

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

KELLEN CRUVINEL RODRIGUES ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE UMA NOVA ESPÉCIE
DO GÊNERO *Penicillium* PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

BRASÍLIA-DF

2019

KELLEN CRUVINEL RODRIGUES ANDRADE

CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE UMA NOVA ESPÉCIE
DO GÊNERO *Penicillium* PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Pérola de Oliveira Magalhães
Dias Batista

BRASÍLIA – DF

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Andrade, Kellen Cruvinel Rodrigues

AAN553C CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE UMA NOVA
ESPÉCIE DO GÊNERO *Penicillium* PARA A PRODUÇÃO DE L-
ASPARAGINASE / Kellen Cruvinel Rodrigues Andrade; orientador
Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista. -- Brasília, 2019.
106 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade de Brasília, 2019.

1. L-asparaginase. 2. Fungo filamentosos. 3. Cerrado. 4. Leucemia.
I. de Oliveira Magalhães Dias Batista, Pérola, orient. II. Título.

Kellen Cruvinel Rodrigues Andrade

CARACTERIZAÇÃO MORFO-MOLECULAR DE UMA NOVA ESPÉCIE DO GÊNERO *Penicillium* PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 08 de Maio de 2019.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Diego Madureira de Oliveira
Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de São Paulo (USP)

Dedico este trabalho a toda a minha família, em especial ao meu pai, minha mãe, minha irmã e meu marido por todo incentivo e apoio dado para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me iluminar e guiar nessa etapa.

À minha família, que sempre torceu pelas minhas conquistas e apoiou-me. Em especial aos meus pais, Valdeir e Luci, que acreditaram no princípio da educação e conduziram-me ao caminho da disciplina. À minha irmã, Flávia, por ser minha amiga e compartilhar o mesmo caminho comigo. Mesmo distantes estão sempre comigo em orientações, orações e no coração.

Ao meu companheiro e maior incentivador, meu marido Henderson. Obrigada pelo apoio, carinho e compreensão nesse período, por estar ao meu lado nas alegrias e dificuldades.

Ao amigo João Victor, pessoa iluminada, que enxergou em mim o que eu não via e apresentou-me o caminho ao mestrado. Sou grata a suas palavras acolhedoras e de otimismo.

À minha orientadora, professora Pérola Magalães, por ter me acolhido, pela oportunidade e confiança ao trabalho, por sua dedicação e carinho nos direcionamentos.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos do Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais - Diegue, Juliana, Marcela, Paula e Samuel - que me receberam com muito carinho, sou grata aos momentos compartilhados e pelos conselhos disponíveis a qualquer momento. Em especial, a Thaís, que crescemos juntas em conhecimento durante o mestrado, sou grata por sua amizade.

As técnicas do laboratório, Júlia e Patrícia, que se dedicam a nos apoiar e cuidam de cada um com muita atenção.

Ao Prof. Danilo Batista Pinho e ao grupo de estudo do Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – Alexandre, Bianca,

Camila e Jennifer – que me acolheram. Obrigada pelos ensinamentos e suporte que permitiram a execução de atividades essenciais ao trabalho.

Ao professor Dr. Edivaldo Ximenes do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília por disponibilizar suporte essencial na elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca de avaliação, por aceitarem o convite. Sou grata a atenção e contribuição neste trabalho.

À CAPES, pelo suporte financeiro concedido.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e doaram-se para se tornar possível a conclusão deste trabalho. Sou grata!

RESUMO

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues. **Caracterização Morfo-Molecular de uma Nova Espécie do Gênero *Penicillium* para a Produção de L-Asparaginase**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2019.

A enzima L-asparaginase representa grande importância no campo farmacêutico sendo utilizada no tratamento de neoplasias malignas, como para Leucemia Linfooblástica Aguda (LLA), devido à sua capacidade de hidrolisar a L-asparagina em L-aspartato e amônia. As preparações dessa enzima de uso clínico são derivadas de fonte bacteriana e seu uso está frequentemente associado a reações adversas graves. Assim, revela-se importante a busca por novas fontes de L-asparaginase. O objetivo desse trabalho foi analisar a produção de L-asparaginase fúngica por *Penicillium* sp. e caracterizá-lo morfo-molecularmente. A espécie em estudo (DCFS6) foi isolada do solo do Cerrado Centro-Oeste brasileiro. Em delineamento inicial foi empregado Placket-Burman Design (PBD) para determinar a influência de 11 variáveis na produção de L-asparaginase, seguido por um delineamento Fatorial Fracionado (DFF) 2^{8-4} e Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis consideradas foram L-asparagina, L-prolina, ureia, nitrato de sódio, extrato de levedura, sulfato de amônio, peptona, glicose, sacarose, extrato de malte e cloreto de potássio. A atividade de L-asparaginase foi determinada medindo a formação de β -hidroxamato aspártico. Os resultados obtidos do PBD apresentaram variação na atividade de L-asparaginase de 0,47 a 1,77 U/g_{células}, e identificou L-prolina como variável significativa ($p < 0.1$) com efeito positivo. No DFF a atividade enzimática variou de 1,10 a 2,36 U/g_{células}, e sulfato de amônio foi identificado como variável significativa com efeito positivo. Os resultados no delineamento final DCCR não permitiram obter um modelo matemático que gere uma superfície de resposta e determinar as concentrações otimizadas para o meio de cultivo. Na identificação da espécie, a cultura monohifal foi utilizada para a extração do DNA genômico e amplificação das regiões ITS (*Internal Transcription Spacer*) e RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit). Análise filogenética por Inferência Bayesiana com combinação multigênica e a caracterização morfológica revelou o isolado em estudo com potencial de nova espécie, que será proposto seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas.

Palavras chaves: L-asparaginase, Fungo filamentoso, Cerrado, Leucemia

ABSTRACT

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues Andrade. **Morpho-Molecular Characterization of a New Species of the *Penicillium* Genus for the Production of L-Asparaginase.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2019.

The enzyme L-asparaginase is of great importance in the pharmaceutical field and is used in the treatment of malignant neoplasms, such as Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL), due to its ability to hydrolyze L-asparagine in L-aspartate and ammonia. The preparations of this enzyme for clinical use are derived from a bacterial source and its use is often associated with serious adverse reactions. Therefore, the search for new sources of L-asparaginase is important. The objective of this work was to analyze the production of fungal L-asparaginase by *Penicillium* sp. and characterize it morpho-molecularly. The species under study (DCFS6) was isolated from the soil of the Brazilian Center-West Cerrado. In the initial design, Placket-Burman Design (PBD) was used to determine the influence of 11 variables on the production of L-asparaginase, followed by a Factorial Fractional Design (DFF) 2^{8-4} and Central Rotational Compound (DCCR). They were considered to be L-asparagine, L-proline, urea, sodium nitrate, yeast extract, ammonium sulfate, peptone, glucose, sucrose, malt extract and potassium chloride. L-asparaginase activity was determined by the formation of an aspartic β -hydroxamate. The results obtained from PBD showed a change in L-asparaginase activity from 0.47 to 1.77 U/g_{cell} and identified L-proline as a significant variable ($p < 0.1$) with a positive effect. In the DFF the enzymatic activity ranged from 1.10 to 2.36 U/g_{cell}, and ammonium sulfate was identified as a significant variable with a positive effect. The results in the final design of the DCCR did not allow to obtain a mathematical model that indicates a surface of response and determination as the measures optimized for the culture medium. In the identification of the species, the monohifalic culture was used for extraction of the genetic DNA and amplification of the ITS regions (Internal Transverse Spacer) and RPB2 (second largest subunit of RNA polymerase II). Phylogenetic analysis by Bayesian Inference with multigenic combination and the morphological characterization revealed the isolate under study with potential of new species, in order to be presented following the norms of the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants.

Key words: L-asparaginase, Filamentous fungus, Cerrado, Leukemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de catálise simplificado de L-asparaginase. Fonte: adaptado de Kumar e Sobha, 2012.	23
Figura 2: Mecanismo de ação da L-asparaginase (Shrivastava et al., 2015)	25
Figura 3: Conidióforo (“ <i>Penicillus</i> ”). Fonte: Onions e Brady (1987).	32
Figura 4: Mecanismo de reação da asparagina e hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β -hidroxamato aspártico férrico.	39
Figura 5: Curva padrão em μmol de β -hidroxamato aspártico.	40
Figura 6: Gel de quantificação da extração de DNA genômico do fungo isolado DCFS6. Espécime: (1) <i>Penicillium</i> sp. a; (2) <i>Penicillium</i> sp. b.	54
Figura 7: Eletroforese das regiões gênicas RPB2 (R), ITS (V), Beta-tubulina (B), Calmodulina (C) para identificação do isolado DCFS6. Espécime: (1) <i>Penicillium</i> sp. a; (2) <i>Penicillium</i> sp. b. Controle Negativo (CN). Marcador 1Kb (M).	55
Figura 8: Relação filogenética concatenada com sequências parciais das regiões ITS e RPB2 obtida por Inferência Bayesiana.	58
Figura 9: Cultura do isolado DCFS6, 7 dias, 25 ± 2 °C. (A) Crescimento em meio MEA, (B) BDA e (C) Sabouraud.	66
Figura 10: <i>Penicillium</i> sp. nov. A. Colônias crescidas em MEA, 7 dias, 25 ± 2 °C. B-D. Conidióforos. E-F. Aparato conidiogênico com fiáides ampuliformes. G. Conídios. H. Conídios germinados após 48 horas. I. Esclerócio. Barra de escala; B = 10 μm (B-H), I = 50 μm	67
Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers</i> à 52 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).	69
Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers</i> à 55 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).	69
Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers</i> à 50 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). * 0,5 μL DNA.	70
Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os <i>primers</i> à 48 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). * 0,5 μL DNA.	70
Figura 15: Purificação em gel do <i>primer PenD</i> à 52 °C. Marcador 1Kb (M). Fragmento a (1), fragmento b (2).	71

Figura 16: Comparativo de atividade de L-asparaginase do fungo DCFS6 identificada na biomassa e por extração enzimática – maceração.	72
Figura 17: Barras representando a atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6 nos meios (1) Czapek Dox modificado, (2) corrida 9 pelo PBD e (3) corrida 10 pelo DFF.	82
Figura 18: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina sob a atividade de L-asparaginase em meio CDM.	84
Figura 19: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 3%, 5%, 7% e 9%.	85
Figura 20: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 3%, 15% e 20%.	86
Figura 21: Gráfico representando o efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase e o crescimento de biomassa pelo fungo DCFS6.	87
Figura 22: Gráfico representando o efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. (CDM) meio Czapek Dox modificado, (PB) meio corrida 9 do Plackett Burman; seguidos das concentrações de L-prolina.	87
Figura 23: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob atividade de L-asparaginase em meio CDM.	88
Figura 24: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 1,5%, 3%, 5% e 7%.	89
Figura 25: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 1,5%, 10% e 15%.	90
Figura 26: Gráfico representando o efeito de sulfato de amônio na atividade de L-asparaginase e no crescimento de biomassa pelo fungo DCFS6.	91
Figura 27: Gráfico representando o efeito de sulfato de amônio na atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. (CDM) meio Czapek Dox modificado, (PB) meio corrida 9 do Plackett Burman; seguidos das concentrações de sulfato de amônio.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formas clínicas de L-asparaginase.....	26
Tabela 2: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental Placket-Burman para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.....	42
Tabela 3: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental DFF para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.	43
Tabela 4: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental DCCR para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.	44
Tabela 5: Isolados dispostos na análise filogenética.....	59
Tabela 6: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental Placket-Burman pelo fungo DCFS6.	74
Tabela 7: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental Placket-Burman pelo fungo DCFS6.....	75
Tabela 8: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental DFF pelo fungo DCFS6.....	77
Tabela 9: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental DFF pelo fungo DCFS6.	77
Tabela 10: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental DCCR pelo fungo DCFS6.....	78
Tabela 11: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental DCCR pelo fungo DCFS6.....	79
Tabela 12: ANOVA para o modelo completo do planejamento experimental DCCR do fungo DCFS6.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Espécies do gênero <i>Penicillium</i> produtoras de L-asparaginase.	33
Quadro 2: Preparação das soluções padrão para o método de β -hidroxamato aspártico.....	40
Quadro 3: Indicadores utilizados para a identificação do isolado DCFS6.	49
Quadro 4: <i>Primers</i> de L-asparaginase utilizados no estudo.....	52
Quadro 5: Tamanho dos fragmentos do fungo isolado DCFS6 e os respectivos genes utilizados na amplificação. (1) <i>Penicillium</i> sp.a e (2) <i>Penicillium</i> sp.b.	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ágar-água
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASNase – L- asparaginase
BDA – Ágar Batata Dextrose
CCD – Design do Composto Central
CDM – Czapek Dox modificado
DCCR – Desing Composto Central Rotacional
DFF – Desing Fatorial Fracionado
DNA – Ácido desoxirribonucleico
GRAS - *Generally Recognized as Safe*
ITS – Internal transcribed spacer
LLA – Leucemia Linfoide Aguda
MEA – Ágar Extrato de Malte
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBD – Design Placket Burman
PCR - Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial hidrogeniônico
PVP – Polivinilpirrolidona
RPB2 – RNA polymerase II
rpm – Rotações por minuto
SDA – Ágar Sabouraud
TAE - Tris-Acetato-EDTA
TCA – Ácido Tricloroacético
TRIS - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Leucemias	19
2.1.1 Leucemia Linfóide Aguda (LLA).....	20
2.2 L-asparaginase	22
2.3 Fungos filamentosos produtores de asparaginase	28
2.4 Gênero <i>Penicillium</i>	31
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Preparo de meio de cultivos e soluções	35
4.2 Preservação do fungo	36
4.3 Preparação do inóculo	37
4.4 Condições de cultivo	37
4.5 Liberação da enzima L-asparaginase	37
4.5.1 Maceração	37
4.6 Quantificação de proteínas totais	38
4.7 Determinação da atividade enzimática	38
4.8 Planejamento experimental para a produção de L-asparaginase	41
4.8.1 Plackett-Burman Design (PBD).....	41
4.8.2 Delineamento Fatorial Fracionado (DFF)	42
4.8.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	43
4.8.4 Determinação de efeito independente de L-Prolina e Sulfato de amônio	45
4.9 Análise estatística	46
4.10 Extração de DNA	46
4.10.1 Condições de cultivo para isolamento de DNA	46
4.10.2 Manipulação de DNA genômico	46
4.10.3 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%	47
4.10.4 Coloração com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).....	47
4.11 Amplificação das regiões gênicas para identificação	48
4.12 Purificação de produto de PCR e sequenciamento de DNA	49
4.13 Análises filogenéticas	50
4.14 Caracterização morfológicas do isolado DCFS6	51

4.15 Sequenciamento do gene da L-asparaginase	51
4.15.1 Desenho dos <i>primers</i> iniciadores	51
4.15.2 Amplificação da região gênica L-asparaginase	52
4.15.3 Purificação de fragmentos de amplificação em gel de agarose.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Extração, amplificação e purificação de DNA genômico	54
5.2 Caracterização molecular	57
5.3 Caracterização morfológica	65
5.4 Amplificação da região gênica L-asparaginase	68
5.5 Produção de L-asparaginase	71
5.5.1 Liberação da enzima L-asparaginase	71
5.5.2 Planejamento experimental por Plackett-Burman Design (PBD).....	73
5.5.3 Planejamento experimental por Delineamento Fatorial Fracionado (DFF)	75
5.5.4 Produção de L-asparaginase por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 78	
5.5.5 Determinação de efeito independente de L-prolina e Sulfato de amônio.....	83
6 CONCLUSÕES	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de origem linfocitária caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea, órgãos linfóides e sangue periférico (Pui et al., 2008). Apesar da ampla ocorrência dessa leucemia, a LLA tem maior incidência na infância entre o segundo e quinto ano de vida, sendo considerada o tipo mais comum em crianças (Onciu, 2009).

No tratamento da LLA, a enzima L-asparaginase foi incluída em protocolo desde 1962. E, no Brasil, o protocolo mais recentemente elaborado - GBTLI-LLA 99 – inclui a enzima a L-asparaginase com atividade antitumoral para o tratamento de LLA (INCA, 2001). A combinação dessa enzima com corticoides e quimioterápicos tem se apresentado eficaz para a remissão da neoplasia (Quintanilla-Flores et al., 2014). Em resposta a eficácia e acesso aos tratamentos, nos últimos anos, taxa de cura da LLA em crianças foi elevada a mais de 80% e observado aumento na sobrevida (Pui et al, 2008; Lopes et al., 2017).

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é responsável pela catálise seletiva da reação de hidrólise da L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Essa conversão do aminoácido em aspartato corresponde ao mecanismo antileucêmico da enzima.

A L-asparaginase ao chegar à corrente sanguínea ocasiona a depleção das reservas de L-asparagina presente no plasma. As células humanas para a síntese de proteínas necessitam do suprimento regular do aminoácido L-asparagina. A maioria das células humanas podem produzir seus próprios suprimentos de L-asparagina por meio da enzima asparagina sintetase e não necessitam obter a partir de dieta. Ao oposto, as células tumorais dependem do fornecimento exógeno de L-asparagina. Na presença de L-asparaginase circulante no plasma, ocasionando esgotamento extracelular desse aminoácido, as células neoplásicas são afetadas seletivamente e observa-se apoptose (Heinemann e Howard, 1969; Muller e Boss, 1998).

Em escala industrial, a enzima L-asparaginase comercializada com utilização clínica é de origem bacteriana, produzida a partir de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. No entanto, observam-se reações adversas e toxicidade importantes associadas ao uso da enzima de origem procariota (Shrivastava et al., 2012). Das reações adversas observadas nessa aplicação podem incluir: anafilaxia, distúrbios de

coagulação, crises neurológicas, hiperglicemia, hepatotoxicidade, leucopenia, pancreatite e trombose (Avramis, 2012; Saeed et al., 2018).

As melhorias adicionais no resultado da terapia de LLA requerem o desenvolvimento de estratégias menos tóxicas (Mullighan, 2011). Diante da importância de aplicação clínica e em observação as reações adversas apresentadas em decorrência do uso, a busca por outras fontes de L-asparaginase tem sido alvo de muitas pesquisas, motivadas a obter a produção da enzima em maior rendimento, além de apresentar menos reações adversas (Sarquis et al., 2004).

Além dessa observação do cenário mundial, nacionalmente tem-se gerando uma notável procura por sistemas diferentes de produção de L-asparaginase. Uma vez que a enzima utilizada no Brasil para o tratamento de LLA é importada e apresenta dificuldade de abastecimento.

Diversos trabalhos abordam a produção de L-asparaginase por organismos vivos, incluindo plantas, animais e microrganismos diferentes das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* utilizadas como fonte da enzima nas formulações clínicas. Dos microrganismos já relatados com produtores de L-asparaginase, observa-se interesse em estudos com fungos filamentosos. Esses, como organismos eucariotos visa a um dos objetivos de produção com redução das reações adversas. Dentre as espécies produtoras de fungos filamentosos, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (Imada et al, 1973; Gulati et al. 1997; Mohan e Manonmani, 2013).

A produção da enzima L-asparaginase por fungos pode ser influenciada por fatores nutricionais do meio de cultivo. Com objetivo de identificar a influência de variáveis na produção da enzima, o planejamento experimental apresenta-se como estratégia de orientação e delineamento final de otimização (Rodrigues e Lemma, 2014).

A partir de trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa Pérola Magalhães no Laboratório de Controle de Qualidade e Produtos Naturais – Faculdade de Ciências da Saúde; UnB; Brasília (DF) - foi abordada a produção de L-Asparaginase por fungos filamentosos presentes no solo e em espécies vegetais do bioma Cerrado brasileiro, localizado na região Centro-Oeste. Em um dos resultados apresentados o isolado DCFS6, uma espécie de *Penicillium*, foi revelado como produtor de L-asparaginase (Almeida, 2015).

O gênero *Penicillium* recebe destaque em estudos como produtor da enzima L-asparaginase, de algumas espécies já descritas foram identificados: *Penicillium aculeatum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. claviforme*, *P. cyclopium*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. granulatum*, *P. nelicum*, *P. nigricans*, *P. olsonii*, *P. simplicissimum*, *P. urticae* (Imada et al, 1973; Gulati et al, 1997; El-shafei, et al, 2012; Alhussaini, 2013; Yadav, 2014; Chow, 2015).

Em razão ao grande número de espécies descritas e à variabilidade inerente ao gênero, a taxonomia de *Penicillium* é bastante complexa. Assim, exige o uso de ferramentas mais modernas para identificação das espécies, como a biologia molecular complementando a taxonomia clássica com base na morfologia (Samson e Frisvad, 2004).

Assim, revela-se importante os trabalhos de identificação de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase com potencial aplicação farmacêutica. Neste contexto, encaixa-se o estudo de caracterização morfo-molecular do isolado DCFS6, do solo do Cerrado Centro-Oeste brasileiro, e a sua produção da enzima L-asparaginase.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucemias

As leucemias correspondem a um grupo de neoplasias das células sanguíneas, provenientes do crescimento descontrolado e o acúmulo de glóbulos brancos imaturos do tipo linfóide ou mieloide (Avramis, 2012).

As leucemias podem ser classificadas segundo a velocidade de evolução da doença e gravidade, sendo diferenciada em dois grupos: crônica ou aguda. Quando as células imaturas são afetadas, classificam-se em agudas, correspondendo a produção excessiva de células blásticas anormais e acumulando-se na medula óssea, interferindo a produção de células saudáveis. Na leucemia crônica, ocorre o acúmulo de células brancas maduras, porém anormais com progressão lenta. Além dessa classificação, podem ser agrupadas em linfóides e mielóides conforme o tipo de glóbulo branco afetado (INCA, 2018). A classificação da neoplasia tem importância na decisão terapêutica e no prognóstico.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016 revisou as classificações em tumores dos tecidos hematopoéticos e linfóides, agregando aspectos clínicos, morfológicos, imunofenotípicos e genético-moleculares de relevância para prognóstico e tratamento dos pacientes. Essa atualização trouxe as classificações como: neoplasias mieloproliferativas e mielodisplásicas, neoplasias mielóides com predisposição germinativa, leucemias agudas de linhagem ambígua, leucemia linfoblástica de linfócitos B, e leucemia linfoblástica de linfócitos T (Arber et al., 2016).

Em 2010 a 2014, a leucemia correspondeu à sexta causa mais comum de morte por câncer em mulheres e homens. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) foram estimados cerca de 10.800 casos novos de leucemia para o Brasil em 2018, e estimava-se 24.370 mortes por leucemia no mundo (INCA, 2018; LLS, 2018).

Na infância, a leucemia é o tipo de câncer mais comum, de 2010 a 2014, a leucemia representou 26,4% de todos os tipos de câncer diagnosticados entre crianças, adolescentes e jovens adultos com menos de 20 anos (Belson, 2007; LLS, 2018). Nessa faixa etária, a leucemia linfóide aguda é o tipo de diagnóstico mais frequente.

2.1.1 Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

A leucemia aguda corresponde a uma doença agressiva com origem nas células tronco da hematopoese, caracterizada pelo aumento da velocidade de produção, diminuição de apoptose, bloqueio na diferenciação celular, resultando em um acúmulo de células hematopoiéticas primitiva, denominadas blastos, e levando a insuficiência da medula óssea (Hoffbrand e Moss, 2013).

Dos tipos mais comuns de leucemia, observa-se a leucemia linfoide aguda (LLA) que é uma neoplasia maligna de células progenitoras linfoides de linhagem B ou T, e resultante da proliferação clonal e acúmulo de células que exibem marcadores celulares associados aos estágios precoces de maturação linfoide. Nesse caso, os blastos acumulam-se na medula óssea e substituem a população normal (Pui et al., 2008).

