – D) mostrando o potencial uso da enzima na redução da proliferação da célula. Já na linhagem SiHa, não foi obtido resultado semelhante, as células tiveram proliferação na fenda reduzindo o seu tamanho em 85,34% (Figura 20 – D) mostrando que a enzima tem atividade antiproliferativa apenas na linhagem HeLa.

**Figura 19.** Ensaio de Migração celular teste controle tempo zero (A) 72h (B) sem tratamento e com tratamento da L-asparaginase em tempo zero (C) 72h (D) em HeLa



Imagens representativas do ensaio de migração na linhagem celular HeLa (A e B) controle sem o tratamento com a L – asparaginase e com tratamento (C e D) com IC50 na concentração de 1,731 μg/mL. (E) comparação da área preenchida no teste controle ( $p > 0,001$ ) e (F) comparação da área preenchida no ensaio com L-asparaginase ( $p > 0,001$ ).

**Figura 20.** Ensaio de Migração celular teste controle tempo zero (A) 72h (B) sem tratamento e com tratamento da L-asparaginase em tempo zero (C) 72h (D) em SiHa



Imagens representativas do ensaio de migração na linhagem celular SiHa (A e B) controle sem o tratamento com a L – asparaginase e com tratamento (C e D) com IC50 na concentração de 74,498  $\mu\text{g/mL}$ . (E) comparação da área preenchida no teste controle ( $p > 0,001$ ) e (F) comparação da área preenchida no ensaio com L-asparaginase ( $p > 0,001$ ).



## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou a capacidade do fungo *A. niger* suplementado com a farinha da semente de *E. oleracea* Mart., em produzir a enzima L-asparaginase, para análise de sua atividade antitumoral *in vitro*.

Trata-se de um trabalho relevante, considerando perspectivas do uso farmacológico de uma enzima fúngica extraída de fontes naturais, produzida por uma espécie de fungo de amplo espectro na natureza e suplementado com um substrato que frequentemente é descartado no meio ambiente.

Nas análises do substrato da farinha da semente de *E. oleracea* Mart os resultados da análise de EC50 indicam que o Trolox, um composto antioxidante sintético usado como padrão de referência, demonstrou valores significativamente inferiores em comparação com o substrato da semente de *Euterpe oleracea* Mart, nos testes DPPH e ABTS. Essa discrepância aponta para a superioridade do Trolox na capacidade de neutralização dos radicais livres, sugerindo uma eficácia antioxidante mais pronunciada do Trolox em relação ao substrato da farinha da semente de *E. oleracea* Mart.

O Trolox, por ser uma substância isolada e pura, conhecida por sua atividade antioxidante em condições controladas de laboratório, apresenta uma eficácia notável na neutralização de radicais livres devido à sua estrutura química estável e concentração conhecida.

Por outro lado, o substrato da farinha da semente de *E. oleracea* Mart é uma matriz complexa e natural, composta por uma variedade de compostos bioativos, tais como flavonoides, fenólicos e outros antioxidantes naturais. Embora os valores de EC50 para o substrato do estudo, tenham sido superiores em comparação com o Trolox, isso não implica necessariamente uma inferioridade em termos de atividade antioxidante. A complexidade desse substrato pode resultar em interações sinérgicas entre os vários compostos presentes, o que poderia conferir uma proteção antioxidante mais ampla, abrangendo uma gama mais diversificada de radicais livres.

Portanto, apesar de os valores de EC50 indicarem uma menor eficácia antioxidante do substrato da farinha da semente de *E. oleracea* Mart, em relação ao Trolox, é crucial considerar que a amostra natural pode oferecer benefícios mais abrangentes para a saúde devido à presença de vários compostos

antioxidantes em interação, além da capacidade antioxidante isolada de um único composto, como observado no Trolox.

As L-asparaginases fúngicas são consideradas seguras pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) desde 2007, sendo usadas inclusive como aditivos alimentares (XU *et al.*, 2016), e o *A. niger*, é um fungo de destaque como produtor de L-asparaginase (DA CUNHA *et al.*, 2018).

A L-asparaginase é uma enzima proteolítica considerada um biofármaco pela indústria farmacêutica, por possuir capacidade farmacológica amplamente utilizada no tratamento de doenças leucêmicas, e no caso de sua produção por fungos, acredita-se que esta, provoque menos reações adversas ao ser utilizada como medicamento, isso porque apresenta maior compatibilidade com o organismo humano (PARIZOTTO *et al.*, 2023), uma das justificativas da escolha do *Aspergillus niger* para este estudo, se dá ao fato de o mesmo ter produzido quantidade significativa de L-asparaginase ao ser suplementado com farinha da semente de *E. oleracea* Mart, fato ainda não encontrado em literatura.

Além disso, o *A. niger* já havia mostrado potencial de produção da L-asparaginase nos estudos de Vala *et al.* (2018), Da Cunha *et al.* (2018) e Babu *et al.* (2010) onde mostrou alta atividade, resistência a diferentes pH e temperaturas. Com atividade enzimática 46,4 U/mL utilizando o método da fermentação semi-sólida, o *A. niger* apresentou atividade enzimática superior a outras espécies de fungo como *Enterobacter aerogenes* que teve atividade de 19,129 U/mL (KARANAM & MEDICHERLA, 2010).

No processo fermentativo utilizando *E. oleracea* Mart, estudos tem explorado o potencial dessa espécie para influenciar a produção de enzimas com capacidade antioxidante quando consumida (Barbosa *et al.*, 2016). Recentemente, Cordeiro *et al.* (2019) empregaram sementes de *E. oleracea* Mart, por meio de hidrólise enzimática visando a produção de etanol, revelando que as sementes não apenas facilitam a produção de etanol, mas também aumentam a atividade das enzimas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, fundamentais nesse processo.

Com base nessa descoberta promissora, surgiu a iniciativa de explorar a farinha da semente de *E. oleracea* Mart., como um potencial suplemento no processo de fermentação para a produção de L-asparaginase fúngica. Este

composto é de grande interesse em diversas aplicações biotecnológicas, incluindo a área médica e de produção de alimentos. A escolha da farinha da semente como nutriente se deu pela sua riqueza em compostos bioativos e nutrientes essenciais, que podem beneficiar o desenvolvimento e a atividade de microrganismos envolvidos na fermentação (IGREJA, 2020).

Os resultados preliminares desse estudo revelaram que a farinha da semente de *E. oleracea* Mart. apresenta um potencial significativo como fonte de nutrientes para processos fermentativos. Foi observado que a farinha da semente supera os caldos nutrientes tradicionalmente utilizados, que são comercialmente disponíveis, tanto em termos de eficiência quanto de qualidade final do produto obtido.

Essa descoberta não apenas destaca o potencial econômico e tecnológico da farinha das sementes de *E. oleracea* Mart., mas também oferece uma solução sustentável para o aproveitamento de um subproduto que geralmente é descartado no meio ambiente (OLIVEIRA, 2022). Além disso, abre caminho para o desenvolvimento de novas estratégias de utilização de recursos naturais, contribuindo para a promoção da sustentabilidade na indústria de fermentação e biotecnologia. Portanto, o estudo aponta não apenas para uma inovação no processo de fermentação, mas também para uma abordagem mais consciente e sustentável no aproveitamento de recursos naturais, alinhada com os princípios da economia circular e da bioeconomia.

Neste estudo, foram testadas diferentes faixas de pH de L-asparaginase de *A. niger*, verificando a resistência da enzima, que suportou diferentes faixas de pH, todavia o pH 9 se mostrou o ideal. Resultados semelhantes foram encontrados com Vala *et al.* (2018), onde o pH ótimo da L-asparaginase purificada de *Aspergillus niger* AKV-MKBU obtida em amostras de água marinha obteve pH ótimo de pH 9,0, o pH ótimo de 8,0 e 9,0 encontrado pelo *Escherichia coli* (LIBOSHI *et al.* 1999) mas diferente dos resultados encontrados neste trabalho, a L-asparaginase não teve resistência a diferentes faixas de pH. Na estabilidade de pH, a L-asparaginase produzida por *A. niger* apresentou atividade máxima no pH 9,0 semelhantes ao seu pH ótimo.

Já, sob condições de temperatura e estabilidade, a L-asparaginase produzida por *Brevibacillus borstelensis* ML12 no trabalho de Mukherjee *et al.* (2022), apresentou estabilidade na temperatura igual a do *A. niger* estudado

neste trabalho, que foi de 50°C e resistência a outras temperaturas de 30 a 45°C, apresentando estabilidade da temperatura na atividade máxima de 50°C, semelhante a temperatura ótima, em seguida, houve um declínio e perda completa da atividade enzimática. Estes resultados só demonstram o diferencial da L-asparaginase produzida *A. niger*, que apresentou maior resistência a diferentes temperaturas em comparação as L-asparaginases produzidas por outros microrganismos, indicando que a L-asparaginase produzida por *A. niger* tem capacidade de ser uma nova fonte alternativa de obtenção dessa enzima.

Com o objetivo de conhecer a L-asparaginase produzida por *A. niger* e verificar quais compostos que podem causar alguma taxa de diminuição da atividade enzimática em diferentes tipos de surfactantes e íons metálicos que pode afetar sua capacidade na aplicação em compostos farmacêuticos e sua aplicação biotecnológica, este trabalho mostrou que a atividade relativa de L-asparaginase produzida por *A. niger* sobre diferentes surfactantes exibiu aumento significativo de atividade enzimática sobre o Tween 20 onde apresentou aumento de 16,41% na concentração 0,10% e 8,15% de aumento de atividade enzimática na concentração de 0,50%. Um estudo com a L-asparaginase produzida *Brevibacillus borstelensis* ML12 relatou um aumento significativo na atividade da enzima com o Tween 20, onde afirma que provavelmente isso se deve a uma maior exposição do sítio ativo da enzima devido à diminuição da tensão superficial (MUKHERJEE, 2022). Outro estudo relatou aumento da atividade da L-asparaginase de *Fusarium culmorum* por Meghavarnam & Janakiraman (2015).

Já o SDS apresentou diminuição da atividade da enzima. O SDS exibe um efeito retardador na atividade enzimática progressivamente à medida que a concentração é aumentada para 20 mM, conforme sustentado por Krishnapura & Belur (2016). O etanol e o metanol são comumente utilizados na precipitação da L-asparaginase (TUNDISI *et al.*, 2017). No estudo de Mohan Kumar & Manonmani (2013) mostra-se que o metanol foi o melhor solvente para a precipitação da L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp.

Nas análises da influência dos íons sobre a atividade da L- asparaginase de *A. niger*, para realizar o processo de catálise, é necessária uma ligação com íons metálicos que são classificados como cofatores. Esses cofatores podem se ligar covalentemente aos aminoácidos da enzima e participarem definitivamente

da reação de atividade enzimática ou, em outros casos, se juntam à enzima no momento da catálise, sem que seja estabelecida uma ligação covalente (ANDRADE, 2022).