Apesar da alteração genética ser um fator importante no desenvolvimento da LLA, acredita-se que o acúmulo de vários outros processos possa estar envolvido na leucemogênese. Martins e colaboradores (2008) levantaram, por meio de estudos epidemiológicos de leucemias agudas em crianças, possíveis fatores de risco, incluindo genéticos, infecciosos e ambientais (radiação ionizante, radiação não ionizante, hidrocarbonetos, pesticidas, uso de álcool, tabagismo e uso de drogas ilícitas). A ocorrência pode estar ligada a condições genéticas hereditárias, como Síndrome de Down (Hertzberg et al., 2010) e alguns vírus, como Epstein-Barr e HIV (Geriniere et al., 1994; Sehgal et al., 2010).

A LLA atinge todas as regiões do mundo, ambos os sexos, afeta adultos e crianças com maior prevalência entre as idades de 2 a 5 anos. Das crianças diagnósticas com câncer menores de 15 anos, a LLA ocorre aproximadamente cinco vezes mais do que a leucemia mieloide aguda (LMA), e é responsável por aproximadamente 75% dos diagnósticos de leucemia (Onciu, 2009).

Segundo os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), o Brasil apresenta dados similares em comparação com o resto do mundo. A taxa de mortalidade por leucemia linfoide no país também vem acompanhando os números da taxa mundial, com uma média de 0,85 a cada 100.000 habitantes, entre 2000 a 2014, enquanto no mesmo período a média mundial foi de 0,9 (INCA, 2016).

O início clínico da LLA é frequentemente agudo e os sinais e sintomas correlacionam à carga celular leucêmica e substituição das células hematopoiéticas normais pelas leucêmicas. Os sintomas mais comuns incluem fadiga, letargia, febre,

dor nos ossos e articulações. E, as alterações laboratoriais frequentes incluem anemia, trombocitopenia, neutropenia e leucocitose ou leucopenia, níveis séricos de lactose desidrogenase e ácido úrico (Onciu, 2009). O sintoma menos comum é o comprometimento do Sistema Nervoso Central, atinge 10% dos pacientes, mas exige atenção especial na terapia (Pui et al., 2008).

O diagnóstico das leucemias agudas baseia-se nos resultados das análises morfológicas da medula óssea, em conjunto com as reações citoquímicas, perfil citogenético e imunofenotípico das células leucêmicas. Inicialmente, o diagnóstico baseia-se na identificação de células precursoras linfóides no microscópio e determinação da linhagem e estágio de desenvolvimento por citometria de fluxo (Pui et al., 2008).

O tratamento na LLA é composto de três principais fases: indução da remissão, consolidação; e manutenção. Na primeira fase, o objetivo é induzir a remissão completa por eliminação completa das células leucêmicas e sinais da LLA. A terapia de consolidação tem como propósito eliminar as células residuais submicroscópicas que restam após a terapia de indução. A fase de manutenção tem finalidade de evitar relapso e prolongar a remissão, nessa fase o tratamento é mais brando e longo (Pui et al., 2008; INCA, 2018).

Os regimes atuais de tratamento para LLA usam quimioterapia combinada intensiva, com pouco espaço para intensificação significativa devido a efeitos colaterais excessivos de curto e longo prazo (Mullighan, 2011). A combinação da L-asparaginase, corticóides e quimioterápicos tem se apresentado eficaz para a remissão da doença (Quintanilla-Flores et al., 2014). Aos pacientes que não respondem bem ao tratamento quimioterápico, o transplante com células hematopoiéticas pode ser realizado a partir de células extraídas da medula óssea, do cordão umbilical ou sangue periférico de um doador compatível (Almeida et al., 2015).

Os avanços em pesquisas nas causas da doença e o progresso constante no desenvolvimento de tratamentos eficazes elevou a taxa de cura à mais de 80% em crianças, em comparação com menos de 30% nos anos de 1960. Segundo a *Leukemia and Lymphoma Society*, em 2018 a sobrevivência de crianças e adolescentes menores de 15 anos foi de 91,8% e 94% para crianças com menos de 5 anos. Nessa oportunidade de avanço, podem surgir abordagens inovadoras que preservariam ganhos na sobrevivência livre de leucemia e redução dos efeitos colaterais tóxicos dos regimes intensivos atuais (Pui et al., 2008; LLS, 2018).

No Brasil, o protocolo mais recente - GBTLI-LLA 99 - foi sistematizado e planejado pelo Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância, e inclui a L-asparaginase, enzima que possui atividade antitumoral para o tratamento de LLA (INCA, 2001).

2.2 L-asparaginase

A enzima L-asparaginase tem sido utilizada no tratamento de doenças hematológicas como LLA e linfoma não-Hodgkin (Muller e Boos, 1998), por eliminar a constante replicação de células tumorais, seguindo a estratégia de evitar o fornecimento de aminoácidos necessários para a síntese de proteínas que permitam o funcionamento e sobrevivência da célula, consequentemente induzindo a apoptose celular (Krall et al., 2016).

A L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) é a uma enzima responsável pela catálise da reação hidrólise irreversível de L-asparagina em ácido aspártico e amônia (Figura 1) (Gurunathan e Sahadevan, 2012; Nomme et al., 2012). Em detalhe, a enzima catalisa a hidrólise do nitrogênio do grupo amida da cadeia lateral do aminoácido, convertendo em ácido (Loureiro, 2010). Trata-se de uma enzima encontrada em abundância em algumas plantas, microrganismos e animais, mas não em seres humanos. Notória atenção foi dada a L-asparaginase, a partir de pesquisas que corroboraram para a descoberta da sua utilização como agente antineoplásico.

A atividade de L-asparaginase foi descrita pela primeira vez por Lang (1904) em tecidos de carne bovina e ainda estabelecida por Furth e Friedmann (1910) e Clementi (1922) (Clementi, 1922; Arif e Hussain, 2014). Clementi (1922), durante pesquisas utilizando soro de mamíferos, observou que o soro de porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) apresentava atividade da enzima. Anos depois, Kidd (1953) relatou pela primeira vez o prospecto da L-asparaginase em câncer observando a regressão de linfomas transplantados pela administração de soro dessas cobaias (Kidd, 1953).

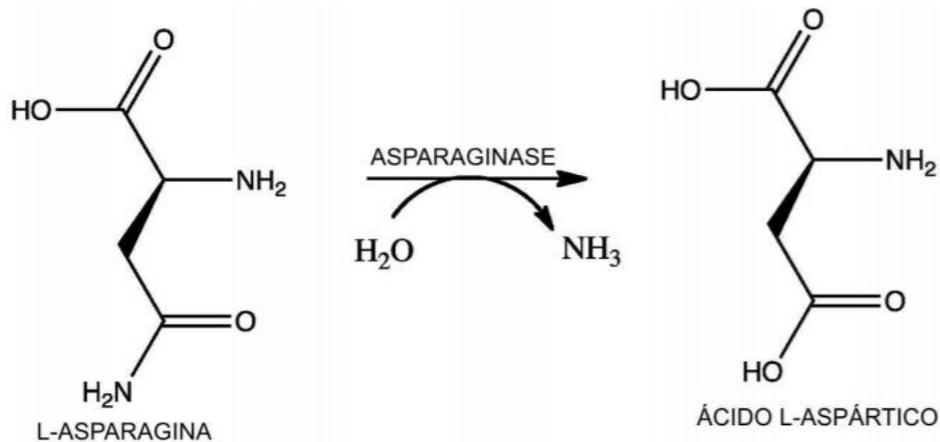


Figura 1: Mecanismo de catálise simplificado de L-asparaginase. Fonte: adaptado de Kumar e Sobha, 2012.

Ao mesmo tempo, várias observações foram feitas, dentre essas pode-se destacar que a inibição do crescimento celular ocorreu apenas a partir da utilização do soro de porquinhos-da-índia, e que soros obtidos de outras espécies animais não apresentaram o mesmo efeito. Além disso, a observação da suscetibilidade de apenas certos tipos de tumores ao mesmo soro (El-Nagar; El-Ewasy; El-Shweihy, 2014).

Após correlacionar os resultados de Clementi e Kidd, Broome (1961) observou a relação da regressão dos linfomas transplantados em camundongos à dependência nutricional das células malignas em asparagina exógena e, assim concluiu em seu trabalho que a atividade antitumoral era consequência da atividade enzimática da L-asparaginase (El-Nagar; El-Ewasy; El-Shweihy, 2014; Broome, 1961). Pelo mesmo autor, investigações posteriores confirmaram o potencial terapêutico da enzima (Broome, 1963a, 1963b).

Um estudo realizado por Yellin e Wriston (1966), a partir do soro de porquinhos-da-índia obteve a purificação parcial de duas isoformas da L-Asparaginase, entretanto, no desenvolvimento das observações apenas uma isoforma apresentou atividade antitumoral *in vivo* (Yellin E Wriston Jr, 1966). Em 1967, Cedar e Schwartz com intuito de elucidar a estrutura da enzima, coordenaram o estudo que identificou por *Escherichia coli* duas isoformas da L-asparaginase: L-asparaginase I e L-asparaginase II. A forma tipo I é encontrada predominantemente no citoplasma e baixa afinidade pelo aminoácido L-asparagina, e a forma tipo II é periplasmática e apresenta alta afinidade por L-asparagina (Cedar e Schwartz, 1967; Yun et al., 2007). Desde

então, iniciaram-se pesquisas voltadas para a busca de outras fontes desta enzima, sendo as mais frequentes de origem microbiana (Loureiro, 2010).

Sobre estudos de análise estrutural de L-asparaginase, Stecher et al. (1999) verificaram que a enzima tipo II é um homotetrâmero composta por subunidades idênticas, apresentando massa molecular de aproximadamente 35 kDa por subunidade, conectadas principalmente por forças não-covalentes. A L-asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* foi caracterizada como tetrâmero com 330 aminoácidos em cada monômero, com massa molecular entre 140 a 150 kDa. A enzima de *E. chrysanthemi* apresentou semelhança estrutura a de *E. coli*, diferenciando pela afinidade por seus substratos (Stecher et al., 1999; Aghaiypour et al., 2001). Saeed e colaboradores (2018), em estudo identificaram a L-asparaginase recombinante de *Aspergillus terreus* em *E. coli* como homotetrâmero com massa molecular de 42 kDa, 376 aminoácidos codificados e ponto isoelétrico de 5,0. Em discussão Aghaiypour et al. (2001), defendeu a observação de semelhança estrutural entre as L-asparaginase de diferentes bactérias e variação nas suas características cinéticas e termodinâmicas.

Como mencionado na estratégia do uso de L-asparaginase, a presença da enzima L-asparaginase diminui a concentração na corrente sanguínea de L-asparagina e as células tumorais dependem do fornecimento exógeno de asparagina provocando a morte seletiva das células neoplásicas, como ilustrado na Figura 2. (Heinemman e Howard, 1969). No entanto, as células saudáveis não sofrem com o efeito da depleção devido a síntese de L-asparagina pela asparagina sintetase.

A reação de hidrólise realizada pela enzima L-asparaginase esgota rapidamente os níveis de L-asparagina presentes no corpo. Sendo assim, a resposta ao tratamento com a L-asparaginase é positiva, visto que as células neoplásicas dependem de uma oferta extracelular do aminoácido pela incapacidade de garantir seu próprio fornecimento de asparagina (Muller e Boss, 1998). A deficiência de asparagina interfere na síntese de proteínas com consequente deterioração da função celular e apoptose das células neoplásicas (Heinemman e Howard, 1969).

No mercado, as formulações de L-asparaginase já disponibilizadas são derivadas de *Escherichia coli* na forma nativa e peguilaada, essa última possui ligação covalente com polietilenoglicol para aumento da biodisponibilidade, e de *Erwinia chrysanthemi*. A Tabela 1 lista as formas clínicas já disponibilizadas de L-

asparaginase no mercado mundial, dessas a L-asparaginase de *E. coli* é a mais aplicada no tratamento de LLA.

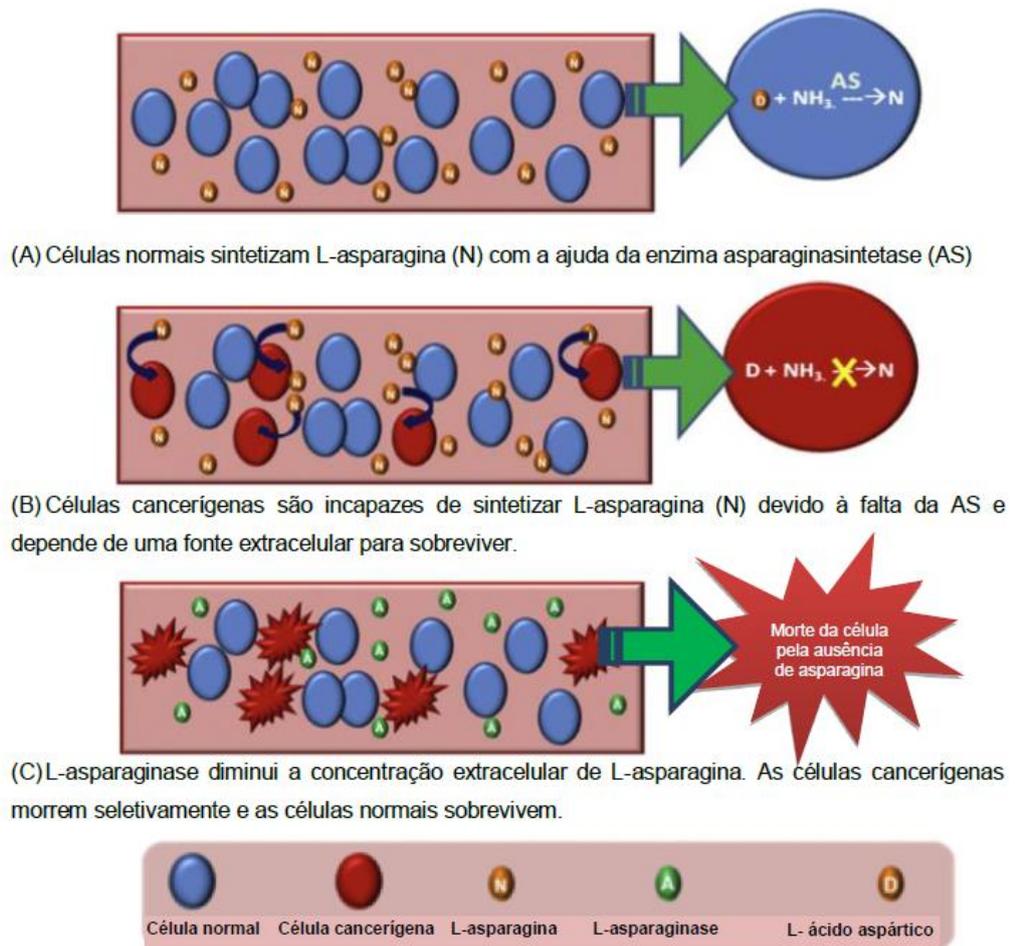


Figura 2: Mecanismo de ação da L-asparaginase (Shrivastava et al., 2015)

Tabela 1: Formas clínicas de L-asparaginase.

Fonte	Nome Comercial	Empresa farmacêutica / País
	Kidrolase	EUSA Pharama / Reino Unido
	Elspar	Merck Sharp & Dohme / EUA
<i>Escherichia coli</i>	Crasnitin	Bayer AG / Alemanha
	Leunase	Sanofi-Aventis / França
	Asparaginase Medac	Kyowa Hakko Kirin / Japão
	Leuginase	Bejin SL Pharmaceutical / China
	Spectrila	Medac Pharma / EUA
<i>Escherichia coli</i> – Asparaginase peguilada	Oncaspar	Sigma-Tau Pharmaceuticals / Moldóvia
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Erwinase	EUSA Pharama / Reino Unido

Fonte: Kumar e Sobha (2012), adaptado e atualizado.

No Brasil, até 2013 os hospitais adquiriam o medicamento Elspar para o tratamento de LLA. Mas no fim de 2012, a Lundbeck (Deerfield, USA) anunciou a descontinuação da fabricação do medicamento por alegar insustentabilidade mercadológica. Por esse motivo, o medicamento Elspar deixou de ser fornecido ao país. Até o ano de 2014, os hospitais foram abastecidos com o medicamento Asparaginase Medac. Mas por esse não responder às solicitações para registro definitivo no Brasil, foi aberta novo processo de compra em 2017. Nesse ano, em caráter excepcional o Ministério da Saúde importou Leuginase, cujo fornecedor foi o único a apresentar Registro Sanitário e Manual de Boas Práticas de fabricação no país de origem, além de oferecer menor preço do medicamento (Ministério da Saúde, 2017). Em junho de 2017, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização da Oncaspar® pela empresa Baxalta Brasil Biociência LTDA, e a solução injetável de L-asparaginase peguilada está disponível no Brasil até 2022. Diante do histórico brasileiro de abastecimento, observa-se uma lacuna de produção nacional da enzima e no registro junto à ANVISA. E, desperta-se a iniciativa e interesse na busca por desenvolvimento tecnológico nacional para a produção de L-asparaginase.

As formulações clínicas utilizadas para o tratamento de LLA são de origem bacteriana, possuem o mesmo mecanismo de ação e diferem nas características farmacocinéticas. A terapia parenteral com essas formulações de L-asparaginase frequentemente está associada à ocorrência de reações adversas e toxicidade (Shrivastava et al., 2012). As principais toxicidades associadas ao uso de L-asparaginase podem estar relacionadas ao mecanismo de hipersensibilidade e à sua inibição de síntese proteica (Keating, et al., 1993).

Em uma revisão, Hijjiya e Van der Sluis (2016) apontaram as reações adversas associadas ao uso de L-asparaginase como: hipersensibilidade (clínica e subclínica), hiperglicemia, mielossupressão, pancreatite, trombose, hipertrigliceridemia, encefalopatia e disfunção hepática (Hijjiya e Van der Sluis, 2016). Além dessas reações podem ser identificadas: toxicidade de órgãos, glicosúria, cetoacidose, síntese proteica diminuída, hipoalbuminemia, hipofibrinonemia, estado hipercoagulável – coagulopatias e alteração de fatores de coagulação (Avramis, 2012).

A ocorrência de encefalopatia e hepatotoxicidade observadas durante o tratamento parecem estar relacionadas com a liberação da amônia no sangue a partir da hidrólise da L-Asparagina, catalisada pela L-Asparaginase. Já os sintomas de neurotoxicidade podem estar associados ao o aspartato, produto da hidrólise L-asparagina, e incluem depressão, fadiga, sonolência, confusão, irritabilidade, agitação e tontura. A hipersensibilidade clínica é a toxicidade associada à L-asparaginase mais frequente, observa-se essa frequência ocorrendo em 5-50% dos pacientes tratados. As manifestações clínicas das reações de hipersensibilidade incluem reações alérgicas, edema, broncoespasmo, urticária, erupção cutânea, eritema, prurido e inchaço das extremidades, anafilaxia (rara). A presença de hipersensibilidade é caracterizada pelo desenvolvimento de anticorpos anti-asparaginase e reduz significativamente os níveis de atividade da L-asparaginase. Nessa situação, pode requerer descontinuação do tratamento (Keating, et al., 1993; Loureiro, 2010; Avramis, 2012; Hijjiya e Van der Sluis, 2016).

O principal fator limitante ao uso das preparações clínicas de L-asparaginase está relacionado ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidade. A imunogenicidade no uso terapêutico da enzima como medicamento biológico pode estar relacionado ao tamanho da molécula. A L-asparaginase II de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* foram identificadas como tetrâmeros representando alta massa

molecular (Stecher et al., 1999; Aghaiypour et al., 2001). Com isso, estudos têm sido motivados na identificação de moléculas menores com a finalidade de reduzir as reações imunogênicas e tóxicas.

Ainda quanto ao cenário de reações adversas provenientes do medicamento produzido por organismo procarioto, uma das abordagens é o interesse para a produção de L-asparaginase de origem por organismo eucarioto. Sendo assim, um dos objetivos pela busca de possibilidade em diminuir as reações adversas, uma vez que se aproxima das características humanas.

2.3 Fungos filamentosos produtores de asparaginase

O reino Fungi é constituído por um grupo de organismos eucariotos, unicelulares ou pluricelulares, heterotróficos, encontrados em diversos tipos de ambientes. No planeta, o número hipotético para fungos é cerca de 500 mil a 5 milhões de espécies, porém apenas cerca de 110.000 espécies foram descritas até 2014 (Wasser, 2014).

Os fungos filamentosos são organismos metabolicamente ativos e, por isso, são usados como fontes celulares para a produção de uma variedade de enzimas e metabólitos. Como fonte de compostos bioativos, diversas espécies de fungos são conhecidas e as pesquisas que visam o isolamento desses produtos são expressivas em todo o mundo (Sun et al., 2011). Desses bioativos, destacam-se as enzimas, como amilase, aminoglicosidase, celulase, fitase, β -galactosidase glicooxidase, lacase/lignase, lipase, pectinase e protease (Ward, 2012; Cardoso, et al. 2017).

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos filamentosos representam grande importância na terapêutica humana. Dentre os metabólitos de origem fúngica de relevância farmacêutica destacam-se: alcaloides do Ergot para tratamento de enxaqueca; celalosporina, griseofulvina e penicilina, com aplicação antimicrobiana; ciclosporina como imunossupressor; lovastatina com hipocolesterolêmico; e, taxol utilizado em tratamento de câncer de mama e ovário. Como fonte de metabólitos com alto valor terapêutico, os gêneros que apresentam relevância são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Fusarium* (Bennet, 1998; Meyer, 2008; Ward, 2012).

Na indústria de alimentos, o uso de leveduras e fungos filamentosos apresenta-se com grande potencial em uso, visto o fator positivo de se tratarem de microorganismos GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e de fácil manipulação e

cultivo. Nesse ramo alimentício, em 2014 foi desenvolvida uma formulação com composição de L-asparaginase de origem fúngica, sob a marca Acrylaway® (Novozymes®), voltada exclusivamente para uso em alimentos. Esse preparo enzimático disponível no mercado, a partir de L-asparaginase extracelular clonada e expressa em *Aspergillus oryzae*, tem a proposta de reduzir os níveis de acrilamida em diversos alimentos industrializados (Hendriksen et al., 2009).

Desde a introdução da L-asparaginase no mercado, as formulações desenvolvidas foram obtidas de origem bacteriana, principalmente de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi*. Essas preparações terapêuticas de origem procariota têm apresentado efeitos adversos imunológicos e anafilaxia, bem como também identificado no tratamento inativação enzimática. Diante dessas situações provenientes de uso, despertou-se o interesse para estudos na procura pela produção de L-asparaginase por microorganismos eucariotos com finalidade de diminuir as reações adversas aos seres humanos (Lopes et al., 2017).

Portanto, a enzima proveniente de um ser eucarioto pode possuir menos reações adversas identificadas pelo uso do medicamento L-asparaginase (Shrivastava et al., 2012). Partindo desse pressuposto de aplicação clínica e sua consolidada aplicação na indústria de alimentos, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de identificar, produzir e caracterizar a enzima L-asparaginase a partir do cultivo de fungos.

Vários fungos filamentos já foram descritos como produtores de L-asparaginase. Dentre as espécies produtoras, destacam-se as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (Imada et al., 1973; Gulati et al. 1997; Mohan e Manonmani, 2013). Sarquis et al. (2004) em estudos com duas espécies de *Aspergillus*, destacaram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus terreus* obtida à 58 U/L. Saeed et al. (2018) trabalharam com a clonagem com o gene de L-asparaginase recombinante de *Aspergillus terreus* em *E. coli*, modelagem estrutura e obteve produção enzimática de 4,81 U/mg de proteína. Patro e Gupta (2012), em trabalho de purificação da enzima L-asparaginase a partir de cultivo submerso em pH 7,0 a 37 °C por uma espécie de *Penicillium* atingiu atividade de 13,97 UI/mg. Também em cultivo submerso, por *Cladosporium* sp., a produção de L-asparaginase foi de 83,3 U/mg e a enzima apresentou atividade ótima em pH 6,3 a 30 °C (Kumar e Manonmani, 2013). Espécies de *Fusarium*, *F. semitectum* e *F.*

moniliforme apresentaram produção da enzima, na melhor condição nutricional, de 404,0 e 376,0 UI/mL, respectivamente (Tippani e Sivadevuni, 2012).

A produção de L-asparaginase por fungos, em concordância com as demais enzimas, é influenciada pela composição do meio de cultivo. A regulação da produção de enzimas por microorganismos não depende apenas de fatores genéticos intrínsecos de cada espécie, mas também por parâmetros físicos e disponibilidade de nutrientes (Gurunathan e Sahadevan, 2012, Kavanagh, 2017).

Diante dessa premissa de influência dos fatores nutricionais, diversos estudos foram conduzidos para avaliar e identificar a resposta da produção de L-asparaginase sob efeito de alguns parâmetros. Com o cuidado na manutenção dos fatores nutricionais, Shrivastava e colaboradores (2012) produziram L-asparaginase a partir da espécie *Penicillium digitatum*, utilizando o meio Czapek Dox modificado (CDM) composto por glicose 2 g/L, L-Asparagina 10 g/L, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,52 g/L, KCl 0,52 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,52 g/L, traços de $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em pH 6,2 (Shrivastava et al., 2012). A partir de meio de cultura semelhante e utilizando Desing Composto Central foi realizada a otimização da produção de L-asparaginase pela espécie *Aspergillus terreus* com 43,29 UI/mL. As variáveis utilizadas para otimização da produção enzimática nesse estudo foram temperatura, pH inicial, tamanho do inóculo, taxa de agitação e tempo de incubação (Gurunathan e Sahadevan, 2012). Sarquis et al. (2004) utilizaram o meio CDM por espécies *A. terreus* e *A. tamarii*, e a partir da variação das fontes de nitrogênio (L-asparagina, L-prolina, ureia e glutamina), avaliaram a produção da enzima. (Sarquis et al., 2004). Tippani e Sivadevuni (2012) desenvolveram o trabalho de avaliação das exigências nutricionais para a produção de L-asparaginase por três espécies de *Fusarium*. Nesse estudo, as fontes de carbono verificadas foram lactose, sacarose, frutose, glucose, sorbitol, manitol, galactose, manose e ácido cítrico; e nitrato de potássio, nitrato de sódio, ureia, tioureia, lisina, L-alanina, L-asparagina e L-prolina como fontes de nitrogênio (Tippani e Sivadevuni, 2012). O fungo *Penicillium cyclopium* foi material de estudo referente a otimização estratégica da produção de L-asparaginase usando primeiro a aplicação do design Plackett–Burman e posteriormente Desing Composto Central, analisando a influência por fontes de carbono, nitrogênio, sais e tempo de cultivo (El-Refai et al., 2014). Aida e colaboradores (2015) com finalidade de otimizar a produção de L-asparaginase a partir de isolados do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*,

utilizaram o design experimental Plackett–Burman para estudar as condições de cultivo, quanto a fatores nutricionais e tamanho do inóculo.

2.4 Gênero *Penicillium*

Dentre os fungos comumente isolados do solo, de um modo geral destacam-se as espécies de *Penicillium*. O gênero *Penicillium* é cosmopolita, a maioria das espécies são sapróbias com pouca exigência nutricional, toleram ambientes secos e quentes, bem como úmidos e frios. Essas características conferem a capacidade de crescerem em diversos ambientes, onde existam quantidades mínimas de sais minerais, ou, nas mais diversas e complexas fontes de carbono orgânico (Pitt, 1991).

O gênero *Penicillium* foi descrito em 1809 por Link, propondo esse nome, do Latim *Penicillius* por observar que espécies do gênero produzem os conidióforos em forma de pincel (Raper e Thom, 1949). O gênero *Penicillium* foi classificado pertencente ao filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales*, família *Aspergillaceae*. Esse gênero compreende 304 espécies descritas (Kirk et al., 2008).

Em espécies de *Penicillium*, microscopicamente (Figura 3) observam-se hifas septadas com paredes desprovidas de pigmentação; os conidióforos surgem como ramos do micélio e frequentemente perpendiculares ao substrato. A estrutura do conidióforo consiste de um estipe que pode ser estreito ou alargado, parede delgada ou espessa, lisa ou finamente à fortemente rugosa. No ápice do estipe surge o “*Penicillus*”, que pode consistir de fiálides, essas células conidiogênicas podem incidir diretamente no estipe ou em células de apoio denominadas métulas e ramos. Algumas espécies de *Penicillium* apresentam ramificação adicional, denominada râmulo, localizada entre o ramo e a métula (Onions e Brady, 1987; Pitt, 1991). Os conídios são unicelulares, uninucleados, hialinos, pequenos, com formas globosas a cilíndricas, a parede pode ser lisa, rugosa, fortemente rugosa ou espinescente. Algumas espécies produzem esclerócios, estruturas multicelulares de resistência que podem permanecer latentes por longos períodos até as condições do meio se tornarem propícias ao seu desenvolvimento (Silva, 2013).

As características das colônias, macroscopicamente, são geralmente a formação do micélio em abundância e com coloração verdes, verde-amarelas, verde-azuladas, verde-acinzentadas, ou menos frequentemente incolores, brancas, salmon, avermelhadas, amarelo-arroxeadas, ou de outras tonalidades. O reverso das colônias pode ser incolor, ou variar de tons de marrom, amarelo, verde e vermelho. Os isolados

de algumas espécies podem produzir pigmentos que modificam a tonalidade do meio de cultura, também, produzir gotas de exudato de coloração diversa. Os exudatos são visualizados macroscopicamente e considerados como critérios para fins taxonômicos (Silva, 2013).

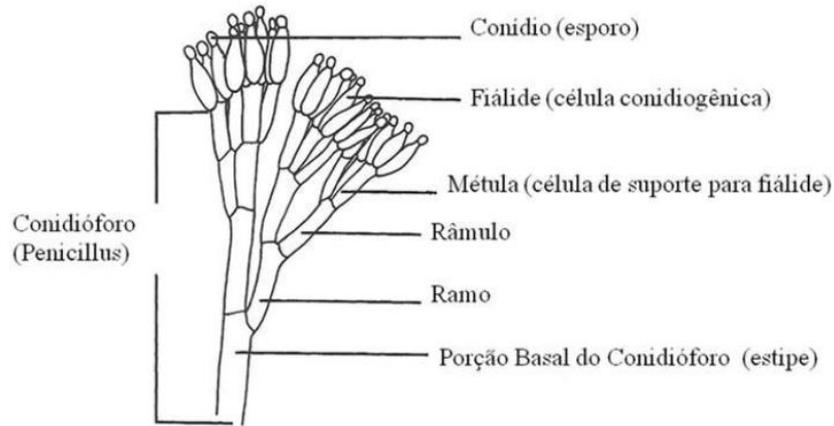


Figura 3: Conidióforo (“Penicillus”). Fonte: Onions e Brady (1987).

Devido à grande variabilidade inerente ao gênero e ao grande número de espécies descritas, taxonomia de *Penicillium* é bastante complexa, sendo difícil a distinção entre algumas espécies apenas pela caracterização morfológica. A dificuldade encontrada na identificação das espécies de *Penicillium* com base na morfologia torna necessário o uso de ferramentas mais modernas, como a microscopia eletrônica de varredura e a biologia molecular complementando a taxonomia clássica (Samson e Frisvad, 2004).

O gênero *Penicillium* tem extrema relevância na natureza, pois a maioria de suas espécies atua ativamente na degradação da matéria orgânica (Pitt, 1991). Além dessa importância ambiental, as espécies de *Penicillium* possuem amplo potencial biotecnológico, sendo utilizados seus metabólitos secundários na produção de enzimas de interesse industrial, ambiental, farmacêutico e alimentício (Bon et al., 2008).

Em 1960, Singh e Martins purificaram e descreveram propriedade de uma protease por *P. cyaneo-fulvum*. Stefano e colaboradores (1999) identificaram a secreção de metabólito antifúngico, 3-o-Methyfunicone, por *P. Pinophilum* para inibição do crescimento de *Rhizoctonia solani*. Chellegatti e colaboradores (2000) identificaram pectinases por *P. frequentans* no crescimento em meio com pectina. Rehman et al. (2017) apresentaram atividades catalíticas melhoras de lipase

extracelular por *P. notatum*. Antoine et. al. (2009) relataram a produção de xilanase por *P. canescens* em fermentação em estado sólido e em 2019 três isoformas de xilanase foram identificadas por Ullah e colaboradores por *P. chrysogenum*. Em outro estudo (Aktuganov et al., 2019), foi identificado, purificado e caracterizado o exo- β -1,4-glicosaminidase de uma espécie de *Penicillium*.

Da mesma forma, o gênero *Penicillium* recebe destaque nos estudos de produção da enzima L-asparaginase. Algumas espécies pertencentes ao gênero empregadas na produção de L-asparaginase estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1: Espécies do gênero *Penicillium* produtoras de L-asparaginase.

Espécie	Autor	Espécie	Autor
<i>Penicillium aculeatum</i>	Imada et al, 1973	<i>P. expansum</i>	Imada et al, 1973
<i>P. brevicompactum</i>	Elshafei, et al, 2012	<i>P. granulatum</i>	Imada et al, 1973
<i>P. chrysogenum</i>	Gulati et al, 1997;	<i>P. nelicum</i>	Gulati et a., 1997
<i>P. citrinum</i>	Yadav, 2014	<i>P. nigricans</i>	Gulati et a., 1997
<i>P. claviforme</i>	Imada et al, 1973	<i>P. olsonii</i>	Alhussaini, 2013
<i>P. cyclopium</i>	El-Refai, 2014	<i>P. simplicissimum</i>	Chow, 2015
<i>P. digitatum</i>	Shrivastava, 2012	<i>P. urticae</i>	Imada et al, 1973

Em trabalhos com fungos endofíticos do gênero *Penicillium* recebeu condição equivalente de destaque. Silva e colaboradores (2018), identificaram 10 isolados endofíticos de *Tillandsia catimbauensis* com potencial na produção de L-asparaginase. Desses isolados endofíticos, destacou-se *Penicillium* sp. 4 URM 7827 apresentando atividade enzimática de 1,28 U/g_{células}. Outro grupo (Pádua et al., 2018), em estudo similar identificou uma espécie de *Penicillium*, dentre isolados endofíticos das folhas de *Myracrodruon urundeuva*, produtora de L-asparaginase com atividade enzimática de 0,70 U/g_{células}.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo caracterizar morfo-molecularmente o isolado DCFS6, espécie do gênero *Penicillium*, do solo do bioma Cerrado Centro-Oeste brasileiro, e avaliar a sua produção da enzima L-asparaginase.

3.2 Objetivos específicos

Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Realizar a caracterização da espécie DCFS6 por biologia molecular a partir de regiões gênicas conservadas;
- Realizar a caracterização da espécie DCFS6 por métodos morfológicos da taxonomia clássica;
- Identificar a espécie DCFS6 por análise filogenética concatenada por Inferências Bayesianas;
- Identificar o gene do isolado DCFS6 que expressa a enzima L-asparaginase;
- Avaliar a influência de variáveis na produção da enzima L-asparaginase pelo isolado DCFS6 a partir de planejamento experimental;
- Otimizar a produção de L-asparaginase pelo isolado DCFS6 em meio líquido por planejamento experimental.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo de meio de cultivos e soluções

- Tampão Tris-HCl 50 mM

Foi pesado 3,035 g de Tris-HCl em 500 mL de água destilada e ajustado o pH para 8,6 com HCl 1,0 M.

- Solução de L-asparagina 0,1 M

Foi pesado 0,132 g de L-asparagina (A0884; Sigma) em 10 mL de água destilada.

- Solução de hidroxilamina 1M

Inicialmente foi preparado a solução estoque de cloridrato de hidroxilamina 2 M, mantida a 5° C – denominada Solução A. Também foi preparado uma solução estoque de hidróxido de sódio 2 M – denominada Solução B.

Para o preparo da solução 1 M de hidroxilamina foi misturada a solução A com solução B na proporção de 1:1, sendo a mistura final com pH próximo de 7,0. Esta solução de hidroxilamina neutralizada é instável, portanto, a preparação foi neutralizada no momento do uso.

- Solução de Cloreto Férrico / TCA / HCl

Inicialmente foi pesado 10g de cloreto férrico e solubilizada a 100mL de água purificada – denominada solução C. O cloreto férrico tem característica fotossensível então foi manipulado sob a proteção de luz. Posteriormente foi preparada a solução D contendo 7mL de HCl 37% e 20mL de TCA 6,1M solubilizados a 100mL de água purificada. Ao final a solução C foi adicionada à solução D e armazenada em frasco âmbar sob refrigeração.

- Solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM

Foi pesado 7,4 mg de β -hidroxamato aspártico (Sigma) em 10mL de água ultrapurificada.

- Solução TAE 50X

Para o preparo da solução TAE 50X foi dissolvido 242 g de Tris base em 500 mL de água destilada. Logo após solubilização foi adicionado 57,1 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 500 mM e completado o volume para 1 L com água destilada, com auxílio de balão volumétrico. A solução foi armazenada em temperatura ambiente.

- Meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA)
Foi pesado 39 g Ágar batata dextrose (Himedia®) em 1000 mL de água destilada.
- Meio de cultivo ágar Sabouraud dextrose (SDA)
Foi pesado 65 g ágar Sabouraud dextrose (Acumedia®) em 1000 mL de água destilada.
- Meio de cultivo extrato de malte (MEA)
Foi pesado 20 g ágar e 20 g extrato de malte (Acumedia®) em 1000 mL de água destilada.
- Meio Czapek Dox modificado (Baskar et al. 2012)

L-prolina	1,71 %
L-asparagina	1,38 %
NaNO ₃	1,99 %
Glicose	0,65 %
K ₂ HPO ₄	0,0152 %
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,052 %
KCl	0,052 %
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,001 %
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,001 %
CuSO ₄ .7H ₂ O	0,001 %
Ajustar pH para 6,5 com KOH 5M	

4.2 Preservação do fungo

O fungo selecionado encontra-se depositado na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5.

O fungo selecionado foi mantido e preservado pelo método do congelamento a - 80 °C (UltraFreezer Panasonic - 80°C). A solução contendo glicerol e tween 80, utilizada no armazenamento fúngico, foi preparada a partir da dissolução de 0,9 g de cloreto de sódio (NaCl) em 50 mL de água purificada. Após a completa dissolução, foram acrescentados a mistura salina 50 mL de glicerol e 0,2 mL de tween 80. A

solução foi fracionada em criotubos (1,0 mL) e autoclavada durante 20 minutos a 121 °C.

4.3 Preparação do inóculo

O fungo isolado, previamente armazenado em glicerol a – 80 ° C, foi reativado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), a 25 ± 2 °C, durante cerca de sete dias ou até seu completo crescimento. Discos de cinco mm de micélio foram utilizados nos testes para a produção da enzima em meio líquido.

A pureza genética foi obtida pela repicagem monohifal do isolado. Após o crescimento em meio ágar-água (AA) por 24 horas, foi removida uma pequena porção da extensão marginal de uma hifa individual, com auxílio de uma agulha previamente esterilizada, e transferida para uma nova placa de Petri contendo meio extrato de malte-ágar (MEA) (Alfnas e Mafia, 2016).

4.4 Condições de cultivo

O cultivo em meio líquido para o isolado DCFS6 foi realizado em frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido suplementado (m/v). Os meios foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

O cultivo em meio líquido juntamente com o inóculo foi realizado a 30°C e agitação constante de 120 rotações por minuto (rpm) por 4 dias. Após o cultivo, o meio foi filtrado em funil do tipo Büchner com papel de filtro (Whatman n°1) e a biomassa armazenada a – 20 °C.

4.5 Liberação da enzima L-asparaginase

4.5.1 Maceração

O meio de cultivo utilizado nessa etapa foi Czapek Dox modificado (CDM), inoculado em duplicata 5 mm de diâmetro do fungo DCFS6 em 50 mL desse meio em frasco Erlenmeyer de 25 mL esterilizado, e incubado a 30 °C em agitador a 120 rpm por 4 dias.

O processo de liberação da enzima consistiu em macerar com auxílio de gral e pistilo de porcelana a biomassa até obtenção de um pó fino e congelada por 24 h à – 80 °C. Esta etapa objetivava o rompimento da membrana fúngica para exposição ao meio externo da enzima em estudo.

Após maceração, foi determinado adicionar o dobro em volume de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6 a partir da massa de biomassa crescida (1:2 m/v). Logo após, mantida em vortex por 1 minuto e centrifugada por 5 minutos a 4°C em 3.000 g, com objetivo que colher apenas o sobrenadante contendo a enzima em estudo com a menor interferência da biomassa. A quantificação de L-asparaginase foi determinada em triplicata como descrito no item 4.7.

4.6 Quantificação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais pelo método de BCA (ácido bicinconínico) (Smith et al., 1985). Nesta análise, foi usado o Kit de BCA *Pierce Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, USA). Como padrão foi utilizado soro albumina bovino (BSA) em diferentes concentrações finais (2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 25 e 0 µg/mL). A dosagem de proteínas totais foi expressa em µg/mL. Este método tem detecção sensível até 5 µg / mL de proteína com o uso aprimorado do protocolo.

4.7 Determinação da atividade enzimática

A atividade de L-asparaginase pode ser determinada pela quantificação do β-hidroxamato aspártico produzido pela reação de hidroxilaminolise efetuada pela enzima L-asparaginase na presença de hidroxilamina (Figura 4).

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o método fundamentado na formação de β-hidroxamato aspártico a partir de asparagina e hidroxilamina (Drainas, C.; Kinghorn; Pateman, 1977), com modificações, descrito abaixo.

A mistura da reação foi constituída de 1,5 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6; 0,2 mL de L-asparagina 100 mM; 0,2 mL de hidroxilamina 1M pH 7,0; e 0,10 g de amostra de micélio pesado em balança analítica de pesiçãõ (Shimadzu). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos sob agitação a 0,12 g, e foi interrompida com a adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico/TCA/HCl. Após esse período de incubação as amostras foram centrifugadas a 4 °C em 3.000 g por 5 minutos e com 1,0 mL do sobrenadante em cubeta foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu) a 500nm. A reação entre o hidroxamato aspártico produzido e o FeCl₃ produz cor avermelhada que absorve em comprimento de onda de 500 nm.

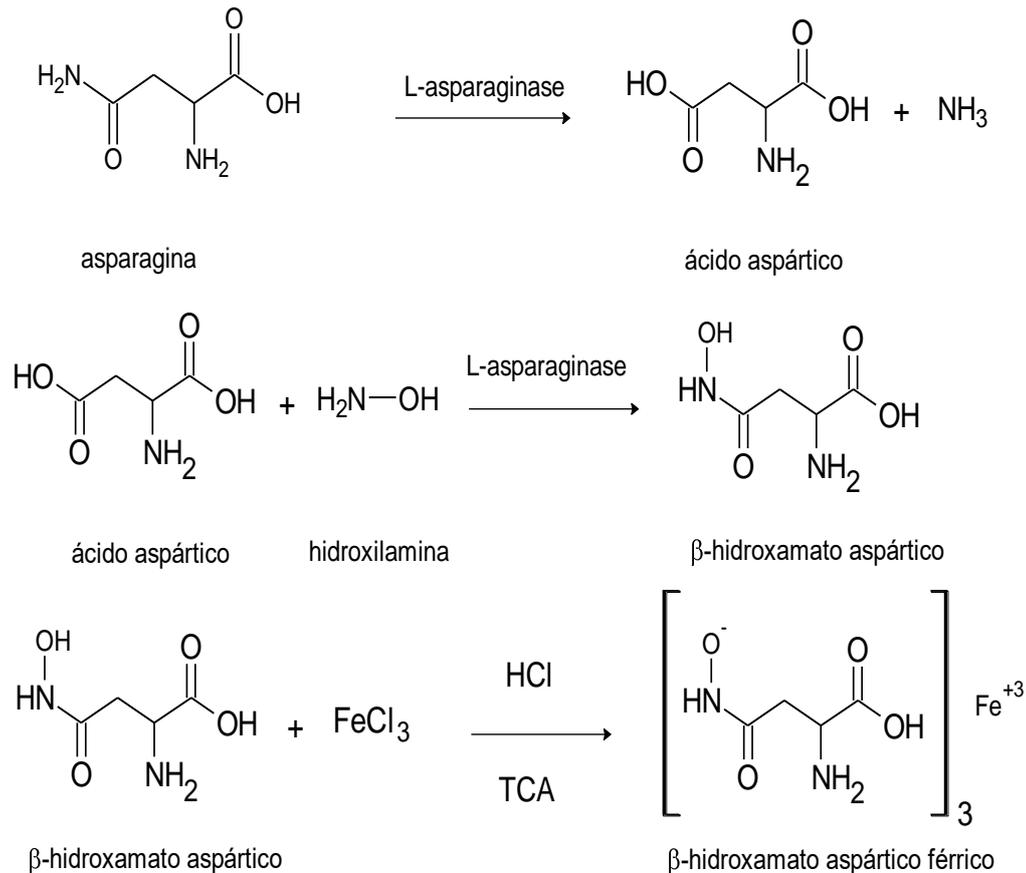


Figura 4: Mecanismo de reação da asparagina e hidroxilamina mediado pela L-asparaginase para a formação do complexo β-hidroxamato aspártico férrico.

Quando a amostra estava previamente tratada, por método para liberação da enzima, a determinação da atividade enzimática ocorreu com 0,5 mL de amostra, 1,1 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6 e sem agitação, obedecendo as demais condições do ensaio descritas no parágrafo anterior.

Para todas as determinações da atividade enzimática as amostras foram verificadas em triplicata. Foi preparado o branco da amostra onde o volume de L-asparagina e da solução de hidroxilamina foi substituído pelo mesmo volume em tampão Tris HCl 50 mM pH 8,6. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar um μmol β-hidroxamato aspártico por minuto por grama de células da amostra (U/g_{células}), calculada conforme a equação a seguir.

$$\frac{U}{g} \text{ de ASPase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume de amostra})(\text{tempo da reação})} \right]$$

$$\frac{U}{g} \text{ de ASPase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(0,1 \text{ g})(30 \text{ min})} \right]$$

A curva padrão foi construída com a solução padrão de β -hidroxamato aspártico 5 mM (Sigma) em diferentes massas de 0,1 a 3,0 μmol (Figura 5). O preparo das soluções da curva padrão está descrito no Quadro 2.

Quadro 2: Preparação das soluções padrão para o método de β -hidroxamato aspártico.

Solução padrão	Moles (μmol)	β -hidroxamato aspártico 5 mM (μL)	Tampão Tris-HCl pH 8,6 (20 mM) (mL)	Cloreto férrico/TCA/HCl (mL)
Branco	0,0	0	2,000	0,50
Padrão 1	0,1	20	1,980	0,50
Padrão 2	0,25	50	1,950	0,50
Padrão 3	0,50	100	1,900	0,50
Padrão 4	0,75	150	1,850	0,50
Padrão 5	1,0	200	1,800	0,50
Padrão 6	1,5	300	1,700	0,50
Padrão 7	2,0	400	1,600	0,50
Padrão 8	3,0	600	1,400	0,50

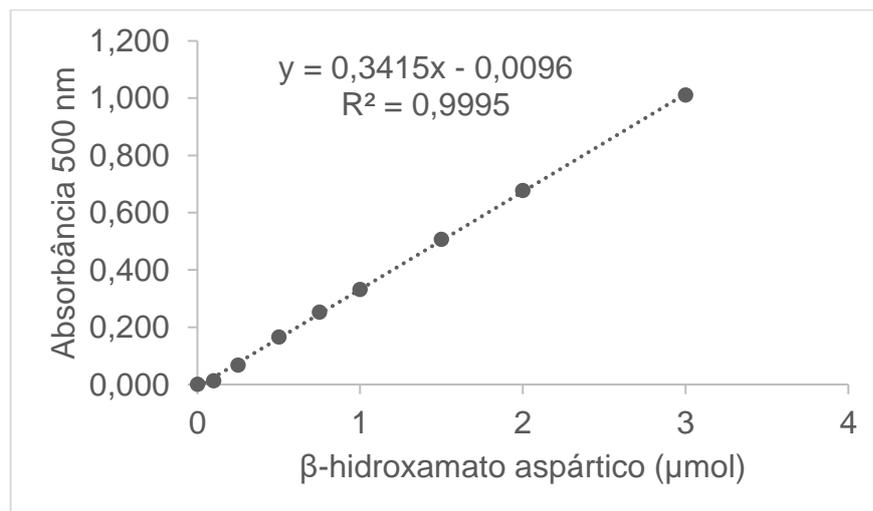


Figura 5: Curva padrão em μmol de β -hidroxamato aspártico.