Em alguns casos, os íons podem se ligar à enzima e alterar sua estrutura causando sua inibição, e o seu efeito sobre a enzima é bastante variável dependendo de qual tipo, origem e mecanismo de atuação no processo bioquímico (VASCONCELOS *et al.* 2022) Assim, foi realizada a análise da atividade de L-asparaginase produzida de *A. niger* em diferentes íons metálicos, no caso do íon  $\text{Ca}^{2+}$ , a atividade da enzima diminuiu mais de 50% em contato com o íon, indicando que este pode ser classificado como um inibidor da L-asparaginase. Já o  $\text{Zn}^{2+}$  não pode produzir nenhum aumento acentuado na atividade da L-Asparaginase, conforme relatado por Phetsri *et al.* (2019), mas outros íons mostraram diminuição de atividade da L-asparaginase produzida por *A. niger*, entretanto não perceptível. Os íons metálicos podem servir como cofatores importantes para a estrutura molecular da enzima, podendo afetar sua atividade.

Os solventes orgânicos têm grande influência na estabilização da estrutura proteica (GRODOWSKA & PARCZEWSKI 2010), além disso, são capazes de solubilizar substratos hidrofóbicos, facilitando a hidrólise enzimática (DACHURI *et al.*, 2016). Uma das principais barreiras à larga produção de biofármacos pela indústria farmacêutica se relaciona com as modificações estruturais que podem ocorrer nas proteínas utilizadas como agentes terapêuticos (CHIN, 2013). Neste caso, além da viabilidade e qualidade do produto, deve-se levar em conta os solventes utilizados durante o processamento do biofármaco, uma vez que exibem alta influência na estabilização do produto ao longo do processo produtivo, uma vez que exibem alta influência no custo e qualidade do produto final (DUNN, 2012).

Por este motivo, foi verificada a influência dos solventes orgânicos sobre a atividade enzimática de L-asparaginase produzida por *A. niger*, e percebeu-se aumento na atividade da enzima, principalmente no solvente metanol e etanol, onde as concentrações de 80 e 100% apresentaram altas atividades enzimáticas em comparação com o controle. Segundo Tundisi *et al.* (2017) o etanol e metanol são comumente utilizados na precipitação da L-asparaginase, por não causarem inibição na atividade enzimática. Mohan Kumar & Manonmani (2013)

constatarem que o metanol foi o melhor solvente para a precipitação da L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp., já os resultados das concentrações utilizando acetona, a enzima teve perda de atividade mostrando que este solvente pode ser classificado como um inibidor da L-asparaginase produzida por *A. niger*, semelhante ao estudo de Amatto & Guimarães (2019) com a L-asparaginase de *Aspergillus niveus*, onde apresentou diminuição de 22% de atividade enzimática.

Há também relevância em se testar a cinética enzimática, que tem como objetivo estudar a velocidade das reações catalisadas pelas enzimas e verificar como ela varia em função de condições experimentais e são de extrema importância nos estudos de reação enzimática (MAISINCHO *et al.*, 2022). Logo, neste estudo os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  encontrados utilizando a L-asparaginase de *A. niger*, apresentaram  $K_m$  de 2,61, valor significativamente baixo em comparação com L-asparaginases e  $V_{max}$  de 5,50, resultado significativamente superior em comparação as L-asparaginases produzidas por outros microrganismos como de *E. coli* (ALAM *et al.*, 2021), *Leucosporidium scottii* (MOGUEL *et al.*, 2020) e *Streptomyces fradie* (DIAS *et al.*, 2016). O efeito antitumoral da asparaginase pode estar associado à sua afinidade pela asparagina que pode ser determinada através dos estudos de cinética enzimática, ou seja, a determinação da constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ), a velocidade máxima ( $V_{max}$ ). A asparaginase catalisa a hidrólise da asparagina produzindo aspartato e amônio e como consequência, atuará de forma que indisponibilizará a asparagina do meio extracelular para a célula leucêmica, levando-a a sua morte (KUMAR *et al.*, 2013).

A estabilidade da enzima analisada, possibilita efetivamente a aplicação desse derivado, caso o armazenamento seja absolutamente necessário para a comercialização (DATTA *et al.*, 2013). Neste trabalho foi verificada a atividade da enzima a cada 15 dias para determinar seu tempo de armazenamento em freezer a 32°C, onde esta mostrou resistência com durabilidade de atividade máxima por 120 dias e perda da sua atividade a partir de 140 dias, tendo a perda de 6% da sua atividade em comparação da atividade do dia 0.

A atividade citotóxica de L-asparaginase de *A. niger* foi testada neste trabalho em células RAW, GM, Hela e SiHa. A L-asparaginase produzida por microrganismos e plantas, demonstrou potencial citotóxico *in vitro* contra vários

tipos de células, conforme apresenta o estudo de Asthana *et al.* (2003). Na pesquisa de Rani *et al.* (2012), a L-asparaginase produzida pelo *Aspergillus flavus* em uma concentração de 131,25 µg/ml, inibiu cerca de 50% do crescimento de células HeLa, e em outro estudo posterior, a atividade oncogênica dose-dependente de L-asparaginase produzida por *Aspergillus oryzae* ocorreu até a concentração de 2 µg/mL em células HeLa (SUDARKODI & SUNDAR, 2018).

A L-asparaginase produzida a partir de células microbianas, é capaz de atingir células HeLa, segundo Fátima *et al.* (2019), que apresentou em sua pesquisa que a L-asparaginase isolada de *P. aeruginosa* (P31, P32 e P34) nas concentrações 86,7, 40,3 e 57,6 µg/mL respectivamente, tiveram IC50 em células HeLa, com citotoxicidade aumentada nas concentrações enzimáticas de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL, com viabilidade máxima de 46,08% e viabilidade mínima de 28,33%.