4.8 Planejamento experimental para a produção de L-asparaginase

4.8.1 Plackett-Burman Design (PBD)

Inicialmente foi realizado planejamento experimental segundo Plackett-Burman (Plackett e Burman, 1946) objetivando a otimização do meio na produção de L-asparaginase pelo isolado DCFS6. Esse método fornece indicações iniciais de como cada variável tende a influenciar (Yu et al., 1997) a produção da enzima e consiste em uma etapa intermediária de orientação para o delineamento final (Rodrigues e lemma, 2014).

O projeto multifatorial foi estabelecido com 11 variáveis independentes. As variáveis e os níveis escolhidos foram baseados nas diversas fontes de carbono e nitrogênio e sais avaliados em trabalho de otimização de cultivo para a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos, como nos trabalhos conduzidos por Baskar et al. (2012), El-Refai et al. (2014) e Farag et al. (2015). As variáveis independentes selecionadas para avaliação dos seus efeitos sobre a produção de L-asparaginase foram L-asparagina (X_1), L-prolina (X_2), ureia (X_3), nitrato de sódio (X_4), extrato de levedura (X_5), sulfato de amônio (X_6), peptona (X_7), glicose (X_8), sacarose (X_9), extrato de malte (X_{10}) e cloreto de potássio (X_{11}). Os níveis superiores (+1) e inferiores (-1) de cada variável independente foram analisados (Tabela 2) e o ensaio do ponto central foi realizado em triplicata.

A matriz de delineamento de Plackett-Burman utilizada foi do tipo 2^K , K fatores em 2 níveis, considerando o número de corridas com $N = 4t$, onde t é um número inteiro. A matriz foi construída para 16 ensaios considerando o número mínimo de 4 ensaios a mais do que o número de variáveis em estudo, permitindo um grau de liberdade para cálculo do erro padrão (Rodrigues e lemma, 2014). A matriz do desenho experimental e a análise de variância (ANOVA) foram determinadas pelo software *Protimiza Experimental Design* (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>) com 16 combinações das 11 variáveis, totalizando 19 corridas contando com a triplicata do ponto central. Após o preparo de cada corrida acrescentados ao meio mínimo (K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) totalizando 50 mL em Erlenmeyer e seguindo os cuidados de preparo de cultivo, um disco de 5 mm de diâmetro do micélio do isolado foi inoculado e incubado a 30 °C a 120 rpm por 4 dias. Após isso, as culturas foram filtradas e o micélio utilizado para ensaio enzimático de L-asparaginase, como descrito no item 4.7. Na análise de variância, seguindo o

objetivo de screening do delineamento Plackett-Burman, o nível de significância fixa foi de 10 % ($p < 0,1$), minimizando o risco de excluir algum fator importante para o processo da etapa seguinte (Rodrigues e lemma, 2014).

Tabela 2: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental Plackett-Burman para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1 (%)	0 (%)	+1 (%)
L-asparagina	X_1	1	2	3
L-prolina	X_2	1	2	3
Ureia	X_3	0,1	0,3	0,5
Nitrato de sódio	X_4	1	1,75	2,5
Extrato de levedura	X_5	0,1	0,3	0,5
Sulfato de amônio	X_6	0,5	1	1,5
Peptona	X_7	1	1,5	2
Glicose	X_8	0	0,1	0,2
Sacarose	X_9	0	0,1	0,2
Extrato de malte	X_{10}	0,5	1,25	2
Cloreto de potássio	X_{11}	0,01	0,0175	0,025

4.8.2 Delineamento Fatorial Fracionado (DFF)

O Delineamento Fatorial Fracionado (DFF) é um tipo de metodologia utilizada em análises em que muitos fatores são considerados, com a finalidade de se identificar aqueles fatores que possuem grandes efeitos. Delineamento dessa ordem tem utilidade nos experimentos que antecedem ao experimento final considerando os efeitos principais e sobre as interações de primeira ordem (Rodrigues e lemma, 2014).

A partir dos resultados no planejamento experimental por PBD foi desenhado um novo experimento por DFF, com finalidade de otimizar o meio de cultivo na produção de L-asparaginase pelo isolado DCFS6. As variáveis independentes com efeito positivo pelo planejamento experimental PBD foram consideradas para o planejamento por DFF. Essas oito variáveis consideradas foram L-prolina (X_1), peptona (X_2), sacarose (X_3), ureia (X_4), sulfato de amônio (X_5), extrato de levedura

(X_6), glicose (X_7) e L-asparagina (X_8). Os níveis superiores (+1) e inferiores (-1) de cada variável independente foram analisados conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental DFF para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1 (%)	0 (%)	+1 (%)
L-prolina	X_1	3	4	5
Peptona	X_2	2	3	4
Sacarose	X_3	0,2	0,6	1
Ureia	X_4	0,5	1,25	2
Sulfato de amônio	X_5	0,5	1,25	2
Extrato de levedura	X_6	1,5	2	2,5
Glicose	X_7	0,2	0,6	1
L-asparagina	X_8	3	4	5

A matriz do desenho experimental DFF e a análise de variância (ANOVA) foram determinadas pelo software *Protimiza Experimental Design* (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>) em um desing fatorial 2^{8-4} . O experimento consistiu em 16 combinações das 8 variáveis e 4 replicas do ponto central, totalizando 20 corridas. Após o preparo de cada corrida acrescidos ao meio mínimo (K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) totalizando 50 mL em Erlenmeyer e seguindo os cuidados de preparo de cultivo, um disco de 5 mm de diâmetro do micélio do isolado foi inoculado e incubado a 30 °C a 120 rpm por 4 dias. Após isso, as culturas foram filtradas e o micélio utilizado para ensaio enzimático de L-asparaginase, como descrito no item 4.6. Na análise de variância, seguindo o objetivo de screening do DFF, o nível de significância fixa foi de 10 % ($p < 0,1$), minimizando o risco de excluir algum fator importante para o processo da etapa seguinte (Rodrigues e lemma, 2014).

4.8.3 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) corresponde a um tipo de planejamento fatorial completo que possibilita elaborar um modelo matemático que,

com validade estatística, pode gerar uma superfície de resposta. A partir da análise da superfície de resposta obtida e conhecendo a significância estatística das respostas, esse planejamento permite determinar as condições otimizadas em estudo (Rodrigues e lemma, 2014).

A partir dos resultados no planejamento experimental por DFF foi desenhado um novo experimento por DCCR. As variáveis independentes com efeito positivo pelo planejamento experimental DFF foram consideradas para o planejamento por DCCR. As três variáveis consideradas foram L-prolina (X_1), sulfato de amônio (X_2), e L-asparagina (X_3) para avaliar o efeito na produção de L-asparaginase pelo isolado DCFS6. Os níveis superiores (+1) e inferiores (-1) de cada variável independente foram analisados conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental DCCR para identificar os fatores influentes na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1 (%)	0 (%)	+1 (%)
L-prolina	X_1	5	6	7
L-asparagina	X_2	3	5	7
Sulfato de amônio	X_3	2	3	4

A matriz do desenho experimental DCCR e a análise de variância (ANOVA) foram determinadas pelo software *Protimiza Experimental Design* (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>) em um desing fatorial 2^3 com 6 pontos axiais. O experimento consistiu em 18 corridas, sendo 8 combinações das 3 variáveis, 6 ensaios nos pontos axiais para testar o modelo de 2ª ordem e 4 replicas do ponto central. Após o preparo de cada corrida acrescentados ao meio mínimo (K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) totalizando 50 mL em Erlenmeyer e seguindo os cuidados de preparo de cultivo, um disco de 5 mm de diâmetro do micélio do isolado foi inoculado e incubado a 30 °C a 120 rpm por 4 dias. Após isso, as culturas foram filtradas e o micélio utilizado para ensaio enzimático de L-asparaginase, como descrito no item 4.6. Na análise de variância, seguindo o objetivo de screening do DCCR, o nível de significância fixa foi

de 5 % ($p < 0,05$), considerando essa etapa como final do planejamento (Rodrigues e lemma, 2014).

4.8.4 Determinação de efeito independente de L-Prolina e Sulfato de amônio

A partir dos resultados finais no planejamento experimental DCCR foi desenhado um experimento para análise do efeito isolado das variáveis significativas (valor $p < 0,05$) positivas identificadas no PBD e DFF, com finalidade de verificar suas influências na produção de L-asparaginase pelo isolado DCFS6. No planejamento PBD foi identificada a variável L-prolina e no planejamento DFF a variável sulfato de amônio.

Os meios de cultivo selecionados para tal análise foram: a corrida que apresentou maior atividade enzimática no planejamento PBD (L-asparagina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, peptona 1,5 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 % e cloreto de potássio 0,01 %) acrescidos ao meio mínimo (K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) com as concentrações de L-prolina verificadas de 3%, 5%, 7% e 9% e de sulfato de amônio 1,5%, 3%, 5% e 7%; e Czapek Dox modificado (L-asparagina 1,38 %, nitrato de sódio 1,99%, glicose 0,65 % e cloreto de potássio 0,052 %) acrescido ao meio mínimo (K_2HPO_4 0,0152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) com as concentrações de L-prolina verificadas de 1,71%, 3%, 5% e 7% e de sulfato de amônio foram 0%, 3%, 5% e 7%. Como trata-se de uma determinação independente, o substrato que não está sendo variada suas concentrações é mantido na sua concentração menor.

Após essa verificação inicial e a partir dos resultados estatísticos, as concentrações das duas variáveis foram extrapoladas isoladamente, sendo para L-prolina 15 e 20 %, e sulfato de amônio 10 e 15 %, utilizando apenas a corrida 9 que apresentou maior atividade enzimática no planejamento PBD, Tabela 6 dos resultados.

4.9 Análise estatística

Para análise estatística foi usado o software GraphPad Prism® Version 6.01. Avaliou-se a distribuição dos dados, de modo que dados com distribuição normal, aplicou-se teste paramétrico (dados representados por média e desvio padrão) e dados com distribuição não normal aplicou-se testes não paramétrico (dados representados por mediana e intervalos interquartis). Os testes utilizados para cada análise dos experimentos estão descritos nas legendas dos gráficos representativos. A diferença significativa foi considerada para os valores de $p < 0,05$.

4.10 Extração de DNA

4.10.1 Condições de cultivo para isolamento de DNA

O isolado DCFS6 previamente armazenado em glicerol a -80 °C foi reativado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) a $25 \pm 2\text{ °C}$, durante cerca de sete dias ou até seu completo crescimento. Para o isolamento de DNA o fungo foi cultivado em meio batata-dextrose-ágar (BDA) com ágar na concentração de 2,0% a $25 \pm 2\text{ °C}$ em estufa num período de quatro dias com o interesse de coletar micélio novo.

4.10.2 Manipulação de DNA genômico

A extração do DNA genômico do fungo isolado DCFS6 foi realizada utilizando o protocolo adaptado de *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega), como descrito abaixo. Este procedimento garante um DNA de alta qualidade, necessário para a etapa posterior de sequenciamento.

Aproximadamente 40 mg de micélio com sete dias de crescimento em BDA foram transferidos para microtubo de 1,5 mL contendo 4 esferas de aço (3 mm de diâmetro), 600 μL de solução de lise (Nuclei Lysis Solution) e 100 mg de polivinilpirrolidona (PVP). No equipamento L-Beader 6 (Loccus Biotecnologia, Cotia, Brasil) a amostra foi macerada por 90 segundos a 1.777 g e em seguida incubadas em banho seco a 65 °C por 15 minutos, nesse intervalo o microtubo foi invertido a cada 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 3 μL de RNase A (20 mg/mL) e misturados sob um vortex e incubado a 37 °C por 15 minutos. Logo, foram adicionados 200 μL da solução Precipitation Protein Solution para precipitação de proteínas, o tubo foi invertido cuidadosamente e centrifugado a 18.407 g por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubo de 1,5 mL com 600 μL de isopropanol (100%) resfriado e cuidadosamente invertidos manualmente por 5 minutos, após incubado a -20 °C por 5 minutos. Logo, centrifugados a 18.407 g por

5 minutos e descartado o sobrenadante conservando apenas o *pellet* formado no fundo do microtubo. O *pellet* foi lavado com 600 μ L de etanol (70%) resfriado, o microtubo foi invertido manualmente por 2 minutos e centrifugado a 18.407 g/ 5 minutos e o sobrenadante descartado. O microtubo foi invertido sob o papel a temperatura ambiente por no mínimo 30 minutos para secagem do *pellet*. Após essa secagem o *pellet* de DNA foi ressuspendido em 50 μ L de T.E pH 8,0 e incubado em banho seco a 65 °C por 1 hora, ou deixado a – 20 °C por 24 horas. A qualidade do DNA extraído foi verificada em gel de agarose 1% e corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

4.10.3 Eletroforese de ácidos nucleicos em gel de agarose 1%

Para o preparado do gel de agarose a 1% foi pesado 0,4g de agarose e adicionado 40 mL de tampão TAE 1X. Para solubilização foi aquecido por 30 segundos ou até total dissolução sem atingir fervura. Após atingir 55 °C o preparado foi vertido na cuba e aguardado 10 minutos para completa polimerização. Foi depositado no gel 3 μ L de amostra juntamente com 3 μ L de *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) previamente preparado. A corrida aconteceu em tampão TAE 1X em 100 V, 500 mA, 150W por 40 minutos. Após a separação, os fragmentos foram visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta. O resultado foi avaliado de acordo com a presença ou ausência de banda. A estimativa dos tamanhos dos produtos amplificados foi feita a partir de comparação com o marcador padrão 1Kb DNA Ladder Ready-to-use (Kasvi).

4.10.4 Coloração com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)

GelRed® é um corante ultra-sensível de ácido nucleico fluorescente, estável e ambientalmente seguro, projetado para substituir o brometo de etilo altamente tóxico por coloração de dsDNA, ssDNA ou RNA em géis de agarose ou géis de poliacrilamida. GelRed® tem praticamente os mesmos espectros que os de brometo de etilo. O GelRed® foi diluído 1:500 em água ultrapurificada e autoclavada, e logo acrescido 1:2 em tampão de amostra (glicerol, 3%; EDTA 500mM pH 8,0, 0,1mM; azul de bromofenol, 0,025%). O preparado foi mantido em temperatura ambiente e quando realizado eletroforese foi utilizado 3 μ L deste preparado acrescido nas amostras.

4.11 Amplificação das regiões gênicas para identificação

Para confirmação de identidade o DNA genômico do isolado DCFS6 foi amplificado e sequenciado com os indicadores da região RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit), os quais amplificam uma região de aproximadamente 1000 pb. As reações foram preparadas em volume final de 12,5 μL , contendo 6,25 μL de MyTaq PCR Master Mix, 1 μL de DNA genômico, 0,3 μL de cada iniciador (10 pmol/ μL) e 4,65 μL de água ultrapura. A reação controle consistiram na adição de todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico. O ciclo da PCR foi programado para desnaturação inicial a 95 °C por 1 min e 30 segundos, seguido de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 20 segundos a 95 °C, 45 segundos a 54 °C e 45 segundos a 72 °C e extensão final por 5 min a 72 °C. Após sequenciamento desta região, o DNA genômico dos isolados também foi amplificado e sequenciado nas regiões ITS (Internal Transcribed Spacer), calmodulina e β -tubulina seguindo as mesmas condições do ciclo anterior com a temperatura de anelamento específicas para cada região, descritas no Quadro 3. Os produtos das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% juntamente corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) e marcador 1Kb DNA Ladder Ready-to-use (Kasvi) com concentração conhecida. A visualização ocorreu sob luz UV para verificar o tamanho e pureza das amplificações.

Quadro 3: Indicadores utilizados para a identificação do isolado DCFS6.

Região gênica	Indicador	Sequência	Sentido	Referência	Temperatura de anelamento
RPB2	5F2	5'-GGG GWG AYC AGA AGA AGG C-3'	Senso	Sung et al., 2007	54 °C
	7 Cr	5'-CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT-3'	Antissenso	Liu et al., 1999	
ITS (5.8 S e 28 S rDNA)	V9G	5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3'	Senso	Hoog e Ende, 1998	53 °C
	LR5	5'-TTA CGT CCC TGC CCT TTG TA-3'	Antissenso	Vilgalys e Hester, 1990	
β -tubulina	T1	5'-AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT-3'	Senso	O'Donnell e Cigelnik, 1997	55 °C
	Bt2b	5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3'	Antissenso	Glass e Donaldson, 1995	
Calmodulina	Cal228F	5'-GAG TTC AAG GAG GCC TTC TCC C-3'	Senso	Carbone e Kohn (1999)	59 °C
	Cal2Rd	5'TGR TCN GCC TCD CGG ATC ATC TC-3'	Antissenso	Quaedvlieg et al. (2011)	

4.12 Purificação de produto de PCR e sequenciamento de DNA

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific). O produto da PCR com volume de 9,5 μ L foi diluído com a adição de 6 μ L de água ultrapura. Em outro tubo foi colocado 5 μ L desse produto diluído adicionado a 2 μ L de ExoSAP-IT sob refrigeração. Para atividade das enzimas de ExoSAP-IT, as amostras foram colocadas em termociclador por 15 minutos a 37 °C seguido por 15 minutos a 80 °C. A 37 °C a enzima exonuclease I digere o excesso de indicadores (primers) e a *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) degrada o excesso de nucleotídeos. Enquanto que a 80 °C as enzimas são inativadas. As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen Inc. Korea, Seul, República Da Coreia (<http://www.macrogen.com>). As sequências obtidas foram analisadas com

auxílio do programa MEGA v. 7 (KUMAR et al., 2016). A sequência consenso foi submetida a comparação com aquelas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando-se o BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e alinhadas.

4.13 Análises filogenéticas

A análise da qualidade e edição das sequências de nucleotídeos foram realizadas no software MEGA v. 7 e corrigidos os arranjos dos nucleotídeos em posições ambíguas por comparação das sequências senso e antissenso. A identificação previa dos isolados foi realizada pela análise das sequências da região RPB2 em comparação pelo algoritmo BLASTn com outros isolados depositados no GenBank de *Penicillium* spp., com posterior submissão da matriz ao web portal CIPRES (Miller et al., 2010).

Após essa identificação inicial, foi realizada análise filogenética concatenada dos isolados de DCFS6 (*a* e *b*) das regiões ITS e RPB2. As sequências adicionais foram selecionadas a partir de Houbraken et al. (2011) e obtidas do GenBank. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o software MEGA v. 7 empregando o algoritmo MUSCLE. O *Coccidioides immitis* (strain RS) foi escolhido como grupo externo (*outgroup*) para a análise.

Com objetivo de selecionar o modelo de substituição de nucleotídeos para cada região gênica, a análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada a partir de MrMODELTEST 2.3 (Nylander, 2014) empregando o método Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Os valores de verossimilhança foram calculados e a seleção do modelo foi realizada conforme o Akaiake Information Criterion (AIC). A conclusão da análise de IB foi por MrBayes v.3.1.2 (Ronquist et al, 2012). Cada cadeia MCMC foi conduzida simultaneamente, iniciando as árvores aleatoriamente até 10.000.000 de gerações. As árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações, seguindo-se em resultado 10.000 árvores. As 2.500 primeiras árvores foram descartadas da análise. A determinação dos valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) da árvore consenso ocorreu por meio das 7.500 árvores restantes. Para visualização da árvore foi utilizado o software FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) e exportada para programas gráficos.

4.14 Caracterização morfológicas do isolado DCFS6

Para a caracterização morfológica, o isolado monohifal DCFS6 foi cultivado em meio MEA a 25 ± 2 °C até a observação de estruturas reprodutivas. E, também estruturas a partir de microcultivo (Alfenas e Mafia, 2016), em meio MEA a 25 ± 2 °C por 48 horas. Logo, as características morfológicas foram determinadas pela montagem de estruturas em lâminas semipermanentes contendo lactoglicerol. Foram realizadas 30 medições de cada marcador morfológico recomendado pela literatura, no aumento de 1000x por microscópio de luz com câmera acoplada (Leica DM2500).

4.15 Sequenciamento do gene da L-asparaginase

4.15.1 Desenho dos *primers* iniciadores

O desenho desses *primers* foi realizado previamente por este grupo de pesquisa em parceria com a Dra. Leia Favaro. Inicialmente foi realizada uma busca de sequências de nucleotídeos e/ou aminoácidos relativas a L-asparaginase de fungos de espécies do gênero *Penicillium* disponíveis no Banco de Dados – GenBank (website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Centro Nacional de Informação em Biotecnologia – NCBI). Essas sequências foram alinhadas no programa Geneious 11.0.4 para a verificação da existência de regiões conservadas, as quais foram essenciais para o desenho dos *primers*, de maneira que a temperatura de anelamento preditiva dos primers com o genoma do fungo ficasse entre 50 °C e 60 °C. Os alinhamentos resultantes foram então analisados, ou seja, as regiões de sequências conservadas foram marcadas manualmente por sombreamento para melhor visualização e os *primers* desenhados de acordo com os requisitos básicos para maior eficiência das reações de PCR. No Quadro 4 estão apresentadas as sequências dos *primers* de L-asparaginase desenhados.

Quadro 4: *Primers* de L-asparaginase utilizados no estudo.

Primers	Sentido	Sequência (5'- 3')
PenchAsn	Antissenso	AGCAACGGTAGCCTTCAAGA
	Senso	ATGGGTTTCTCTCTTCAGGCC
PendAsn	Antissenso	AGCAACAGTAGCCTTCGAGA
	Senso	ATGGGGATCACTATTCAGACACT
PenbAsn	Antissenso	AGCAACAGTGGCCTTCAGGA
	Senso	ATGGGCTTCTCTCTCCACA
PencaAsn	Antissenso	AGCAACAGTAGCCTTCCCAA
	Senso	ATGGGCTTCCAACCAATACA
PenlAsn	Antissenso	AGCAACGGTAGCCTTCAGGA
	Senso	ATGGTGTTCTCTCTTCAGGCT
Pent1Asn	Antissenso	CGCAACAGTAGCCTTCAAGA
	Senso	ATGGGGTTTACTCTTCATACACTC
Pent2Asn	Antissenso	ATATGCAAAACCGAACAAAGTTGCGA
	Senso	ATGTGCCGTAACGGCCGAT
Cons-Pen	Antissenso	AGCAACAGTAGCCTTCAAGAA
	Senso	ATGGGGTTCTCTCTTCAGACA

4.15.2 Amplificação da região gênica L-asparaginase

Para identificação da região gênica que expressa a enzima L-asparaginase do isolado DCFS6 foi realizada PCR com os *primers* citados no item 4.13.1. As reações foram preparadas em volume final de 12,5 μ L, contendo 6,25 μ L de MyTaq PCR Master Mix, 1 μ L de DNA genômico, 0,3 μ L de cada iniciador (10 pmol/ μ L) e 4,65 μ L de água ultrapura. A reação controle consistiram na adição de todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico. O ciclo da PCR foi programado para desnaturação inicial a 95 °C por 1 min e 30 segundo, seguido de 35 ciclos de amplificação. Cada ciclo consistiu de 20 segundos a 95 °C, 45 segundos na temperatura de anelamento e 45 segundos a 72 °C e extensão final por 5 min a 72 °C. A temperatura de anelamento utilizada no ciclo foi determinada conforme desenho dos *primers*. Com isso, foram verificadas as temperaturas 48 °C, 50 °C, 52 °C e 55 °C. Os produtos das PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 % juntamente corado com GelRed e marcador 1Kb DNA Ladder RTU com concentração conhecida e a visualização ocorreu sob luz UV.

4.15.3 Purificação de fragmentos de amplificação em gel de agarose

O produto da PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5 % por 1 hora e 30 minutos e visualizado sob UV. Os fragmentos da amplificação foram cortados do gel com auxílio de uma lâmina e mantidos à – 20 °C até extração do gel de agarose. Para purificação do fragmento e extração do gel de agarose foi utilizado o kit e protocolo Quick-Start (Quiagem). As amostras foram enviadas para sequenciamento na empresa MacroGen Inc. Korea, Seul, República Da Coréia (<http://www.macrogen.com>). A sequência consenso foi submetida a comparação com aquelas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando-se o BLAST (basic local alignment tool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração, amplificação e purificação de DNA genômico

O isolado DCFS6 foi selecionado para sequenciamento do seu genoma estrutural, por ser identificado como um produtor de L-asparaginase dentre os fungos filamentosos do cerrado.

A extração de DNA consiste na etapa inicial e crucial para identificação genética. A extração de DNA genômico do isolado DCFS6 foi realizada seguindo o protocolo adaptado de Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) em que umas das etapas se baseia na digestão enzimática, com o uso da RNase. A qualidade do DNA extraído foi verificado em gel de agarose 1% e revelado por GelRed® em transluminador ultravioleta, conforme ilustrado pela Figura 6. O DNA extraído dos espécimes do isolado DCFS6 por este protocolo está depositado sob a inscrição 2088 (a) e 2089 (b), e preservado a -20 °C, na coleção de DNAs do Laboratório de Fitopatologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (Brasília-DF) sob a supervisão do Prof. Dr. Danilo Batista Pinho.

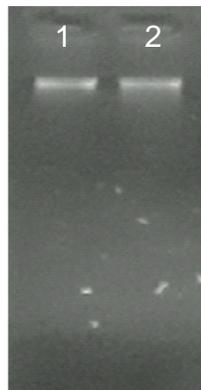


Figura 6: Gel de quantificação da extração de DNA genômico do fungo isolado DCFS6. Espécime: (1) *Penicillium* sp. a; (2) *Penicillium* sp. b.

As amplificações das regiões RPB2, ITS, Beta-tubulina e Calmodulina produziram fragmentos de aproximadamente 1000, 1500, 1000 e 900 pb respectivamente para os dois espécimes do isolado DCFS6 (Figura 7). Essas amplificações foram verificadas em gel de agarose 1% com marcador padrão 1Kb DNA Ladder composto de 13 fragmentos de 250 a 10.000 pb.

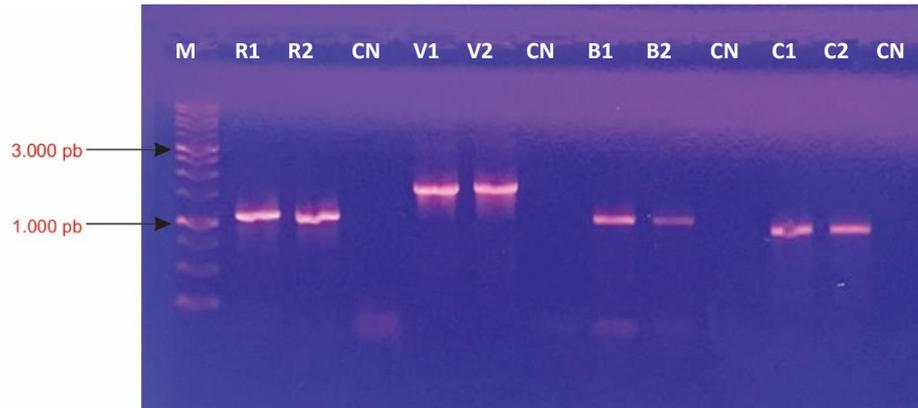


Figura 7: Eletroforese das regiões gênicas RPB2 (R), ITS (V), Beta-tubulina (B), Calmodulina (C) para identificação do isolado DCFS6. Espécime: (1) *Penicillium* sp. a; (2) *Penicillium* sp. b. Controle Negativo (CN). Marcador 1Kb (M).

Inicialmente as sequências de nucleotídeos foram analisadas com o auxílio da ferramenta BLAST contra a base de dados do GenBank. As sequências obtidas neste trabalho foram alinhadas utilizando o software MEGA v. 7 e manualmente ajustadas quando necessário. O tamanho do *contig* de cada região gênica para os espécimes a e b do isolado estudado está apresentado no Quadro 5 e sua sequência de nucleotídeos segue logo abaixo, com os respectivos genes.

Quadro 5: Tamanho dos fragmentos do fungo isolado DCFS6 e os respectivos genes utilizados na amplificação. (1) *Penicillium* sp. a e (2) *Penicillium* sp. b.

Região gênica	Tamanho do fragmento (pb)	
	1	2
RPB2	931	799
ITS (5.8 S e 28 S rDNA)	1.526	1.107
β -tubulina	729	727
Calmodulina	570	678

> *Penicillium* sp. a_RPB2

```
GAGAAGGCAGCCAGCGCTAAGGCCGGTGTGTCCCAAGTGCTGAGTCGTTATACATTTCGCTTCTTCACTGTCCGATTGCGC
CGTACCAACACGCCTATTGGTCGTGATGGTAAGATTGCCAAACCGCGTCAGCTTCATAATACCCACTGGGGTCTCGTGTGT
CCCGCAGAACTCCCGAAGGACAGGCTTGTGGTCTTGTCAAGAACTTGGCACTTATGTGCTATATCACTGTTGGTACTCCTA
GTGAGCCAATCATCGATTTTCATGATTCAGCGAAAATATGGAAGTCTTGGAAAGAGTTTGAACCTCAAGTCACGCCGAATGCCAC
AAAGGTGTTCTTAATGGTGTCTGGGTTGGTATCCACCGTGATCCTTCTCACTTGGTTAACACTATGCAATCCCTGCGTCGA
CGTAATATGATTTCTCACGAAGTCAGTTTGATTTCGGGATATTCGTGAGCGAGAGTTCAAGATTTTCACTGATACCGGCCGTG
TCTGCCGTCCCTTGTTCGTTGTCGACAATGATCCTAAGAGCGAAAATGCCGGATCTTTGATTTTGAATAAGGAGCACATTCA
CAAGTTGGAGCAGGATAAAGGACTTACCCTCGGATATGGATGTTGAAGAGCGACGAGAGCGCTACTTCGGGTGGGATGGTC
TGGTCCGATCAGGAGCTGTTGAATACGTGGATGCGGAAGAAGAAGAGACTATAATGATTGTGATGACGCCTGAAGATTTGG
```

AGATTTCCAAGCAGCTCCAGGCCGGCTACGCATTGCCCGAGGAGGAATCCAGTGACCCGAACAAGCGAGTTCGCTCGATT
CTCAGCCAGCGGGCGCACACCTGGACACACTGTGAGATTCATCCTAGTATGATTCTCGGTGTTTGTGCCAGTATTATTCCTT
TCCCGGATCACAACCAAGTCTCCTCGTAACACTTACC

> *Penicillium* sp.a ITS

TTGACGATCGATTGACAGTCAGAACCGCTGCGAGCCTCCACCAGAGTTTCTCTGGCTTCGCCCTATTACGGCAGATGTTCC
ACCATCTTTCCGGTCCCAACAGCTACGCTCTTACTCAAATCCATCCGAAGACATCAGGATCGGTGATGGTGCACCCCGGG
GGTTCCACCTCCGTTGCTTTCACTGCGCGCAGGGTTTACACCCGAACACTCGCGTAGATGTTAGACTCCTTGGTCC
GTGTTTCAAGACGGGTGCTTACGACCATATGCCAGCGTCCGAGCCGAAGCGGTTCTCGGTCCGGGCAGGGCCGAT
GGCACCCCTGGCTATAAGACGCCCGGAGAGGCGTTACATTCAGGGGCCTTTGACCGGCCGCCAAACCGACGCTGGCC
CGCCACCGGGGAAGTACACCGGCACGAATGCCAGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGATCGCAAGCGCTTCCCTTTCAAC
AATTTACAGTGCTGTTAACTCTCTTTCAAAGTGCTTTTCATCTTTGATCACTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCA
ATATTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCCAATTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTGAAGGAGCTTACACGG
GCGCGGGCACCCCATCCAGACGGGATTCTCACCTCTATGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGATGGGGACCGCTCCC
GAAGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACCCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTTTGCCGCTTCACTCGCCGT
ACTAGGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTCTCCGCTATTGATGCTTAAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGT
CAACCTGAAAAAATTTAGGGTTGGGGTTCGGCTGGCGCCCGCCGGCCCTACAAGAGCGGGTGACGAAGCCCATACGC
TCGAGGACCGGACGCGGTGCCGCGCTGCTTTCCGGCCCGTCCCGCGCGTGGGGGGACGGGGGCCAACACACA
AGCCGTCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGACAGGCAATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCTTCAAAGA
CTCGATGATCACTGAATTTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTATCGATGCCGGAACCAAGAGATC
CGTTGTTGAAAGTTTTAACTAATTTAACTAGTTTCTCAGACTGCAACTTCAGACAGCGTTTATGGGGTCTTCGGCGGGCGC
GGGCCCGGGGCAGAGCCCCCGCGGCCGTGAGGGCGGGCCCGGAAGCAACAAAGTTTCTGTTAAACACGGGTGGGA
GTTTGGACCCCGAGGGCCCTCACTCAGTAATGATCCTTCCGAGTTTCACTACGGAACCTGTTACGACTTTTACTTCT
CTCTAATGACCGAGTTTGACCAACTTTCCGGCTCTGGGGGTGCTTGGCCGTAACAACCTCCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCAC

> *Penicillium* sp.a β -tubulina

GTAAGTCTCTTTTTCCAAGTTCAACGCGTCTTTGTTGACCTACCCCTGAACGGACCCCACTTGTTCATCCTGCTAACCCG
AGCTTTTTTCCCAACGTATAGGTTACACCTCAGACCGGCCAGTGTGTAAGTGCACATTCGAAGAATCCAATGCCCTCATGA
TTGGGCAAAAAGACACAACGACATGAGTATGATGGTTCGAGTGATTGCTAAATGATATGTGGGGATAATACAGGGTAACCA
AATGGTGCCGCTTTCTGGTACGTGCTGCAATCCTAACCAATCAATTGTTGAGTGCATGGAGCAATAAACAATCAATTC
ACAGGCAAACCATTTGCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCGATGGACAGTGAGTGATTTGACCAGGTTTTGATTTTCGAGAA
TGCGGCTGATATTTTGGGCGAGCTACAACGGTACCTCTGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTTTACTTCACCCATGT
AAGCGACGACAACAACCTCCTCCTCATCAACACAAAGTCTTGAATCTAACGGCTTGTGTTTTGTTTTCCCAATAGGCTTC
CGGTGACAAGTATGTTCCCGTGGCCTTCTGGTTGATCTGGAGCCCGTACCATGGACGCTGTCGCTGGTCCCTTCG
GCAAGCTCTTCGCGGACAACTTCGCTTCCGGTCACTGCTGGTGCCGTAACAACCTGGGCAAGGGTCACTACACT

> *Penicillium* sp.a Calmodulina

CTCTTTGTGAGTAATTTGATCCAGGGATTGAAATTTGTAATGTGTGATCGAATCTAGGCTGACGGGGGTTATCTTGTGATC
GACAGGACAAGGATGGTGTAGTGTGTTGTCGTTTGTGAACGACCCGTGTCCTTTCTACGGGCGGTGTTTCTTTCGGA
TTCGTTCCCATCAAATTCACCTCGAAATATACTGATTGATCGACGATAAATAGGACAAACTACTACCAAGGAGCTCGGCACT
GTCACGCTCCCTCGGCGAACCCTCCGAGTCCGAGCTGACAGGACATGATCAATGAGTTGATGCCGATAAACAATGG
CACCATTGATTTCCCGGTACGAATCCAGAGTCCATATCCCTACGACTCCCTCTTCTCTTACATTATGCCCTATCGTCCG
CATCTCGATACGAAATAAATAAATATTGACATGCGCCACAGAGTCTCTGACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGATACCGA
CTCCGAGGAGGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTTGACCGCGATAACAACGGATTTATCTCCGCGCTGAGCTGCGCC
A

> *Penicillium* sp.b_RPB2

GGCAGCCAGCGCTAAGGCCGGTGTGTCCAAAGTGTGAGTCTGTATACATTGCTTCTTCACTGTGCGATTTGCGCCGTAC
CAACACGCCTATTGGTGTGATGGTAAGATTGCCAAACCGCGTCACTTTCATAATACCCACTGGGGTCTCGTGTGCCCGC
AGAACTCCCGAAGGACAGGCTTGTGGTCTTGTCAAGAAGTGGCACTTATGTGCTATATCACTGTTGGTACTCCTAGTGAG
CCAATCATCGATTTTCATGATTCAGCGAAATATGGAAGTCTTGAAGAGTTTGAACCTCAAGTCAAGCGCCGAATGCCACAAGG
TGTTGTTAATGGTGTCTGGTTGGTATCCACCGTATCCTTCTCACTGGTTAACACTATGCAATCCCTGCGTGCAGGTA
TATGATTTCTCACGAAGTCAATTTGATTCCGGGATATTCGTGAGCGAGAGTTCAAGATTTTCACTGCGCCGTTACTGCTGC
CGTCCCTTGTGCTGCGACAATGATCCTAAGAGCGAAAAATGCCGGATCTTTGATTTTGAATAAGGAGCACATTACAAAGT
TGGAGCAGGATAAGGACTTACCTCTGGATATGGATGTTGAAGAGCGACGAGAGCGCTACTTCCGGTGGGATGGTCTGGTC
CGATCAGGAGCTGTTGAATACGTGGATGCCGAAGAAGAAGAGACTATAATGATTGTGATGACGCCTGAAGATTTGGAGATT
TCCAAGACTCCGAGCCGGCTACGCATTGCCCGAGGAGGAATCCAGTGACCCGAACAAGCGAGTT

> *Penicillium* sp.b ITS

CACCGGCACGAATGCCGGCTGAACCCCGCGGGCGAGTCTGATCGCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACAGTGCTGTTT
AACTCTCTTTTCAAAGTCTTTTCATCTTTGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGGCCAATATTTAGCTTTAGATG
AAATTTACCACCAATTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTGAAGGAGCTTACACGGGGCGGGCCACCCCATC
CCAGACGGGATTTCAACCTCTATGACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGATGGGGACCGCTCCCGAAGCATCCTCTGCAAA
TTACAATGCCGAGGACAGGATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCTTCAAAGACTCGATGATTTCACTGAATTC
TGGTTTCTTTTCTCCGCTATTGATGCTTAAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGAAAAAATTTA
GGTTGGGGTTCGGCTGGCGCCGGCCGGCCCTACAAGAGCGGGTGACGAAGCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGT
GCCCGCGTGCCTTTCCGGCCCGTCCCGCGGGCGTGGGGGGACGGGGGGCCCAACACACAAGCCGTGCTTGGGGCAG
CAATGACGCTCGGACAGGATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCTTCAAAGACTCGATGATTTCACTGAATTC
TGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTA
ATTTAACTAGTTTCTCAGACTGCAACTTCAGACAGCGTTTATGGGGTCTTCCGGCGGGCGGGCCCGGGGGCAGAGCCC
CCCGGGCGCGTGGAGGCGGGCCCGCCGAAGCAACAAAGTTTCTGTTAAACACGGGTGGGAGTTGGACCCCGAGGGGCC

CTCACTCAGTAATGATCCTTCCGCGAGGTTACCTACGAAACCTTGTTACGACTTTTACTTCTCTAAATGACCGAGTTTGAC
CAACTTTCCGGCTCTGGGGGGTCTGGTCCAAACCTCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCA

> *Penicillium* sp.b_ β -tubulina

AGTCCTCTTTTTCCAAGTTCAACGCGTCTTTGTTGACCTACCCCTGAACGGACCCCACTTGTTTCATCCTGCTAACCCGAG
CTTTTTCCCAACGTATAGGTTACCTTCAGACCGGCCAGTGTGTAAGTGACATTGGAAGAATCCAATGCCCTCATGATT
GGGCAAAAAGACACAACGACATGAGTATGATGGTTTCGAGTGATTGCTAAATGATATGTGGGGATAATACAGGGTAACAAA
TTGGTGCCGCTTTCTGGTACGTGCTGCAATCCTAACCAATCAATTGTTGAGTGCATGGAGCAATAAACTAATCAATTCAAC
AGGCAAACCATTGCTGGCGAGCACGGCCTTGATGGCGATGGACAGTGAGTGATTCGACCAGGTTTTGATTTTCGAGAATG
GCGGTCTGATTTTTGGGCAGCTACAACGGTACCTCTGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTTTACTTCACCCATGTAA
GCGACGACAACAACCTCCTCCTCATCAACACAAAGTCTTGAATCTAACGGCTTGTTTTGTTTTCCCAATAGGCTTCC
GGTGACAAGTATGTTCCCGTGCCGTTCTGGTTGATCTGGAGCCCGGTACCATGGACGCTGTCCGTGCTGGTCCCTTCGG
CAAGCTCTTCCGCCCCGACAACCTTCGTCTTCGGTCAGTCTGGTCCGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTCACTACACT

> *Penicillium* sp.b_Calmodulina

CTTTTTGGGTATTAGATCCTGATGATCAGGTATTGAATTGTGAATGTGTGATCGAATCTAGGCCGACGGGGGGTTATCTTGT
GATCGACAGGACAAGGATGGTGATGGTGAGTTTTGTCGTTTTGTAACGACCCGTGTCCTTCTACGGGCGGTGTTTTCTTT
GCGATTCTTCCCATCAAAATTCACCTCGAAATACTGATTGATCGACGATAAATAGCGACAAATCACTACCAAGGAGCTCG
GCACTGTCATGCGCTCCCTCGGCCAGAACCCCTCAGAGTCAGAGCTGCAAGACATGATCAATGATGTTGATGCCGATAACA
GTGGCACCATTGATTTCCCGGTACGAATCCAGACTCCATATCCCTACGACTCCCTCTTCTCTTACATTATGCCCTATC
GTCGCATCTATACAAAATAAATAAATTGACATGCGCCACAGAGTTCCTGACCATGATGGCTCATAAGAAGAAAGATA
CCGACTCCGAGGAAGAGATCCGCGAGGCTTTCAAGGTGTTGACCGCGATAACAACGGATTTATCTCCGCGCTGAGCTG
CGCCACGTGATGACCTCCATCGGCGAGAAGCTGACCGACGATGAGGTGATGAGAAATCCGGAGGGCGAAAAATACGTTT
TCACTGCATTCTAACTACTCCGCTCTTG

5.2 Caracterização molecular

A RPB2 foi a região gênica escolhida para iniciar a análise molecular do isolado DCFS6 pela breve caracterização morfológica desse fungo como pertencente a espécie *Penicillium*. As demais regiões – ITS, β -tubulina e calmodulina – foram utilizadas conforme descrito por Houbraken et al. (2011) após análise da região RPB2 no BLAST direcionando o isolado em estudo como relacionado à seção Citrina.

Os resultados das amplificações RPB2 e ITS foram utilizadas para análise filogenética em concordância com o trabalho de Houbraken (2011) e colaboradores. Os resultados de β -tubulina e calmodulina não foram utilizados nessa análise, mas serão depositados no GenBank e disponibilizados para consulta.

A análise filogenética foi realizada a partir da combinação das regiões RPB2 e ITS com matriz de 1501 pb (divididos entre 586 pb em ITS e 915 pb em RPB2), compreendendo 86 taxa (Tabela 5), em que destes, foram observados 891 sítios conservados e 513 sítios informativos a parcimônia. A matriz alinhada dos 86 taxa foi submetida a Inferência Bayesiana (IB), com GTR+I+G, sendo o modelo de substituição de nucleotídeos selecionado como o melhor para o conjunto de dados.

Na árvore multigênica de *Penicillium* spp. é possível identificar que os espécimes deste estudo alinharam ao clado juntamente com *Penicillium citrinum* pertencente a seção citrina e formaram um grupo independente, indicando uma nova espécie do gênero *Penicillium*, conforme apresentado na árvore filogenética concatenada (Figura 8).

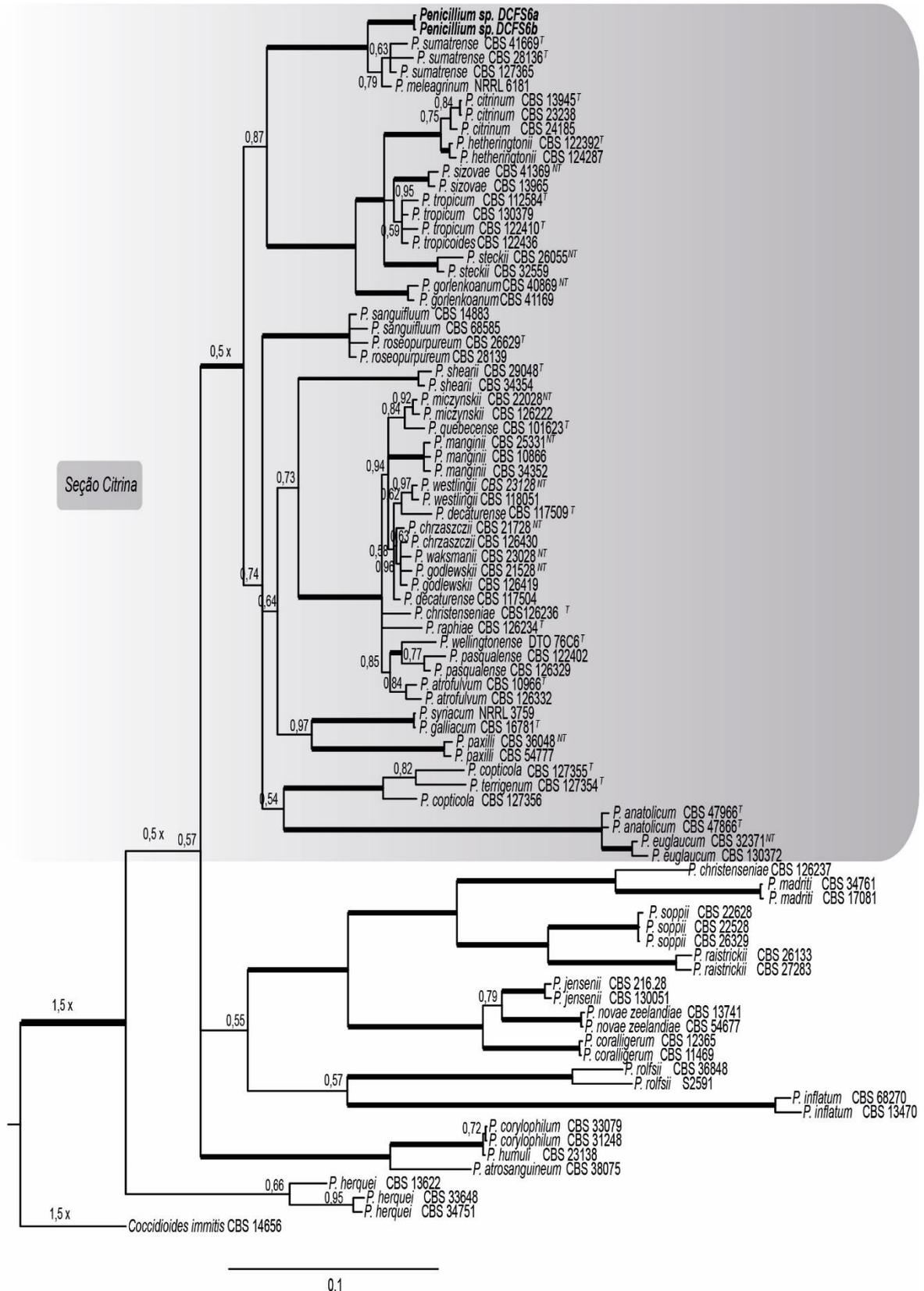


Figura 8: Relação filogenética concatenada com sequências parciais das regiões ITS e RPB2 obtida por Inferência Bayesiana. A probabilidade posterior é indicada acima dos nós e com as linhas mais grossas representando probabilidade maior ou igual a 0,99 por análise de IB. A árvore foi enraizada com *Coccidioides immitis* (strain RS). Os espécimes deste estudo estão destacados em negrito

Tabela 5: Isolados dispostos na análise filogenética.