No estudo atual, foram avaliadas com a L-asparaginase liofilizada, as células RAW, GM, HeLa e SiHa, nas concentrações: 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL, logo a L-asparaginase nas células RAW e GM apresentou uma leve atividade citotóxica em 24 e 48h apenas nas concentrações máximas de 100 e 50 µg/mL, entretanto em 72 horas as células RAW e GM se recuperaram. Nas células HeLa, nas primeiras 24h a L-asparaginase não apresentou atividade citotóxica significativa, entretanto a partir de 48h, observou-se citotoxicidade da L-asparaginase nas concentrações até 12,5 µg/mL, e em 72h a citotoxicidade se manteve nas concentrações de 100 e 50 µg/mL. Já nas células SiHa, não houve atividade citotóxica significativa.

A L-asparaginase de *A. niger* foi capaz de inibir de forma efetiva o crescimento de células de câncer cervical humano *in vitro* da origem HeLa, que futuramente poderá formar um agente terapêutico capaz de tratar o câncer cervical provocado pelo HPV 18.

A enzima objeto desse estudo, também demonstrou resultados significativos no que diz respeito a sua atividade oncogênica nas células HeLa, que apresentaram, depois do uso de 100µg/mL de L-asparaginase, por 72h, alterações morfológicas importantes em comparação com as células controle. Após o experimento, pelo tempo de exposição à enzima, as células HeLa exibiram formações circulares com expressiva redução de tamanho e aparência

áspera em sua superfície, indicando perda de material citoplasmático e degeneração relevante de corpos celulares, sendo possível ver espaços vazios nos campos analisados. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Fátima *et al.* (2019), com a L-asparaginase isolada de *P. aeruginosa*, demonstrando que a enzima poderá ser usada como um agente terapêutico eficaz no tratamento do câncer cervical, sendo necessários estudos *in vivo* adicionais.

Nas condições experimentais deste estudo, concluiu-se que a L-asparaginase foi capaz de inibir a proliferação e migração das células tumorais da linhagem HeLa, cujas membranas apresentaram alterações estruturais baseadas na concentração aplicada de enzima. Esses resultados sugerem que a L-asparaginase pode ser um agente promissor para tratamento do câncer provocado pelo HPV 18. Já nas células tumorais da linhagem SiHa não houve resultados significativos.



## 7. CONCLUSÃO

Estes resultados destacam a farinha da semente de *E. oleracea* Mart., como um substrato promissor na suplementação fúngica.

Foi demonstrada a capacidade do *A. niger* em produzir a enzima L-asparaginase, tendo como vantagem seu baixo custo de produção, devido à facilidade de obtenção desse microrganismo no ambiente.

Os resultados encontrados mostraram que *A. niger* apresenta maior atividade enzimática e concentração de proteína na fermentação semissólida, utilizando farinha de semente de *E. oleracea* Mart como fonte de nutrientes.

Com técnicas simples de purificação enzimática parcial e total, foi obtida a L-asparaginase desse estudo com resultados satisfatórios de pureza e alta concentração proteica.

Esta enzima demonstrou resistência e estabilidade a diferentes faixas de pH, temperatura, diferentes agentes surfactantes e íons metálicos, bem como em solventes orgânicos. Além disso, a enzima apresentou parâmetros cinéticos relevantes em relação a enzima de outros microrganismos comparados em literatura, e tempo de armazenamento a -34°C com resistência e durabilidade por aproximadamente 120 dias, demonstrando que a L-asparaginase pode ser uma alternativa para aplicações em processos farmacêuticos.

Observou-se que a L-asparaginase tem a capacidade de inibir a proliferação das células HeLa de forma significativa, mesmo em um curto período de reação enzimática.

Esses achados indicam que o *A. niger* representa uma nova e valiosa fonte de produção de L-asparaginase. No entanto, é importante ressaltar que estudos adicionais e ensaios *in vivo* são necessários para determinar a eficácia terapêutica da L-asparaginase obtida a partir do *A. niger*.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

O *A. niger* demonstrou boa capacidade de produção de L-asparaginase e sua enzima apresentou resistência a diversas faixas de pH e temperaturas, à diferentes íons metálicos e surfactantes, podendo ser uma alternativa para uso farmacêutico de baixo custo em comparação com outras enzimas comerciais. Estudos mais aprofundados, poderão viabilizar o uso dessa enzima economicamente atrativa, com o objetivo de reduzir o custo de produtos através do uso da L-asparaginase obtida nacionalmente, atendendo as necessidades da população e da indústria nacional e internacional.

As próximas etapas que estão sendo realizadas neste trabalho envolvem estudos *in vivo*, com o objetivo de avaliar sua eficácia terapêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABDALALL A. H. et al. Molecular, physiological, and biochemical characterization of extracellular lipase production by *Aspergillus niger* using submerged fermentation. **Peer J**, v. 8, 2020. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.9425>.

ALAM, S., Nagpal, T., Singhal, R., & Khare, S. K. (2021). Immobilization of L-asparaginase on magnetic nanoparticles: Kinetics and functional characterization and applications. **Bioresource Technology**, 339, 125599.

AMATTO, I. V. D. S., & GUIMARÃES, L. H. S. (2019). **Production of L-asparaginase by *Aspergillus niveus* under solid-state fermentation using agroindustrial byproducts.**

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues et al. Produção de L-asparaginase de penicillium sp isolado do cerrado brasileiro L-asparaginase production of penicillium sp isolated from the brazilian cerrado. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 1, p. 1740-1743, 2022.

ASTHANA, Neeta et al. Microbial L-asparaginase: **A potent antitumour enzyme.** 2003.

AUGUSTI, Rodinei et al. Caracterização física de briquetes de serragem e caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), aglutinados com amido de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Open science research ix**, v. 9, n. 1, p. 131-140, 2022).

BABU UK, Ramagopal N, Reddy DSR (2010) Optimization of L-asparaginase production from isolated *Aspergillus niger* by using solid state fermentation on sesame cake via application of genetic algorithm, and artificial neural network-based design model. **J Biotechnol** 150:S538–S539.

BARBOSA, Priscila Oliveira et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp dietary intake improves cellular antioxidant enzymes and biomarkers of serum in healthy women. **Nutrition**, v. 32, n. 6, p. 674-680, 2016.

BAKER, Scott E. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. **Medical mycology**, v. 44, n. Supplement\_1, p. S17-S21, 2006.

BAKER, Matthew et al. Immunogenicity of protein therapeutics: the key causes, consequences and challenges. **Self/nonself**, v. 1, n. 4, p. 314-322, 2010.

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

BEHAKER, Natália. **Atividade antitumoral de inibidores de Histona Desacetilase como estratégia terapêutica contra o câncer cervical humano associado ao Papilomavírus Humano (HPV)**. 2021.

BENICIO, Vanilde et al. Identificação e características culturais de espécies do gênero *Aspergillus* isoladas de sementes de feijão no Estado da Paraíba. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, p. 180-183, 2003.

BOWMAN, W. Paul et al. Augmented therapy improves outcome for pediatric high risk acute lymphocytic leukemia: results of Children's Oncology Group trial P9906. **Pediatric blood & cancer**, v. 57, n. 4, p. 569-577, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; Cuvelier, M. E.; BERSET, C.; Lebensm.Wiss. **Technol.** 1995, 28, 25.

CALBO, MARIA ELISA RIBEIRO; MORAES, JOSÉ ANTÔNIO PV DE. Efeitos da deficiência de água em plantas de *Euterpe oleracea* (açai). **Brazilian Journal of Botany**, v. 23, p. 225-230, 2000.

CHIN, Dawn et al. Neuroprotective properties of curcumin in Alzheimer's disease- merits and limitations. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 32, p. 3955-3985, 2013.

COELHO, MARIA ALICE ZARUR et al. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde**. 2001.

COELHO, Dayse Natália Matos et al. **Estudo fractográfico de compósitos de matriz polimérica reforçados com fibras de Açai e Curauá**. 2021.

CORDEIRO, M. de A. et al. Ethanol production through enzymatic hydrolysis of açai seed (*Euterpe oleracea* Mart). **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 8, n. 1, p. 122-152, 2019.

DUARTE, Suzane Meriely da Silva; FARIA, Felipe Venancio; DE OLIVEIRA MARTINS, Miquéias. Métodos diagnósticos para a caracterização de candidíase e papilomavírus humano. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18083-18091, 2019.

DA CUNHA, Marília Crivelari et al. Using response surface methodology to improve the L-asparaginase production by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 31-36, 2018.

DA SILVA, Raphaela Moreira Gomes et al. Detecção precoce do câncer do colo do útero no Brasil: um estudo dos indicadores de cobertura e adesão às diretrizes técnicas nacionais. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e48511326714-e48511326714, 2022.

DACHURI, V.; BOYINENI, J.; CHOI, S.; CHUNG, H. S.; JANG, S. H.; LEE, C. W. Organic Solvent-tolerant, Cold-adapted Lipases PML and LipS Exhibit Increased Conformational Flexibility in Polar Organic Solvents. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.131, p. 73 – 78, 2016.

DATTA, S., Christena, LR, & Rajaram, YRS (2013). Imobilização de enzimas: uma visão geral sobre técnicas e materiais de apoio. **3 Biotech**, 3, 1-9.

DIAS, F. F. G.; CASTRO, R. J. S.; OHARA, A.; NISHIDE, T. G.; BAGAGLI, M. P.; SATO, H. H. Simplex Centroid Mixture Design to Improve L-Asparaginase Production in Solid-State Fermentation Using Agroindustrial Wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528 – 534, 2015.

DIAS, Fernanda Furlan Gonçalves; DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; SATO, Helia Harumi. L-Asparaginase from *Aspergillus* spp.: production based on kinetics, thermal stability and biochemical characterization. **3 Biotech**, v. 9, n. 7, p. 1-10, 2019.

DIAS, F. F. G., Ruiz, A. L. T. G., Della Torre, A., & Sato, H. H. (2016). Purification, characterization and antiproliferative activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 6(9), 785-794.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic Hydroxamate Resistance and Asparaginase Regulation in the Fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493 – 501, 1977.

DUNN, J. B., Mueller, S., Wang, M. Han, J. (2012). Energy consumption and greenhouse gas emissions from enzyme and yeast manufacture for corn and cellulosic ethanol production. **Biotechnology letters**, 34, 2259-2263. <https://doi.org/10.1007/s10529-012-1057-6>

EI-GENDY, M.M.A.A., Yahya, S.M.M., Hamed, A.R., Soltan, M.M., El-Bondkly, A.M.A. (2018). Phylogenetic analysis and biological evaluation of marine endophytic fungi derived from Red Sea sponge *Hyrtios Erectus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 185 (3), 755–777.

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

EL-SALEM, F. et al. Real-time PCR HPV genotyping in fine needle aspirations of metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Exposing the limitations of conventional p16 immunostaining. **Oral oncology**, v. 90, p. 74-79, 2019.

FATIMA, Nuzhath; KHAN, Mohd Mazharuddin; KHAN, Imran Ali. L-asparaginase produced from soil isolates of *Pseudomonas aeruginosa* shows potent anti-cancer activity on HeLa cells. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1146-1153, 2019.

FIGUEIREDO, Laisla Rodrigues et al. Análise dos efeitos celulares do extrato padronizado de própolis vermelha na linhagem celular de câncer de mama quimiorresistente MDA-MB-231. **Seven Editora**, p. 185-200, 2023.