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>Penicillium</i> sp. nov. (a)	DCFS6	-	-	-	-	-	Solo cerrado	Água Fria de Goiás, GO - Brasil	este estudo
<i>Penicillium</i> sp. nov. (b)	DCFS6	-	-	-	-	-	Solo cerrado	Água Fria de Goiás, GO - Brasil	este estudo
<i>P. anaticum</i>	CBS 479.66 ^T	DTO 22I6 = IBT 16177 = IBT 30764	JN617708	JN606593	JN606849	JN606571	Solo	Turquia	Houbraken et al, 2011
<i>P. anaticum</i>	CBS 478.66 ^T	DTO 22I5 = DTO 22I6 = ATCC 18621 = CSIR 940 = IFO 31729 = IMI 136242 = IBT 30765	GU944598	-	JN606848	JN606570	Solo	Turquia	Houbraken et al, 2010
<i>P. atrofulvum</i>	CBS 109.66 ^T	CBS H-20650 = DTO 31B2 = FRR 799 = IBT 30032 = IBT 29667	JN617663	JN606620	JN606677	JN606387	Solo	Katanga, Zaire	Houbraken et al, 2011
<i>P. atrofulvum</i>	CBS 126332	DTO 118D4	MH863908	-	JN606678	JN606390	Solo	Fey el Rih, Tunísia	Vu et al, 2019
<i>P. atosanguineum</i>	CBS 380.75	FRR 1726 = IMI 197488	JN617706	JN606590	KJ834435	KP016771	-	Praga, República Tcheca	Houbraken et al, 2011
<i>P. christensiae</i>	CBS 126236 ^T	CBS H-20656 = DTO 76C3 = IBT 23355	MH863997	JN606624	JN606680	JN606373	Solo	Costa Rica	Vu et al, 2019
<i>P. christensiae</i>	CBS 126237	DTO 78A5 = RMF 9554 = IBT 18183	MH863998	-	JN606679	JN606374	-	Puerto Rico	Vu et al, 2019
<i>P. chrzaszczii</i>	CBS 217.28 ^{NT}	22E4 = FRR 903 = MUCL 29167 = NRRL 903 = NRRL 1741 = IBT 18226 = IBT 11222 = IBT 16409	NR_111492	JN606628	JN606758	JN606423	Solo	Floresta Puszcza Bialowieska, Polónia	Houbraken et al, 2010
<i>P. chrzaszczii</i>	CBS 126430	DTO 42G9 = IBT 30634	MH864301	-	JN606760	JN606421	Solo	Polónia	Vu et al, 2019
<i>P. citrinum</i>	CBS 139.45 ^T	DTO 22F3 = ATCC 1109 = ATCC 36382 = CECT2269 = FRR 1841 = IMI 091961 = IMI 092196 = MUCL 29781 = NRRL 1841 = IBT 16200	MH856132	JF417416	GU944545	GU944638	-	-	Vu et al, 2019
<i>P. citrinum</i>	CBS 232.38	DTO 37B7 = Thom 4733.73	MH855952	JN121463	-	GU944633	-	Bélgica	Vu et al, 2019

Continua

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>P. citrinum</i>	CBS 241.85	IMI 092267 = MUCL 29788 = IBT 21934	GU944563	-	GU944546	GU944641	-	-	Houbraken et al, 2010
<i>P. copticola</i>	CBS 127355 ^T	CBS H-20643 = DTO 19H7 = IBT 30771	JN617685	JN606599	JN606817	-	-	Tortilla, EUA	Houbraken et al, 2011
<i>P. copticola</i>	CBS 127356	DTO 104E8 = IBT 30772	MH864539	-	JN606805	JN606532	Flor seca de <i>Cannabis</i>	Holanda	Vu et al, 2019
<i>P. coralligerum</i>	CBS 123.65	-	JN617667	JN606597	KJ834444	KJ866994	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. coralligerum</i>	CBS 114.69	-	KP016836	KP016847	KJ866970	KJ866991	Solo	Canadá	Visagie et al, 2006
<i>P. corylophilum</i>	CBS 330.79	IJFM 5147	GU944557	JN606591	GU944519	GU944607	Ar	Barcelona, Espanha	Houbraken et al, 2010
<i>P. corylophilum</i>	CBS 312.48	TCC9784 = ATHUM2890 = CECT 2270 = FRR 802 = IMI 039754 = MUCL 28671 = MUCL 29073 = MUCL 29131 = NRRL 802 = QM 7510	MH856360	KP064631	JX141042	KP016780	-	-	Visagie et al, 2006
<i>P. decaturense</i>	CBS 117509 ^T	DTO 3F7 = IBT 27117 = NRRL 28152	GU944604	JN606621	JN606685	JN606413	Fungo	Illinois, EUA	Houbraken et al, 2010
<i>P. decaturense</i>	CBS 117504	DTO 3A9 = IBT 27057 = NRRL 29675	AY313616	-	JN606688	JN606414	Trichaptum biforme	Geórgia, EUA	Peterson et al, 2004
<i>P. euglaucum</i>	CBS 323.71 ^{NT}	DTO 23B9 = IBT 30767	JN617699	JN121492	JN606856	JN606564	Solo	Argentina	Houbraken et al, 2011
<i>P. euglaucum</i>	CBS 130372	DTO 16G1 = IBT 30776	MH865786	-	JN606808	JN606550	Solo	Buenos Aires, Argentina	Vu et al, 2019
<i>P. galliacum</i>	CBS 167.81 ^T	DT 34G3 = IJFM 5597 = DTO 34G3 = ATCC 42232 = IMI 253794 = VKM F-2190 = IBT 22016	MH861316	JN606609	JN606837	JN606548	Ar	Madri, Espanha	Vu et al, 2019
<i>P. galliacum</i>	CBS 164.81	DTO 34G2 = IJFM 7026 = IMI 253797 = VKM F-2193 = IBT 22014	-	-	JN606836	JN606547	Ar	Madri, Espanha	Houbraken et al, 2011
<i>P. godlewskii</i>	CBS 215.28 ^{NT}	DTO 22E2 = ATCC 10449 = ATCC 48714 = FRR 2111 = I FO 7724 = IMI 040591 = MUCL 29243 = NRRL 2111	JN617692	JN606626	JN606768	JN606443	Solo	Polônia	Houbraken et al, 2011

Continua

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>P. godlewskii</i>	CBS 126419	DTO 40E3 = IBT 30692	MH864290	-	JN606763	JN606440	Solo	Bialowieska, Polônia	Vu et al, 2019
<i>P. gorlenkoanum</i>	CBS 408.69 ^{NT}	DTO 34E3 = FRR 511 = IMI 140339 = VKM F-1079 = IBT 19235	GU944581	JN606601	GU944520	GU944608	Solo	Síria	Houbraken et al, 2010
<i>P. gorlenkoanum</i>	CBS 411.69	DTO 23A6 = IMI 140337 = VKM F-1070 = IBT 16117	GU944580	-	GU944521	GU944609	Solo	Damasco, Síria	Houbraken et al, 2010
<i>P. herquei</i>	CBS 336.48	-	MH856374	JN121494	JN625970	JN626013	Folha de Agauria	França	Vu et al, 2019
<i>P. herquei</i>	CBS 136.22	-	JN626100	-	JN625969	JN626012	-	França	Rivera e Seifert, 2011
<i>P. herquei</i>	CBS 347.51	-	JN626102	JN606596	JN625971	JN626014	Bolo de milho e arroz Wakamoto	Nehira, Japão	Rivera e Seifert, 2011
<i>P. hetheringtonii</i>	CBS 122392 ^T	DTO 5H9 = IBT 29057	GU944558	JN606606	GU944538	GU944642	Solo	Flórida, EUA	Houbraken et al, 2010
<i>P. hetheringtonii</i>	CBS 124287	DTO 32E3	GU944560	-	-	GU944644	Solo	Lake Easchem, Austrália	Houbraken et al, 2010
<i>P. humuli</i>	CBS 231.38	ATCC 10452 = IFO 7726 = IMI 039817 = NRRL 872	JN617696	JN121461	KP016756	KP016787	-	Weihenstephan, Alemanha	Houbraken et al, 2011
<i>P. inflatum</i>	CBS 682.70	-	JN617710	JN606584	FJ531008	FJ531090	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. inflatum</i>	CBS 134.70	-	MH859520	-	FJ531006	FJ531092	-	Dinamarca	Vu et al, 2019
<i>P. jensenii</i>	CBS 216.28	-	MH854988	JN606629	KJ866963	KJ867000	-	Polônia	Vu et al, 2019
<i>P. jensenii</i>	CBS 130051	-	MH865724	-	-	-	-	Wyoming, EUA	Vu et al, 2019
<i>P. madriti</i>	CBS 347.61	-	MH858079	JN606586	KJ834470	-	-	Espanha	Vu et al, 2019
<i>P. madriti</i>	CBS 170.81	-	MH861319	JN406623	-	-	-	Espanha	Vu et al, 2019
<i>P. manginii</i>	CBS 253.31 ^{NT}	DTO 22E9 = NRRL 2134 =	GU944599	JN606618	JN606651	JN606381	Solo	-	Houbraken et al, 2010
<i>P. manginii</i>	CBS 108.66	DTO 22I3 = IBT 16132 = IBT 30406	JN617662	-	JN606647	JN606377	Solo	Katanga, Congo	Houbraken et al, 2011

Continua

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>P. manginii</i>	CBS 343.52	-	MH857072	-	-	JN606384	-	Norway	Vu et al, 2019
<i>P. meleagrinum</i>	NRRL 6181		EF198529	EF198540	EF198512	EF198513	-	-	Serra et al, 2008
<i>P. miczynskii</i>	CBS 220.28 ^{NT}	DTO 22E5 = ATCC 10470 = DSM 2437 = FRR 1077 = IFO 7730 = IMI 040030 = MUCL 29228 = NRRL 1077 = IBT 5491	GU944600	JN606623	JN606706	JN606526	Solo	Polônia	Houbraken et al, 2010
<i>P. miczynskii</i>	CBS 126222	DTO 16A2 = IBT 29054	MH863987	-	JN606710	JN606527	Solo	Chubut, Argentina	Vu et al, 2019
<i>P. novae zeelandiae</i>	CBS 137.41	-	JN617688	JN606598	KJ834477	KJ866996	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. novae zeelandiae</i>	CBS 546.77	-	KP016846	KP016861	KP016926	KP016828	<i>Vitis vinifera</i>	Auckland, Nova Zelândia	Visagie et al, 2006
<i>P. pasqualense</i>	CBS 122402	DTO 28C2 = IBT 29047	JN617666	JN606617	JN606674	JN606393	Ar	Averhorn, Holanda	Houbraken et al, 2011
<i>P. pasqualense</i>	CBS 126329	DTO 78B3 = IBT 17865	MH863905	-	JN606671	JN606391	Solo	Wyoming, EUA	Vu et al, 2019
<i>P. paxilli</i>	CBS 360.48 ^{NT}	DTO 31A6 = ATCC 10480 = FRR 2008 = IMI 040226 = NRRL 2008 = QM 725 = IBT 16202	GU944577	JN606610	JN606844	JN606566	Instrumento óptico	Panamá	Houbraken et al, 2010
<i>P. paxilli</i>	CBS 547.77	DTO 31A7 = ATCC 26601 = FRR 1900 = IBT 3128 = IBT 3329 = IBT 5531	JN617709	-	JN606857	JN606574	-	Geórgia, EUA	Houbraken et al, 2011
<i>P. quebecense</i>	CBS 101623 ^T	CBS H-20666 = DTO 9B8 = IBT 29050	JN617661	JN606622	JN606700	JN606509	Ar	Quebec, Canadá	Houbraken et al, 2011
<i>P. raistrickii</i>	CBS 261.33	-	JN617697	JN606589	KJ834485	KJ867006	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. raistrickii</i>	CBS 272.83	-	MH861586	-	-	-	-	Espanha	Vu et al, 2019
<i>P. raphiae</i>	CBS 126234 ^T	CBS H-20660 = DTO 78B8 = IBT 22407	JN617673	JN606619	JN606657	JN606409	Solo	Costa Rica	Houbraken et al, 2011
<i>P. rolfsii</i>	CBS 368.48	-	JN617705	JN606585	-	KF296375	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. rolfsii</i>	S2591	-	MG575494	-	-	-	Solo	-	Salihah et al, 2017

Continua

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>P. roseopurpureum</i>	CBS 266.29 ^T	DTO 9E3 = ATCC 10492 = ATHUM 2895 = FRR 2064 = IMI 040573 = MUCL 28654 = MUCL 29237 = NRRL 2064 = NRRL 2064A	MH855066	JN606613	JN606838	-	-	-	Vu et al, 2019
<i>P. roseopurpureum</i>	CBS 281.39	DTO 9E7 = FRR 2066 = MUCL 28670 = MUCL 29240 = NRRL 2066 = IBT 30783	MH856015	-	JN606839	JN606557	Material vegetal em etanol	-	Vu et al, 2019
<i>P. sanguifluum</i>	CBS 148.83	DTO 9E2 = CECT 2753	JN617689	JN606614	JN606835	JN606543	Solo sob pinheiro	Valladolid, Espanha	Houbraken et al, 2011
<i>P. sanguifluum</i>	CBS 685.85	DTO 36B9 = IJFM 19078 = IBT 4904 = IBT 10578 = IBT 10579	JN617711	JN606615	-	JN606578	Solo	Tierra del Fuego, Chile	Houbraken et al, 2011
<i>P. shearii</i>	CBS 290.48 ^T	DTO 22F6 = IMI 39739 = ATCC 10410 = NRRL 715 = IFO 6088 = IBT 24588	GU944606	JN121482	JN606840	JN606560	Solo	Tela, Honduras	Houbraken et al, 2010
<i>P. shearii</i>	CBS 118059	DTO 23H7 = KAS 2214 = IBT 30164	-	-	JN606834	JN606538	Solo	Tanzania	Houbraken et al, 2011
<i>P. shearii</i>	CBS 343.54	-	MH857352	-	JN606843	JN606565	Solo	Congo	Vu et al, 2019
<i>P. sizovae</i>	CBS 413.69 ^{NT}	DTO 23A7 = FRR 518 = IMI 140344 = VKM F-1073	GU944588	JN606603	GU944535	GU944618	Solo	Síria	Houbraken et al, 2010
<i>P. sizovae</i>	CBS 139.65	DTO 22H5	MH858522	-	GU944537	GU944622	Sal marinho	Portugal	Vu et al, 2019
<i>P. soppii</i>	CBS 226.28	-	JN617695	JN606587	-	KJ867002	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. soppii</i>	CBS 225.28	-	JN617694	JN606630	-	-	-	-	Houbraken et al, 2011
<i>P. steckii</i>	CBS 260.55 ^{NT}	DTO 22G5 = ATCC 10499 = CECT 2268 = DSM 1252 = IMI 040583 = NRRL 2140 = QM 6413	MH857476	JN606602	GU944522	GU944611	Tecido de algodão	Panama	Vu et al, 2019
<i>P. steckii</i>	CBS 325.59	DTO 22G7 = ATCC 20203 = ATCC 18307 = CECT 2273 = FRR 636 = IFO 6227 = IMI 068229 = QM 7291	GU944594	-	GU944527	GU944617	Solo	Japão	Houbraken et al, 2010
<i>P. sulphureus - soppii</i>	CBS 263.29	-	JN617698	JN606588	-	-	-	-	Houbraken et al, 2011

Continua

Espécie	Isolado	Outros códigos	ITS	GenBank ¹			Substrato/		Referência
				RPB2	BTUB	Cal	hospedeiro	Local	
<i>P. sumatrense</i>	CBS 416.69 ^T	DTO 23A8 = FRR 508 = IMI 140336 = VKM F-1069 = IBT 29648	AY213677	JN606612	-	JN606370	Solo	Damasco, Síria	Rakeman et al, 2005
<i>P. sumatrense</i>	CBS 281.36 ^T	DTO 22F1 = NRRL 779 = FRR 779 = ATCC 48669 = IBT 29658 = IBT 4978	AF033424	EF198541	EF198503	EF198522	Solo	Sumatra, Indonésia	Peterson, 1997
<i>P. sumatrense</i>	CBS 127365	DTO 99B6 = IBT 30840	MH864546	-	JN606636	JN606366	Solo	Portugal	Vu et al, 2019
<i>P. syriacum</i>	NRRL 3759	-	EF634448	EF634449	EF634446	EF634447	-	-	Peterson e Horn, 2017
<i>P. terrigenum</i>	CBS 127354 ^T	CBS H-20667 = DTO 9D4 = IBT 30769	JN617684	JN606600	JN606810	JN606583	Solo	Havaí, EUA	Houbraken et al, 2011
<i>P. tropicoides</i>	CBS 122410 ^T	DTO 10C4 = IBT 29043	GU944584	JN606608	GU944531	GU944624	Solo floresta tropical	Hua-Hin, Tailândia	Houbraken et al, 2010
<i>P. tropicoides</i>	CBS 122436	DTO 10C8	GU944583	-	GU944530	GU944623	Solo floresta tropical	Hua-Hin, Tailândia	Houbraken et al, 2010
<i>P. tropicum</i>	CBS 112584 ^T	DTO 31B1 = IBT 24580	MH862897	JN606607	GU944532	GU944625	Solo	Karnataka, Índia	Vu et al, 2019
<i>P. tropicum</i>	CBS 130379	DTO 80D3 = IBT 16462 = DMG 1004	MH865789	-	-	-	Solo	Galapagos Islands, Equador	Vu et al, 2019
<i>P. waksmanii</i>	CBS 230.28 ^{NT}	DTO 22E6 = ATCC 10516=NRRL 777 = QM 7681 = IBT 5003 = IBT 6994	GU944602	JN606627	JN606779	JN606431	Solo	Polônia	Houbraken et al, 2010
<i>P. waksmanii</i>	CBS 124295	DTO 84H6 = IBT 24654	-	-	JN606776	JN606427	Solo	Osterøy, Faroe Islands	Houbraken et al, 2011
<i>P. wellingtonense</i>	DTO 76C6 ^T	CBS H-20657 = DTO 76C6 = IBT 23557	JN617713	JN606616	JN606670	JN606395	Solo	Nova Zelândia	Houbraken et al, 2011
<i>P. westlingii</i>	CBS 231.28 ^{NT}	DTO 22E7 = IMI 092272 = IBT 15088	GU944601	JN606625	JN606718	JN606500	Solo	Poznan, Polônia	Houbraken et al, 2010
<i>P. westlingii</i>	CBS 118051	KAS 2205 = IBT 29838	JN617665	-	JN606727	JN606495	Noz	Ontario, Canadá	Houbraken et al, 2011
<i>Coccidioides immitis</i>	CBS 146.56	-	MH857553	-	KT155494	-	-	Hungria	Vu et al, 2019

¹ITS = Internal Transcription Spacer of Ribossomal, RPB2 = RNA polymerase II second largest subunit, BTUB = β -tubulina, Cal = Calmodulina.

^T = Exemplar tipo.

^{NT} = Exemplar novo tipo.

5.3 Caracterização morfológica

De acordo com a análise filogenética por Inferências Bayesiana foi indicado o isolado DCFS6 representando nova linhagem filogenética e confirmado como nova espécie de *Penicillium* por observação morfológica.

***Penicillium* sp. nov.** – DCFS6; Figura 10.

Conidióforos formados abundantemente, solitários, eretos, hialinos, emergindo a partir de hifa, constituído de um estipe seguida de aparato conidiogênico penicilado; *estipe* hialina, lisa, 85,0 × 2,5 µm. *Aparato conidiogênico* penicilado 7,0-16,0 µm de comprimento e 4,0-14 µm de largura. Conidióforo predominantemente monoverticilado, quando biverticilado apresenta ramos (-2), 10,0-20,0(-23,0) × 2,0-3,0(-3,5) µm (média 13 × 2,5 µm), cada ramo terminado na produção de 2-4(-8) fiálides. *Fiálides* ampuliformes, hialina, asseptada, 5,0-8,0(-8,5) × 2,0-3,0(-3,5) µm (média 7,0 × 2,5 µm), predominantemente em quatro. *Conídios* catenolados, subglobose ou fortemente elipsoidal, hialino, liso, 1,5-3,0(-3,5) × 2,0-3,0(-3,5) µm (média 2,5 × 2,5 µm). Presença de *esclerócio* 250 × 200 µm, globoso, pigmentado, solitários a abundantes, superficial e/ou imerso no meio, pálidos amarronzados a amarronzados. *Forma sexual não observada*.

Caracterização da cultura – colônias de crescimento lento em meio de cultura MEA (15-20 mm) e BDA (30 mm) e Sabouraud (37 mm) em 7 dias, sem formação de micélio aéreo e superficial, esporulação moderada a intensa. Em MEA colônias de coloração verde-clara ou verde-acinzentada, aveludado, bordas da colônia branca ou ausente, verso em tom bege-marrom. Em BDA colônia de coloração verde-acinzentada com borda branca bem delimitada, presença de gutulas ou ausente, verso bege ou bege-marrom com rugosidades. Em Sabouraud colônia de coloração verde-acinzentada ou cinza claro ou marrom com borda branca, presença de gutulas ou ausente, verso bege ou bege-marrom com rugosidade intensa (Figura 9).

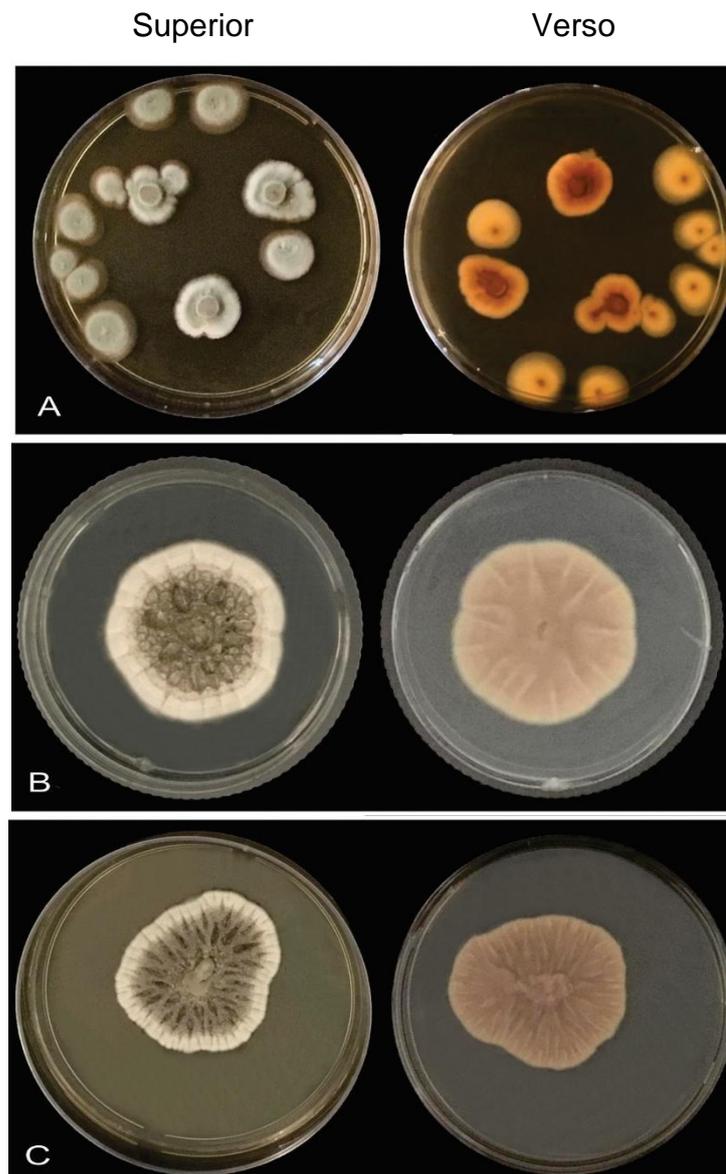


Figura 9: Cultura do isolado DCFS6, 7 dias, 25 ± 2 °C. (A) Crescimento em meio MEA, (B) BDA e (C) Sabouraud.