FONSECA, Marcela Helena Gambim et al. Circumventing the side effects of L-asparaginase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 139, p. 111616, 2021.

FUNG, Marcus Kwong Lam; CHAN, Godfrey Chi-Fung. Drug-induced amino acid deprivation as strategy for cancer therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 10, n. 1, p. 1-18, 2017.

GOMES, José Gabriel da Silva. **Prospecção e identificação de proteínas do extrato de *Phaseolus vulgaris* L.** 2021.

GRODOWSKA, K., & PARCZEWSKI, A. (2010). Organic solvents in the pharmaceutical industry. *Acta Poloniae Pharmaceutica*. **Drug Research**, 67(1).

IGREJA, Willen Silva et al. **Produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra*, utilizando caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) como substrato para a fermentação.** 2020.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **CONTROLE DO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO: Conceito e Magnitude**. 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/conceito-e-magnitude>>. Acesso em: 20 out. 2019.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **PREVENÇÃO AO CÂNCER DO COLO DO ÚTERO**. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/boletim\\_tematico/cancer\\_colo\\_utero\\_marco\\_2023.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/boletim_tematico/cancer_colo_utero_marco_2023.pdf). Acesso em: 12 set. 2023.

KRISHNAPURA, PR e BELUR, PD (2016). Purificação parcial e caracterização de L-asparaginase de *Talaromyces pinophilus* endofítico isolado de rizomas de *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** , 124 , 83-91.

KARANAM, S. K., & MEDICHERLA, N. R. (2010). Application of Doehlert experimental design for the optimization of medium constituents for the production of L-asparaginase from Palm Kernal cake (*Elaeis guineensis*). **J Microbial Biochem Technol**, 2(1), 1-7.

KHANEGHAH, Amin M.; FAKHRI, Yadolah. Probiotics and prebiotics as functional foods: state of the art. **Current Nutrition & Food Science**, v. 15, n. 1, p. 20-30, 2019.

KUMAR N S M.; MANONMANI H K. Purification, characterization and Kinect properties of extracellular L-asparaginase produced by *Clasdorporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 29, 577-587, 2013.

LIBOSHI, Y., Papst, P. J., Hunger, S. P., & Terada, N. (1999). L-Asparaginase inhibits the rapamycin-targeted signaling pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, 260(2), 534-539.



LIRA, G. B.; LOPES, A. S. C.; NASCIMENTO, F. C. A.; CONCEIÇÃO, G. S.; BRASIL, D. D. S. B. Extraction processes and industrial uses of andiroba and açai oils: a review. Research, **Society and Development**, v. 10, n.12, 2021.

LUBKOWSKI, Jacek; WLODAWER, Alexander. Structural and biochemical properties of L-asparaginase. **The FEBS Journal**, v. 288, n. 14, p. 4183-4209, 2021.

MAISINCHO ASQUI, Maritza Paola; DELGADO DEMERA, María Hipatia; CEDEÑO PALACIOS, Carlos Alfredo. MODELOS MATEMÁTICOS EN LA CINÉTICA ENZIMÁTICA. UNA REVISIÓN. **Centro Azúcar**, v. 49, n. 1, p. 115-131, 2022.

MAHAJAN, R. V., Saran, S., Saxena, R. K., & Srivastava, A. K. (2013). A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of l-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS microbiology letters**, 341(2), 122-126.

MEGHAVARNAM, AK; JANAKIRAMAN, S. Purificação e caracterização da enzima terapêutica L-asparaginase de um isolado fúngico de solo tropical *Fusarium culmorum* ASP-87. **J Anesth Crit Care Open Access**, v. 2, n. 5, pág. 00064, 2015.

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and Optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. Using Agricultural Residues in Solid State Fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 150 – 158, 2013.

MOGUEL, I. S., Yamakawa, C. K., Pessoa Jr, A., & Mussatto, S. I. (2020). L-asparaginase Production by *Leucosporidium scottii* in a Bench-Scale Bioreactor with Co-production of Lipids. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 8, 576511.

MOSMANN, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:

application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** 65, 55–63.

MOTTA, Valter T. Bioquímica básica. **Medbook**: Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

MUKHERJEE, Rupkatha; BERA, Debabrata. Biochemical characterization and thermodynamic principles of purified L-Asparaginase from novel *Brevibacillus borstelensis* ML12. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 39, p. 102260, 2022.

MUNEER, Faizan et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, p. 967-981, 2020.

NASCIMENTO, Walnice Maria Oliveira Do; CICERO, Silvio Moure; NOVEMBRE, Ana Dionísia da Luz Coelho. Conservação de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, p. 24-33, 2010.

OLIVEIRA, Fábio Martins et al. Valor nutricional e estabilidade aeróbia do bagaço de cana-de-açúcar com uréia e enzimas fibrolíticas exógenas. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 2741-2760, 2020.

OLIVEIRA, Stéfani Ferreira de. **Nanoemulsão a base do óleo da semente de Euterpe oleracea (Mart.) com atividade frente Aedes aegypti**. 2022.

OLIVEIRA, Mayke Adair Almeida et al. CORRELAÇÃO DOS FATORES GENÉTICOS DOS VÍRUS HPV 16/18 E O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO. **Estudos Avançados sobre Saúde e Natureza**, v. 3, 2022.

Organização Pan-Americana de Saúde. **Relatório sobre Saúde Pública na América Latina**. 2019. <https://www.paho.org/pt/noticias/1-2-2019-cancer-colo-do-utero-e-3o-mais-comum-entre-mulheres-na-america-latina-e-caribe>.