Espécimes examinadas – Água Fria de Goiás, Goiás, Brasil, amostra de solo do Cerrado do Centro-Oeste, Janeiro de 2009, coletado e isolado por Félix Gonçalves de Siqueira (Holótipo, DCFS6).

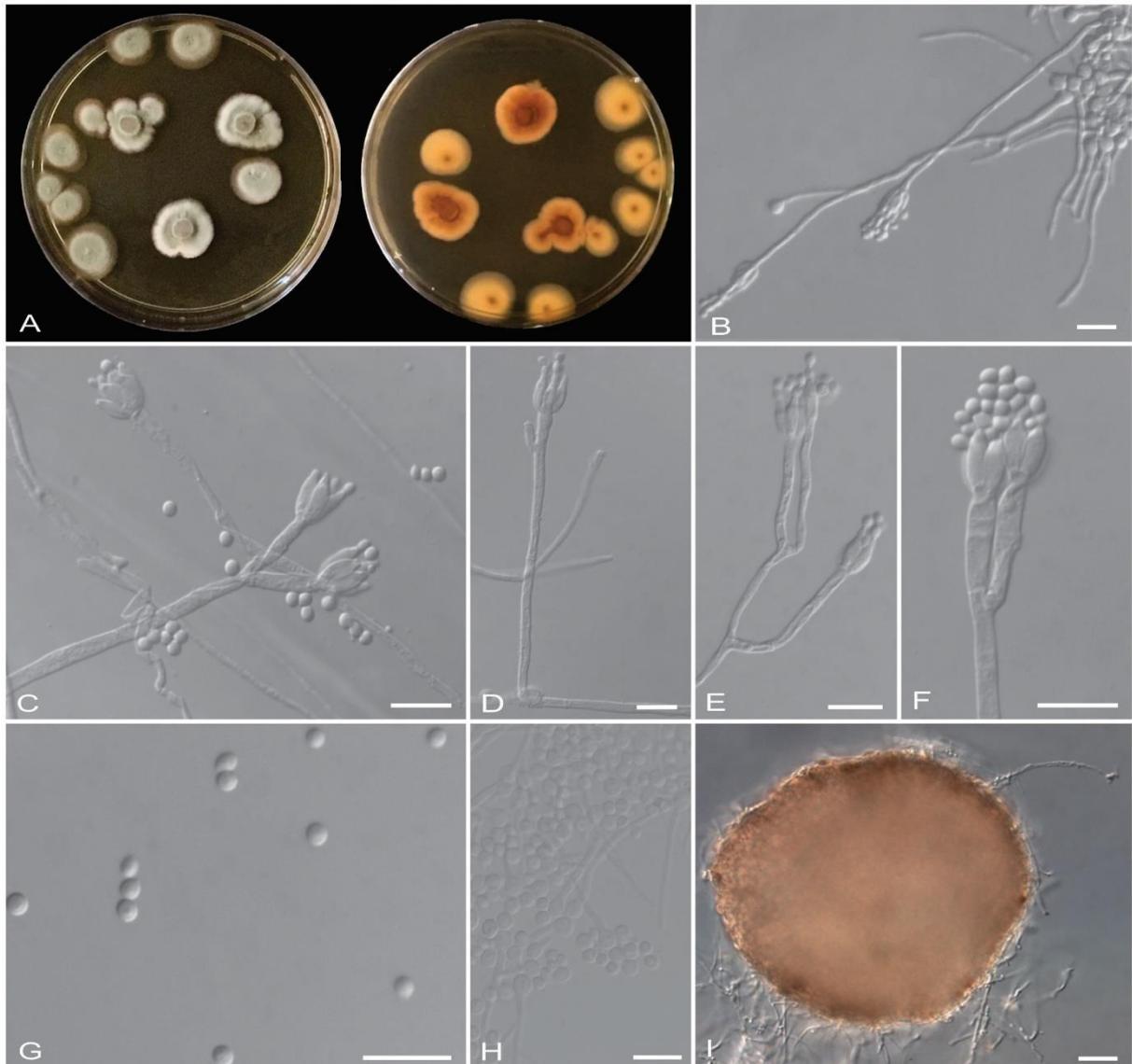


Figura 10: *Penicillium* sp. nov. A. Colônias crescidas em MEA, 7 dias, 25 ± 2 °C. B-D. Conidióforos. E-F. Aparato conidiogênico com fiálides ampuliformes. G. Conídios. H. Conídios germinados após 48 horas. I. Esclerócio. Barra de escala; B = 10 μ m (B-H), I = 50 μ m.

Notas – *Penicillium* sp. nov. é filogeneticamente próximo a *P. sumatrense*, mas se distingue deste por apresentar esclerócio; ter conidióforos predominantemente monoverticilado sem apresentar ramo adicional, quando biverticilado apresenta ramo no conidióforo igual a 2; menor comprimento da estipe (85 µm) e fiálides com (8,5-) 5,0-8,0(-8,5) × 2,0-3,0(-3,5) µm, enquanto que em *P. sumatrense* o número de ramos no conidióforo é 3-6, estipe até 200 µm de comprimento e fiálides com 8.0–10 × 2–3.5 µm (Houbraken et al., 2011).

Algumas espécies do gênero *Penicillium* foram relatadas como produtora de L-asparaginase: *Penicillium aculeatum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. claviforme*, *P. cyclopium*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. granulatum*, *P. nelicum*, *P. nigricans*, *P. olsonii*, *P. simplicissimum*, *P. urticae* (Imada et al., 1973; Gulati et al., 1997; Elshafei, et al., 2012; Alhussaini, 2013; Yadav, 2014; Chow, 2015). A produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6, identificado neste estudo como nova espécie pertencente ao gênero *Penicillium*, representa um trabalho inédito.

5.4 Amplificação da região gênica L-asparaginase

A partir do interesse de identificar a região gênica que expressa a enzima L-asparaginase, foi realizado o trabalho inicial de otimização da temperatura de anelamento com amostras do DNA genômico do fungo DCFS6. Inicialmente a temperatura verificada foi à 52 °C, correspondendo a média de temperatura indicada em consenso para todos os *primers* desenhados. Nessa condição, os *primers PenCh* e *PenD* apresentaram amplificações de fragmentos próximo de 1300 pb correspondentes à sequência de tamanho esperado para estas combinações dos *primers*. Mas, também foi observado na mesma amplificação um fragmento próximo de 500 pb. O mesmo fragmento foi a verificado com o *primer ConsPen* de forma intensa. Então, os três *primers* (*PenCh*, *PenD* e *ConsPen*) foram considerados para verificação de temperatura de anelamento para otimização. Os demais *primers* apresentaram vários ou nenhum fragmento de amplificação, e não foram considerados para posterior verificação (Figura 11).

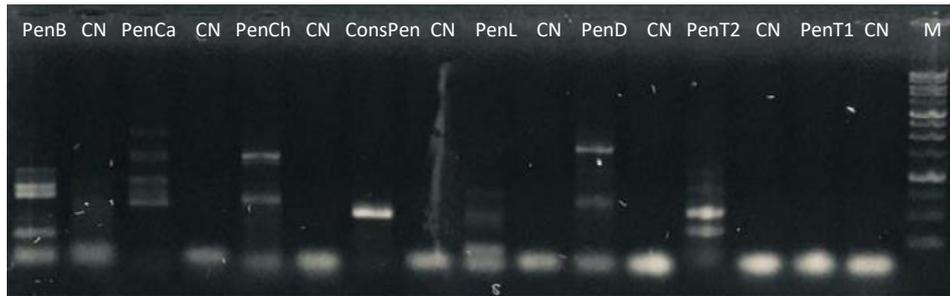


Figura 11: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers* à 52 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).

Com a finalidade de aumentar a especificidade na etapa anelamento, um aumento na temperatura foi estipulado, sendo verificada a amplificação à 55 °C. Nessa condição, o *primer PenCh* apresentou vários fragmentos de amplificação, o *PenD* não amplificou e *ConsPen* manteve a apresentação do fragmento próximo de 500 pb (Figura 12).

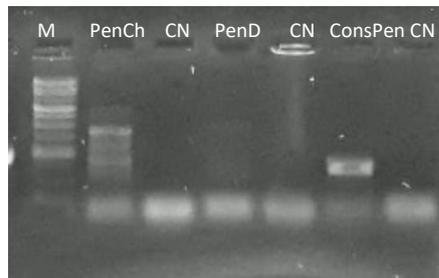


Figura 12: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers* à 55 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN).

Com esses resultados obtidos com o aumento de temperatura na etapa de anelamento, à 55 °C, foram delimitadas outras PCR para verificar o comportamento desses primers em temperaturas mais baixas de anelamento, sendo essas 50 e 48 °C. Em ambas temperaturas, os *primers* apresentaram outros fragmentos de amplificação além dos anteriormente observados indicando inadequação das temperaturas 50 e 48 °C para amplificação da região desejada (Figuras 13 e 14).

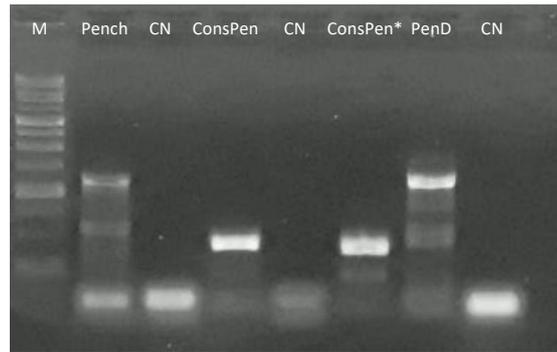


Figura 13: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers* à 50 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). * 0,5 µL DNA.

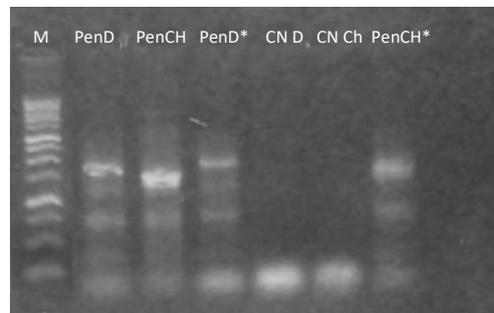


Figura 14: Perfil eletroforético em gel de agarose a 1% para os fragmentos amplificados com os *primers* à 48 °C temperatura de anelamento. Marcador 1Kb (M). Controle negativo (CN). * 0,5 µL DNA.

Das temperaturas verificadas para amplificação dos *primers* sintetizados, à 52 °C foi possível observar um fragmento próximo de 1300 pb em *PenCh* e *PenD*, nesse último, com fragmento mais intenso e definido. Sendo assim, o *primer PenD* foi considerado para etapa de purificação do fragmento de amplificação em gel de agarose. A Figura 15 apresentada corresponde aos dois fragmentos obtidos da amplificação de *PenD* próximos de 1300 pb. Os dois fragmentos (1 e 2) foram considerados para sequenciamento. O fragmento 1 não apresentou boa qualidade de sequenciamento com tamanho sequenciado de 651 pb e não apresentou equivalência ou semelhança a nenhuma sequência depositada no GenBank. O fragmento 2 corresponde a 1237 pb, tamanho próximo ao esperado para o *primer*, mas não apresentou semelhança a nenhuma sequência depositada no GenBank para L-asparaginase.

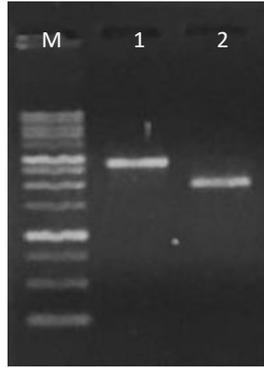


Figura 15: Purificação em gel do *primer PenD* à 52 °C. Marcador 1Kb (M). Fragmento a (1), fragmento b (2).

O *primer ConsPen* apresentou fragmento de amplificação intenso nas temperaturas 55, 52 e 50 °C próximo a 500 pb e foi considerado para sequenciamento com finalidade de identificar essa região. A região sequenciada corresponde a 463 pares de base e foi submetida a comparação com aquelas no GenBank utilizando-se o BLAST, mas não apresentou equivalência ou semelhança a nenhuma depositada.

Os resultados de amplificação com os *primers* sintetizados utilizando as temperaturas 48, 50, 52 e 55 °C não corresponderam a indicação da região gênica de L-asparaginase mesmo as PCR sendo conduzidas com MyTaq PCR Master Mix correspondente a um mix otimizado para a reação. Esses resultados podem contribuir como informações preliminares para desenho de novos experimentos quanto à amplificação da região L-asparaginase para o isolado DCFS6 e outras espécies do gênero *Penicillium*.

5.5 Produção de L-asparaginase

5.5.1 Liberação da enzima L-asparaginase

Para cada determinação foram conduzidos dois experimentos independentes com $n = 3$. A extração da enzima por maceração promoveu a liberação da enzima L-asparaginase. A atividade obtida por essa extração foi $0,20 \pm 0,002$ U/g_{células} em meio de cultivo Czapek Dox modificado e 1,89 mg/mL de proteínas totais. Em comparação com a atividade enzimática encontrada no micélio ($0,82 \pm 0,032$ U/g_{células}) do fungo DCFS6 com as mesmas condições de crescimento, a atividade enzimática por extração foi aproximadamente 4,5 vezes menor e representou diferença significativa ($p < 0,0001$) (Figura 16). A quantificação de proteínas totais identificada após extração permite considerar que ocorreu extração de proteínas da membrana fúngica. Mas que

dessas, pequena foi a parcela de L-asparaginase extraída (0,05 U/mg), ou a quantificação de L-asparaginase após extração foi comprometida.

Diversos microrganismos produzem e/ou secretam protease com finalidade de degradar proteínas (Zanphorlin et al., 2011). Ward (2012) discute em seu trabalho a desvantagem reconhecida de produção de protease por fungos filamentosos e a possível degradação de produtos proteicos (Ward, 2012). A quantificação da enzima L-asparaginase após extração de proteínas da membrana pode ser comprometida com a presença de proteases no meio. Certas proteases podem inibir a atividade da L-asparaginase por catálise e prejudicar a sua quantificação como enzima ativa.

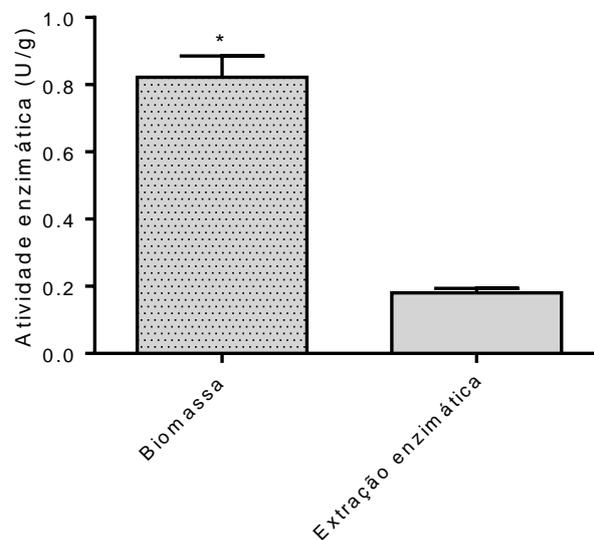


Figura 16: Comparativo de atividade de L-asparaginase do fungo DCFS6 identificada na biomassa e por extração enzimática – maceração. Teste *t*. * 1 ≠ 2, $p < 0,0001$.

A atividade enzimática identificada após a extração não representa uma possível atividade máxima produzida pelo fungo DCFS6. Por esse motivo as determinações da atividade de L-asparaginase nesse trabalho foram conduzidas a partir dos valores encontrados no micélio.

Para futuros estudos com o fungo DCFS6, sugere-se verificar novos métodos de extração enzimática, como as extrações mecânicas usando sonicador, ultrassom, homogenizador e agitação de pérolas de vidro, e o estudo de sua atividade proteolítica, como abordado por Costa-Silva (2018) no ajuste e identificação do melhor método de extração da enzima L-asparaginase por *Aspergillus terreus*. Nesse

trabalho, foram apresentados a sonicação e agitação de pérolas de vidro como os métodos mais eficazes de extração para o fungo filamentosos (Costa-Silva et al., 2018).

5.5.2 Planejamento experimental por Plackett-Burman Design (PBD)

A otimização do meio de cultivo submerso visa ao aumento da atividade de L-asparaginase a partir da identificação do meio ótimo para a produção da enzima. Com isso, o desenho experimental do planejamento Plackett-Burman foi empregado para identificar as variáveis que mais influenciam na produção da L-asparaginase. No planejamento diferentes parâmetros do processo de cultivo que influenciam o rendimento enzimático foram analisados, totalizando 11 variáveis. O desenho experimental estatístico de Plackett-Burman (Plackett e Burman, 1946) é um projeto que pode identificar parâmetros físico-químicos necessários, além de ser útil para rastrear o máximo de fatores importantes em relação aos seus principais efeitos utilizando a menor quantidade de corridas experimentais possíveis (Krishnan et al., 1998).

As atividades enzimáticas de L-asparaginase segundo o planejamento experimental por PBD do isolado DCFS6 estão apresentadas na Tabela 6, representadas por média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos variam de 0,47 a 1,77 U/g_{células}. Essa maior atividade enzimática foi observada em meio de cultivo composto por L-asparagina 3,0 %, L-prolina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, sulfato de amônio 1,5 %, peptona 2,0 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 %, cloreto de potássio 0,01 %, e com relação C:N de 1,91. Essa relação carbono:nitrogênio correlaciona a necessidade do fungo no meio de cultivo para obter a maior produção enzimática em aproximadamente duas vezes mais carbono que nitrogênio.

As variáveis que apresentam coeficiente de regressão positiva representam um aumento na atividade de L-asparaginase devido ao aumento de suas concentrações. O contrário acontece com a apresentação negativa do coeficiente de regressão representando uma diminuição da atividade de L-asparaginase devido ao aumento das concentrações dessas variáveis (Baskar et al., 2012). As variáveis L-asparagina, L-prolina, ureia, sulfato de amônio, peptona, glicose e sacarose, possivelmente aumentaram a atividade da L-asparaginase em seu nível mais alto por apresentarem efeito positivo, enquanto as variáveis com efeito negativo, cloreto de potássio e nitrato

de sódio, possivelmente diminuem a atividade da L-asparaginase em seu nível mais alto. E ainda, o extrato de levedura apresentou efeito nulo quanto à atividade da L-asparaginase (Tabela 7).

As variáveis significativas ($p < 0,1$) na atividade da L-asparaginase foram identificadas como L-prolina ($p = 0,04$) e cloreto de potássio ($p = 0,08$). Dessas significâncias, a L-prolina teve efeito positivo na produção de L-asparaginase, ao contrário de cloreto de potássio. No meio que obteve maior atividade enzimática (corrida 9) a L-prolina está no maior nível e cloreto de potássio no menor nível.

Tabela 6: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental Plackett-Burman pelo fungo DCFS6.

Corrida	Níveis (%)											Atividade de L-asparaginase (U/gcélulas)	Relação C:N
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}		
1	3	1	0,1	1	0,5	0,5	1	0,2	0,2	0,5	0,03	0,84 ± 0,14	2,06
2	3	3	0,1	1	0,1	1,5	1	0	0,2	2	0,01	1,09 ± 0,05	2,37
3	3	3	0,5	1	0,1	0,5	2	0	0	2	0,03	1,27 ± 0,02	2,47
4	3	3	0,5	2,5	0,1	0,5	1	0,2	0	0,5	0,03	0,72 ± 0,02	1,84
5	1	3	0,5	2,5	0,5	0,5	1	0	0,2	0,5	0,01	1,36 ± 0,07	1,93
6	3	1	0,5	2,5	0,5	1,5	1	0	0	2	0,01	1,13 ± 0,02	1,62
7	1	3	0,1	2,5	0,5	1,5	2	0	0	0,5	0,03	0,84 ± 0,10	1,90
8	3	1	0,5	1	0,5	1,5	2	0,2	0	0,5	0,01	1,13 ± 0,06	1,69
9	3	3	0,1	2,5	0,1	1,5	2	0,2	0,2	0,5	0,01	1,77 ± 0,04	1,91
10	1	3	0,5	1	0,5	0,5	2	0,2	0,2	2	0,01	1,67 ± 0,02	2,85
11	1	1	0,5	2,5	0,1	1,5	1	0,2	0,2	2	0,03	0,47 ± 0,09	1,65
12	3	1	0,1	2,5	0,5	0,5	2	0	0,2	2	0,03	0,64 ± 0,13	2,14
13	1	3	0,1	1	0,5	1,5	1	0,2	0	2	0,03	1,12 ± 0,07	2,62
14	1	1	0,5	1	0,1	1,5	2	0	0,2	0,5	0,03	1,08 ± 0,04	1,62
15	1	1	0,1	2,5	0,1	0,5	2	0,2	0	2	0,01	0,90 ± 0,07	2,24
16	1	1	0,1	1	0,1	0,5	1	0	0	0,5	0,01	0,51 ± 0,09	1,96
17	2	2	0,3	1,75	0,3	1	1,5	0,1	0,1	1,25	0,02	0,95 ± 0,04	2,04
18	2	2	0,3	1,75	0,3	1	1,5	0,1	0,1	1,25	0,02	1,43 ± 0,04	2,04
19	2	2	0,3	1,75	0,3	1	1,5	0,1	0,1	1,25	0,02	1,34 ± 0,05	2,04

L-asparagina (X_1), L-prolina (X_2), ureia (X_3), nitrato de sódio (X_4), extrato de levedura (X_5), sulfato de amônio (X_6), peptona (X_7), glicose (X_8), sacarose (X_9), extrato de malte (X_{10}) e cloreto de potássio (X_{11}).

Tabela 7: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental Plackett-Burman pelo fungo DCFS6.

Variável	Efeito	Erro Padrão	t calculado	Valor p
Média	1,03	0,07	13,80	0,00
Curvatura	0,41	0,38	1,08	0,32
L-asparagina (x_1)	0,08	0,15	0,53	0,62
L-prolina (x_2)	0,39	0,15	2,62	0,04
Ureia (x_3)	0,14	0,15	0,92	0,39
Nitrato de sódio (x_4)	-0,11	0,15	-0,73	0,49
Extrato de levedura (x_5)	0,12	0,15	0,77	0,47
Sulfato de amônio (x_6)	0,09	0,15	0,59	0,58
Peptona (x_7)	0,26	0,15	1,73	0,13
Glicose (x_8)	0,09	0,15	0,58	0,58
Sacarose (x_9)	0,16	0,15	1,08	0,32
Extrato de Malte (x_{10})	0,00	0,15	0,03	0,98
Cloreto de Potássio (x_{11})	-0,32	0,15	-2,13	0,08

Tendo em vista que esse método corresponde a uma técnica preliminar de otimização, que analisa apenas dois níveis de cada variável, não pode oferecer a quantidade ideal de cada variável para compor o meio (Yu et al., 1997). Em continuidade a otimização do meio de cultivo do isolado DCFS6 as variáveis com efeito positivo foram consideradas para o planejamento Delineamento Fatorial Fracionado.