Organização Pan-Americana de Saúde. **Relatório sobre Saúde Pública na América Latina**. 2020. <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.

PAULA, José Elias de. Anatomia de Euterpe oleracea Mart. (Palmae da Amazônia). **Acta Amazonica**, v. 5, p. 265-278, 1975.

PARIZOTTO, Letícia de Almeida. **Produção de L-asparaginase por Pichia pastoris em cultivos descontínuos-alimentados em biorreatores**. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PIETERS, Rob et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PINTO, Vicktor Bruno Pereira et al. **Efeitos dos extratos de Euterpe oleracea e Geissospermum vellosii em linhagens celulares de câncer cervical**. 2023.

PHETSRI, K., Furukawa, M., Yamashiro, R., Kawamura, Y., Hayashi, J., Tobe, R., ... & Wakayama, M. (2019). Caracterização bioquímica comparativa de L-asparaginases de quatro espécies de bactérias lácticas. **Journal of Biotechnology and Biomedicine**, 2 (3), 112-124.

RANI, S. A.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. B. A study on in vitro antioxidant and anticancer activity of l-asparaginase. **J Pharm Res**, v. 5, p. 1463-1466, 2012.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, Ursula Fabiola et al. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 912-919, 2011.

RUFINO, Maria SM et al. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 693-695, 2009.

SAMBROOK, J., & RUSSELL, D. W. (2001). Molecular Cloning-Sambrook & Russel-Vol. 1, 2, 3. **Cold Springs Harbor Lab Press: Long Island, NY, USA**.

SANTOS, Matheus Maciel; PASOLINI, Fernanda Souza; COSTA, Ana Paula Oliveira. Caracterização físico-química do caroço e da fibra do açaí (*Euterpe*

oleracea mart.) via métodos clássicos e instrumentais. **Brazilian Journal of Production Engineering**, v. 9, n. 2, p. 143-160, 2023.

SERRÃO, Alisson Caio Magalhães et al. Análise do processo de pirólise de sementes de Açaí (*Euterpe Oleracea*, Mart): Influência da temperatura no rendimento dos produtos de reação e nas propriedades físico-químicas do Bio-Óleo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 18200-18220, 2021.

SCHUSTER, E. et al. On the safety of *Aspergillus niger*—a review. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, p. 426-435, 2002.

SILVA, Renata Cristina da et al. **Farinha do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.): caracterização e efeitos da adição desta farinha em modelo murino de obesidade induzida por dieta.** 2016.

SILVEIRA AC da,; KASSUIA YS., DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutiva. *Comun Técnico* 421 - **Embrapa** [Internet]. 2018.

SIMOES, Ludmila Pini; JUNIOR, Gerson Zanusso. Vírus HPV e o desenvolvimento de câncer de colo de útero—uma revisão bibliográfica. **Revista uningá**, v. 56, n. 1, p. 98-107, 2019.

SUDARKODI, C.; SUNDAR, S. Anticancer activity of L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* against HEP-G2 and Hela cell lines. **Int J Recent Sci Res**, v. 9, n. 3, p. 25328-25330, 2018.

Teles AM, Silva-Silva JV, Fernandes JMP, Abreu-Silva AL, Calabrese KDS, Mendes Filho NE, Mouchrek AN, Almeida-Souza F. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2021 Feb 20; 2021:6663255. doi: 10.1155/2021/6663255. PMID: 33688364; PMCID: PMC7914077.

TUNDISI, L. L.; COELHO, D. F.; ZANCHETTA, B.; MORIEL, P.; PESSOA Jr. A.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E.; MAZZOLA, P. G. L-Asparaginase Purification. **Separation & Purification Reviews**, v. 46, p. 35 – 43, 2017.

VALA, Anjana K. et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 41-46, 2018.

VALENZUELA-LOPEZ, Nicomedes et al. Coelomycetous fungi in the clinical setting: morphological convergence and cryptic diversity. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 2, p. 552-567, 2017.

VASCONCELOS, Aldenora dos Santos et al. Bioprocessamento de resíduo agroindustrial e madeireiro da Amazônia via fermentação em estado sólido utilizando *Ganoderma* spp. para a produção de enzimas lignocelulolíticas. 2022.

VERMA, Neelam et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45-62, 2007.

WARBURG, O. And CHRISTIAN, W 1941. Isolation and Crystalization of the Fermentation Enzyme Enolase, **Biochem. Z.** 310:384-421.

WATERHOUSE, Andrew L. Determination of total phenolics. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 6, n. 1, p. I1. 1.1-I1. 1.8, 2002.

WOISKY, Ricardo G.; SALATINO, Antonio. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, J.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A (1990).

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

ZAVARIZE, Danilo Gualberto. Síntese de catalisador ácido heterogêneo em base carbônica obtida de resíduos de sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para produção de biodiesel com óleo de fritura. 2020.

## ANEXO I: Depósito de Patente



02/06/2023 870230047092  
11:52  
29409162304131863

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 010867 9

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 06279103000119

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Cidade Universitária Dom Delgado, Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga.

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65080-805

**País:** Brasil

**Telefone:** (98) 32728710

**Fax:**

**Email:** ageufma.crp@ufma.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 02/06/2023 às 11:52, Petição 870230047092

**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** Caldo nutriente composto por farinha de caroços da Euterpe oleracea Mart (açai)

**Resumo:** A presente invenção trata-se de composição de caldo nutriente composto da farinha de caroços da Euterpe oleracea Mart. A farinha de caroços da Euterpe oleracea Mart é a principal fonte de suplementação do caldo nutriente pois ela é fonte cálcio, ferro, potássio vitamina B que são os principais nutrientes utilizados para o crescimento de quaisquer microrganismos que não são exigentes em seus requisitos alimentares e na sua produção de enzimas através da fermentação líquida. Esta invenção é uma alternativa para aplicação de caroços da Euterpe oleracea Mart que é um resíduo industrial regional.

**Figura a publicar:** 01

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 02/06/2023 às 11:52, Petição 870230047092



**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 4****Nome:** SUZANE MERIELY DA SILVA DUARTE**CPF:** 02437092340**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Enfermeiro de nível superior, nutricionista, farmacêutico e afins**Endereço:** Vila Maracangalha, Rua F, número 66**Cidade:** Belém**Estado:** PA**CEP:** 66613-750**País:** BRASIL**Telefone:** (99) 991 360215**Fax:****Email:** suzanemeriely25@gmail.com**Inventor 2 de 4****Nome:** MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDÃO NASCIMENTO**CPF:** 04492900349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Duque Bacelar, Quadra 33, número 41, Quadra 33, Quintas do Calhau**Cidade:** São Luís**Estado:** MA**CEP:** 65072-023**País:** BRASIL**Telefone:** (98) 981 890191**Fax:****Email:** maria.asterro@ufma.br**Inventor 3 de 4****PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

---

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 02/06/2023 às 11:52, Petição 870230047092

ANEXO II: Artigo publicado na revista *Fermentation*

Qualis: A3

Fator de Impacto: 3,7

*fermentation*

Article

**Production, Characterization Purification, and Antitumor Activity of L-Asparaginase from *Aspergillus niger***Suzane Meriely da Silva Duarte <sup>1</sup>, Allysson Kayron de Carvalho Silva <sup>1</sup>, Katia Regina Assunção Borges <sup>1</sup>, Carolina Borges Cordeiro <sup>2</sup>, Fernanda Jeniffer Lindoso Lima <sup>1</sup>, Marcos Antônio Custódio Neto da Silva <sup>3,\*</sup>, Marcelo de Souza Andrade <sup>1,2</sup> and Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento <sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup> Programa de Doutorado em Biotecnologia—Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Center for Basic and Applied Immunology (NIBA), Federal University of Maranhão, São Luis 65080-805, Maranhão, Brazil; suzanemerely25@gmail.com (S.M.d.S.D.); allysson.carvalho@discente.ufma.br (A.K.d.C.S.); borges.katia@discente.ufma.br (K.R.A.B.); fernanda.jeniffer@discente.ufma.br (F.J.L.L.); marcelo.andrade@ufma.br (M.d.S.A.)
- <sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto (PPGSAD), Center for Basic and Applied Immunology (NIBA), Federal University of Maranhão, São Luis 65080-805, Maranhão, Brazil; carolinabc23@gmail.com
- <sup>3</sup> Department of Medicina I, Federal University of Maranhão, Imperatriz 65915-060, Maranhão, Brazil
- \* Correspondence: marcos.antonio@ufma.br

**Abstract:** Cervical cancer is caused by a persistent and high-grade infection. It is caused by the Human Papillomavirus (HPV), which, when entering cervical cells, alters their physiology and generates serious lesions. HPV 18 is among those most involved in carcinogenesis in this region, but there are still no drug treatments that cause cure or total remission of lesions caused by HPV. It is known that L-asparaginase is an amidohydrolase, which plays a significant role in the pharmaceutical industry, particularly in the treatment of specific cancers. Due to its antitumor properties, some studies have demonstrated its cytotoxic effect against cervical cancer cells. However, the commercial version of this enzyme has side effects, such as hypersensitivity, allergic reactions, and silent inactivation due to the formation of antibodies. To mitigate these adverse effects, several alternatives have been explored, including the use of L-asparaginase from other microbiological sources, which is the case with the use of the fungus *Aspergillus niger*, a high producer of L-asparaginase. The study investigated the influence of the type of fermentation, precipitant, purification, characterization, and in vitro cytotoxicity of L-asparaginase. The results revealed that semisolid fermentation produced higher enzymatic activity and protein concentration of *A. niger*. The characterized enzyme showed excellent stability at pH 9.0, temperature of 50 °C, resistance to surfactants and metallic ions, and an increase in enzymatic activity with the organic solvent ethanol. Furthermore, it exhibited low cytotoxicity in GM and RAW cells and significant cytotoxicity in HeLa cells. These findings indicate that L-asparaginase derived from *A. niger* may be a promising alternative for pharmaceutical production. Its attributes, including stability, activity, and low toxicity in healthy cells, suggest that this modified enzyme could overcome challenges associated with antitumor therapy.

**Keywords:** cervical cancer; L-asparaginase; *Aspergillus niger*



**Citation:** da Silva Duarte, S.M.; de Carvalho Silva, A.K.; Assunção Borges, K.R.; Borges Cordeiro, C.; Lindoso Lima, E.J.; da Silva, M.A.C.N.; de Souza Andrade, M.; Nascimento, M.d.S.B. Production, Characterization Purification, and Antitumor Activity of L-Asparaginase from *Aspergillus niger*. *Fermentation* **2024**, *10*, 226. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050226>

Academic Editor: Ronnie G. Willaert

Received: 12 March 2024

Revised: 12 April 2024

Accepted: 15 April 2024

Published: 25 April 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**1. Introduction**

Cervical cancer is caused by a persistent and high-grade infection, which can be caused by the Human Papillomavirus (HPV), which, upon entering cervical cells, alters their physiology and generates serious lesions [1]. It is worth mentioning that, to date, there are no drug treatments that cause cure or total remission of lesions caused by HPV [2]. HPV 18 is among those most involved in carcinogenesis in this region, which is why the use of HeLa cells in this study is justified since they are cervical carcinoma cells transformed by HPV 18 [3].