5.5.3 Planejamento experimental por Delineamento Fatorial Fracionado (DFF)

A partir dos resultados do planejamento PBD, seguindo com oito variáveis com efeito positivo o desenho experimental Delineamento Fatorial Fracionado foi empregado para otimização do meio de cultivo para a produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. As atividades enzimáticas de L-asparaginase segundo esse planejamento estão apresentadas na Tabela 8, representadas por média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos variam de 1,10 a 2,36 U/g_{células}. Essa maior atividade enzimática corresponde a 1,33 vez maior que a atividade máxima obtida no planejamento PBD (1,77 U/g_{células} \pm 0,04) e foi observada em meio de cultivo composto por L-prolina 5,0 %, peptona 2,0 %, sacarose 0,2 %, ureia 2,0 %, sulfato de amônio 2,0 %, extrato de levedura 1,5 %, glicose 1,0%, L-asparagina 3,0 %, com relação de

C:N de 1,7. Essa relação C:N é próxima a identificada na corrida de maior atividade no planejamento PBD (C:N 1,91).

As variáveis independentes que apresentaram efeito positivo foram L-prolina, sulfato de amônio e L-asparagina em seus níveis superiores aumentando a atividade de L-asparaginase, ao oposto que as variáveis peptona, sacarose, ureia, extrato de levedura e glicose apresentaram efeito negativo (Tabela 9). A análise de variância ($p < 0,1$) indicou significância para sulfato de amônio ($p = 0,02$), o qual se encontra em seu maior nível na corrida (10) que obteve atividade máxima de L-asparaginase.

Dos resultados obtidos no planejamento DFF foram consideradas as variáveis com efeito positivo para o desenho do DCCR. O DFF corresponde ao delineamento tipo screening que antecede a um experimento final (Rodrigues e lemma, 2014) e pode oferecer a quantidade ideal de cada variável para compor o meio ótimo na produção de L-asparaginase.

Tabela 8: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental DFF pelo fungo DCFS6.

Corrida	Níveis (%)								Atividade de L-asparaginase (U/gcélulas)	Relação C:N
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈		
1	3	2	0,2	0,5	0,5	1,5	0,2	3	1,36 ± 0,04	2,29
2	5	2	0,2	0,5	0,5	3	1	5	1,76 ± 0,03	2,56
3	3	4	0,2	0,5	2	1,5	1	5	2,13 ± 0,05	1,90
4	5	4	0,2	0,5	2	3	0,2	3	2,01 ± 0,07	2,08
5	3	2	1	0,5	2	3	1	3	1,39 ± 0,04	2,02
6	5	2	1	0,5	2	1,5	0,2	5	1,88 ± 0,01	1,98
7	3	4	1	0,5	0,5	3	0,2	5	1,64 ± 0,08	2,49
8	5	4	1	0,5	0,5	1,5	1	3	1,27 ± 0,12	2,88
9	3	2	0,2	2	2	3	0,2	5	1,96 ± 0,00	1,53
10	5	2	0,2	2	2	1,5	1	3	2,36 ± 0,08	1,70
11	3	4	0,2	2	0,5	3	1	3	1,10 ± 0,06	2,11
12	5	4	0,2	2	0,5	1,5	0,2	5	1,50 ± 0,04	2,06
13	3	2	1	2	0,5	1,5	1	5	1,52 ± 0,02	2,00
14	5	2	1	2	0,5	3	0,2	3	1,32 ± 0,07	2,19
15	3	4	1	2	2	1,5	0,2	3	2,06 ± 0,02	1,64
16	5	4	1	2	2	3	1	5	1,12 ± 0,06	1,93
17	4	3	0,6	1,25	1,25	2,25	0,6	4	1,01 ± 0,04	2,04
18	4	3	0,6	1,25	1,25	2,25	0,6	4	0,94 ± 0,03	2,04
19	4	3	0,6	1,25	1,25	2,25	0,6	4	1,15 ± 0,02	2,04
20	4	3	0,6	1,25	1,25	2,25	0,6	4	0,91 ± 0,05	2,04

L-prolina (X₁), peptona (X₂), sacarose (X₃), ureia (X₄), sulfato de amônio (X₅), extrato de levedura (X₆), glicose (X₇) e L-asparagina (X₈).

Tabela 9: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental DFF pelo fungo DCFS6.

Nome	Efeito	Erro padrão	t calculado	p valor
Média	1,65	0,08	21,71	0,00
Curvatura	-1,29	0,34	-3,79	0,00
L-prolina (x ₁)	0,01	0,15	0,03	0,97
Peptona (x ₂)	-0,09	0,15	-0,58	0,58
Sacarose (x ₃)	-0,25	0,15	-1,64	0,13
Ureia (x ₄)	-0,06	0,15	-0,39	0,71
Sulfato de amônio (x ₅)	0,43	0,15	2,84	0,02
Extrato de levedura (x ₆)	-0,22	0,15	-1,48	0,17
Glicose (x ₇)	-0,13	0,15	-0,89	0,40
L-asparagina (x ₈)	0,08	0,15	0,53	0,60

5.5.4 Produção de L-asparaginase por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

A partir das variáveis com efeito positivo apresentadas pelo planejamento DFF (L-prolina, sulfato de amônio e L-asparagina) foi desenhado o planejamento experimental por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). E, considerando que um meio composto apenas por essas variáveis seria pobre em nutrientes para o crescimento do fungo, foram mantidas as variáveis com efeito negativo nos seus níveis desenhado pelo DFF para a corrida com maior atividade para L-asparaginase (peptona 2,0 %, sacarose 0,2 %, ureia 2,0 %, extrato de levedura 1,5 %, e glicose 1,0 %). Essa escolha justifica-se pela reprodução da mesma corrida no novo planejamento.

As atividades de L-asparaginase segundo esse planejamento estão apresentadas na Tabela 10, representadas por média \pm desvio padrão. Os resultados obtidos variam de 1,03 a 1,72 U/g_{células}.

Tabela 10: Atividade de L-asparaginase conforme planejamento experimental DCCR pelo fungo DCFS6.

Corrida	Níveis (%)			Atividade de L-asparaginase (U/g _{células})	Relação C:N
	X ₁	X ₂	X ₃		
1	5	3	2	1,52 \pm 0,01	1,98
2	7	3	2	1,55 \pm 0,07	2,15
3	5	7	2	1,03 \pm 0,02	1,92
4	7	7	2	1,43 \pm 0,02	2,06
5	5	3	4	1,44 \pm 0,04	1,74
6	7	3	4	1,51 \pm 0,02	1,91
7	5	7	4	1,72 \pm 0,06	1,73
8	7	7	4	1,67 \pm 0,05	1,87
9	4,318207	5	3	1,26 \pm 0,01	1,78
10	7,681793	5	3	1,23 \pm 0,00	2,04
11	6	1,636414	3	1,52 \pm 0,00	1,96
12	6	8,363586	3	1,11 \pm 0,01	1,88
13	6	5	1,318207	1,37 \pm 0,08	2,11
14	6	5	4,681793	1,37 \pm 0,10	1,75
15	6	5	3	1,51 \pm 0,02	1,91
16	6	5	3	1,48 \pm 0,00	1,91
17	6	5	3	1,38 \pm 0,02	1,91
18	6	5	3	1,68 \pm 0,02	1,91

L-prolina (X₁), L-asparagina (X₂), sulfato de amônio (X₃).

A atividade máxima de L-asparaginase encontrada pelo planejamento DCCR (1,72 U/g_{células}) corresponde a 1,37 vez menor que a atividade obtida no planejamento DFF (2,36 U/g_{células} ± 0,08), e não foi possível observar variação significativa entre as atividades enzimáticas nas diferentes corridas desenhadas. Isso pode ser explicado pelo fato de algumas variáveis com efeito negativo (ureia e glicose) não terem sido mantidas no seu menor nível e sim no nível da melhor corrida desenhada pelo DFF. Dias e Sato (2016) para executar a etapa de otimização de produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* fixou os fatores com efeito negativo no seu ponto mínimo (-1) e os fatores que promoveram efeito positivo e não foram significativos foram fixados no ponto central (0). Em resultado, nesse trabalho, a atividade de L-asparaginase, no delineamento final de otimização, variou de 9,44 U/mL a 67,49 U/mL (Dias e Sato, 2016).

A análise de variância, apresentada na Tabela 11, indicou falta de significância ($p < 0,05$) para as três variáveis e suas combinações.

Tabela 11: Efeito das variáveis sobre a produção de L-asparaginase conforme planejamento experimental DCCR pelo fungo DCFS6.

Variável	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p valor
Média	1,50	0,09	16,37	0,00
x_1	0,03	0,05	0,58	0,58
x_1^2	-0,05	0,05	-1,06	0,32
x_2	-0,06	0,05	-1,27	0,24
x_2^2	-0,03	0,05	-0,56	0,59
x_3	0,06	0,05	1,19	0,27
x_3^2	-0,01	0,05	-0,20	0,85
$x_1 \cdot x_2$	0,03	0,07	0,49	0,64
$x_1 \cdot x_3$	-0,05	0,07	-0,76	0,47
$x_2 \cdot x_3$	0,13	0,07	2,02	0,08

L-prolina (X_1), L-asparagina (X_2), sulfato de amônio (X_3)

$$\text{Atividade L-asparaginase} = 1,50 + 0,03X_1 - 0,05X_1^2 - 0,06X_2 - 0,03X_2^2 + 0,06X_3 - 0,01X_3^2 + 0,03X_1 X_2 - 0,05X_1 X_3 + 0,13 X_2 X_3$$

Os resultados do ANOVA para um modelo que ajusta a curvatura calculados pelo software *Protimiza Experimental Design* com efeito nas atividades enzimáticas obtidas pelo fungo DCFS6 demonstradas na Tabela 12 sugerem que a falta de ajuste

($F_{\text{calc}} 2,91$) não é significativa ($p > 0,05$) em relação ao erro puro, indicando que o modelo pode ser utilizado para prever o efeito de cada variável na resposta (Rodrigues e lemma, 2005). Mas o valor F do modelo de 1,05 implica que o modelo não é significativo. Existe 47,58% de chances do valor F do modelo pode ocorrer devido ao ruído. O valor de r^2 obtido foi de 0,5425 indicado que os dados se adequam somente à 54,25% do modelo. Comparando os valores experimentais e com os preditos é observada fraca correlação linear.

Tabela 12: ANOVA para o modelo completo do planejamento experimental DCCR do fungo DCFS6.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	p valor
Regressão	0,321	9	0,036	1,054	0,476
Resíduos	0,271	8	0,034		
Falta de Ajuste	0,224	5	0,045	2,907	0,204
Erro Puro	0,046	3	0,015		
Total	0,592	17			

Pelos dados obtidos na análise de variância a partir do planejamento proposto, não se permite obter um modelo matemático que gere uma superfície de resposta e determinar as concentrações otimizadas dos substratos para o meio de cultivo. No entanto, foi possível, durante as análises dos planejamentos utilizados, identificar os substratos L-prolina e sulfato de amônio como variáveis independente significativas com efeito positivo na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. Apesar dos baixos efeitos determinados na equação, a mesma identificação pode ser observada para efeito positivo das variáveis L-prolina e sulfato de amônio.

Em estudos semelhantes de investigação dos componentes de meio de cultivo com fungos filamentosos, as variáveis L-prolina e sulfato de amônio também foram identificadas com efeito positivo na produção da enzima L-asparaginase. Sarquis e colaboradores (2004) em trabalho de investigação da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos, identificou maior nível de atividade enzimática por *Aspergillus terreus* e *A. tamarri* em meio com fonte de nitrogênio por L-prolina na concentração 2%. Outro trabalho de otimização com *Aspergillus terreus* em cultivo submerso, por Baskar e Renganathan (2012), o componente L-prolina foi identificado como variável significativa no delineamento inicial usando o planejamento experimental Plackett-

Burman. Em resultado final a otimização dos componentes do meio de cultivo a maior atividade de L-asparaginase obtida foi 40,85 U/mL com L-prolina a 1,7%. Tippani e Sivadevuni (2012) com objetivo de analisar a influência de fontes de carbono e nitrogênio na produção de L-asparaginase por espécies de *Fusarium*, identificou L-prolina como melhor fonte de nitrogênio para *F. semitectum* (404 UI/mL) e *F. moniliforme* (376 IU/mL). El-Refai et al. (2014) em estratégia de otimização da produção de L-asparaginase por *Penicillium cyclopium* aplicando planejamento experimental identificou na fase de delineamento inicial a variável sulfato de amônio como fator significativo de efeito positivo, além das variáveis $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e KCl. Nesse estudo, o meio de cultivo que apresentou maior atividade enzimática era composto por sacarose 1,0 g/L, L-asparagina 0,5 g/L, $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0,75 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,72 g/L, KCl 0,72 g/L, sulfato de amônio 11,7 g/L por um período de 3 dias. Em estudo com *Aspergillus terreus*, Aparna e Raju (2015), na etapa de análise dos efeitos de fontes de nitrogênio na produção de L-asparaginase, identificou maior atividade enzimática na presença do substrato sulfato de amônio no meio de cultivo sólido, e esse maior rendimento foi obtido na suplementação de sacarose (1%), sulfato de amônio (1%), NaCl (1%) e L-asparagina (1%).

No desenvolvimento das corridas desenhadas pelos planejamentos experimentais propostos, foi possível identificar meios que apresentam atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6 maior que o encontrado no meio Czapek Dox modificado (Figura 17). A comparação entre os meios foi conduzida com dois experimentos independentes com $n = 3$. Para análise estatística foi usado o software GraphPad Prism® Version 6.01 e a partir da avaliação da distribuição dos dados, foi aplicado teste paramétrico - ANOVA (dados com distribuição normal representados por média e desvio padrão). A diferença significativa foi considerada para os valores de $p < 0,05$.

No planejamento PBD, a corrida 9 ($1,77 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,04$) corresponde aproximadamente a uma atividade enzimática 4 vezes maior em comparação ao encontrado no meio Czapek Dox modificado ($0,44 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,04$). Ainda, em comparação ao meio Czapek Dox modificado, no planejamento DFF a corrida 10 ($2,36 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,08$) corresponde aproximadamente a uma atividade enzimática 5,4 vezes maior. Por análise estatística observou-se diferença significativa entre essas duas corridas identificadas em PBD e DFF em comparação atividade enzimática obtida em meio Czapek Dox modificado.

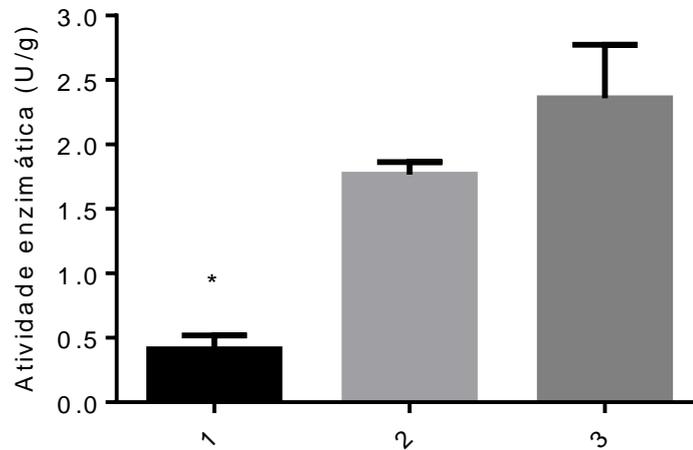


Figura 17: Barras representando a atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6 nos meios (1) Czapek Dox modificado, (2) corrida 9 pelo PBD - L-asparagina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, peptona 1,5 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 % e cloreto de potássio 0,01 %, K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%, e (3) corrida 10 pelo DFF - L-prolina 5,0 %, peptona 2,0 %, sacarose 0,2 %, ureia 2,0 %, sulfato de amônio 2,0 %, extrato de levedura 1,5 %, glicose 1,0%, L-asparagina 3,0 %, K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%. ANOVA. Média \pm desvio padrão, $p < 0,05$. *1 \neq 2 e 3.

Em trabalho de produção de L-asparaginase por *Penicillium cyclopium*, El-Refai e colaboradores (2014), obtiveram após otimização 160 UI/mL da atividade enzimática em meio de cultivo composto por sacarose 1,0 g/L, L-asparagina 0,5 g/L, $KH_2PO_4 \cdot 7H_2O$ 0,75 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,72 g/L, KCl 0,72 g/L, sulfato de amônio 11,7 g/L em um intervalo de 3 dias. A determinação da atividade enzimática foi conduzida utilizando o método proposto por Imada et al. (1973) a partir da quantificação de amônia livre usando sobrenadante após o crescimento do fungo em meio submerso.

No entanto, a diferença de metodologia utilizada para a determinação da atividade enzimática dificulta a comparação entre os resultados. O método proposto por Imada e colaboradores (1973) quantifica a liberação de amônia no meio de cultivo como produto da reação por L-asparaginase. Entende-se que, amônia pode ser um produto de metabolismo de diversos substratos presente no meio de cultivo. Então, pode haver alterações que superestimem a atividade enzimática quando determinada por esse método. E, vale ressaltar que a metodologia proposta por Imada et al. (1973)

pode ser corretamente aplicada na quantificação da L-asparaginase purificada, em que não existe a interferência da amônia livre no método.

Quanto as relações carbono:nitrogênio, nas corridas deste planejamento com maior produção de L-asparaginase, é observada a relação 1,91 (corrida 9 em PBD) e 1,70 (corrida 10 em DFF). E, analisando todas as corridas do planejamento e suas relações carbono:nitrogênio, não foi possível perceber uma correlação entre o aumento dessa relação com o aumento da atividade de L-asparaginase produzida pelo isolado DCFS6. Considerando isso, pode-se sugerir a correlação da produção de L-asparaginase, pelo isolado DCFS6, ao tipo de substrato, e não a relação carbono:nitrogênio do meio de cultivo. Em relatos anteriores, foi abordado sobre a produção da enzima L-asparaginase II sob a regulação de fontes de nitrogênio disponíveis no meio, conferindo característica não constitutiva (Drainas, C.; Kinghorn; Pateman, 1977; e Sarquis et al., 2004).

5.5.5 Determinação de efeito independente de L-prolina e Sulfato de amônio

Para a diferenciação entre as concentrações dos substratos (L-prolina e sulfato de amônio) foi aplicado o teste de ANOVA – Kruskal-Wallis, teste não paramétrico com a representação dos dados por mediana e amplitude considerando a diferença significativa para os valores de $p < 0,05$.

O efeito do substrato L-prolina na produção de L-asparaginase em meio Czapek Dox modificado foi verificado com 3 experimentos independentes, sendo dois deles com $n = 3$ e um com $n = 2$, respeitando as mesmas condições. O gráfico da Figura 18 representa o efeito do substrato L-prolina por mediana e amplitude dos dados.

No comportamento pode-se observar graficamente a relação de efeito positivo no aumento da concentração de L-prolina sob o aumento da atividade de L-asparaginase. Os resultados apresentados sugerem uma correlação no aumento da atividade de L-asparaginase sob o efeito do aumento da concentração do substrato L-prolina. Dentre as concentrações verificadas, L-prolina a 7% apresenta diferença significativa em relação à concentração de 1,71% e 3%. Se observa atividade mediana de L-asparaginase em 1,74 U/g_{células} à 7% correspondendo a aproximadamente 4 vezes maior a atividade identificada nas concentrações menores (1,71% e 3%).

Dentre as concentrações verificadas, por análise estatística, L-prolina a 7% não se diferenciou de 5%. Então o substrato L-prolina na concentração 5% pode corresponder a um aumento de atividade com a necessidade de menor concentração no meio de cultivo.

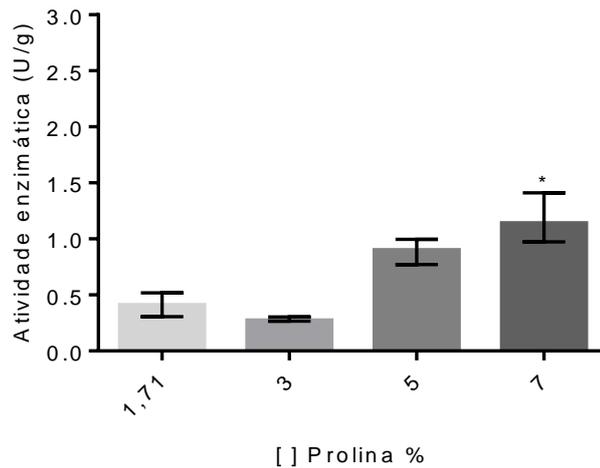


Figura 18: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina sob a atividade de L-asparaginase em meio CDM. Teste Kruskal-Wallis. *7 \neq 1,71 e 3 ($p < 0,05$).

Considerando a oportunidade de verificar o efeito do substrato L-prolina em meio mais enriquecido em comparação com Czapek Dox modificado, foi utilizado o meio identificado na corrida 9 que apresentou maior atividade enzimática no planejamento PBD (L-asparagina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, peptona 1,5 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 % e cloreto de potássio 0,01 %, K₂HPO₄ 0,152%, MgSO₄.7H₂O 0,052%, ZnSO₄.7H₂O 0,001%, FeSO₄.7H₂O 0,001% e CuSO₄.5H₂O 0,052%). Assim, foi possível verificar o comportamento desses substratos com mais fontes de carbono e nitrogênio.

O efeito do substrato L-prolina na produção de L-asparaginase na corrida 9 do PBD está representado na Figura 19 por mediana e amplitude dos dados, baseado no comportamento verificado em 3 experimentos independentes com $n = 3$, respeitando as mesmas condições. Por análise estatística, o substrato L-prolina em concentração 9% diferencia-se significativamente em relação a 3% e 7%. A atividade enzimática mediana em 9% corresponde a aproximadamente 1,6 vez maior que a atividade

encontrada em concentração menor. Por análise estatística, 5% não se diferencia de 9%, mas graficamente representa um aumento na atividade de L-asparaginase com o uso de menos substrato quando comparado a 9%.

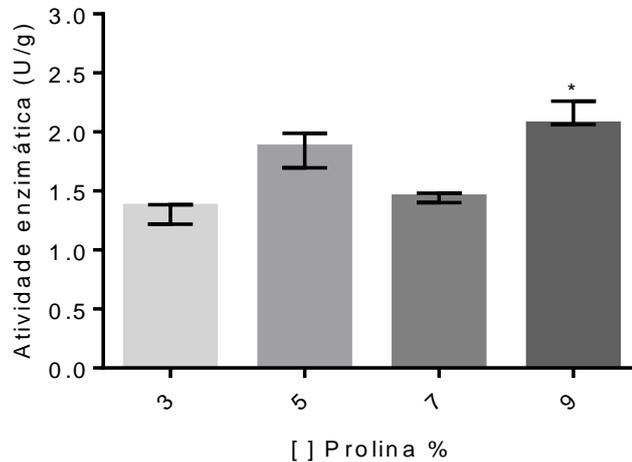


Figura 19: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 3%, 5%, 7% e 9%. Teste Kruskal-Wallis. *9 ≠ 3 e 7 ($p < 0,05$).

No meio de cultivo com concentração 7% a morfologia da biomassa crescida é diferente das demais nas outras concentrações. A diminuição da atividade enzimática observada do cultivo a 5% para 7% pode estar relacionada a essa diferença morfológica. El-Enshasy, Kleine e Rinas (2006) identificaram a correlação do aumento da capacidade de produção de proteína com a diferença de morfologia no crescimento do fungo filamentosso *Aspergillus niger* em meio de cultivo submerso.

Com interesse de identificar o comportamento do efeito do substrato L-prolina em concentrações maiores que as verificadas, foi realizada outra análise, com 3 experimentos independentes e $n = 3$, utilizando a corrida 9 que apresentou maior atividade enzimática no planejamento PBD desenhado neste trabalho, com L-prolina nas concentrações 3%, 15% e 20%.

O efeito dos resultados para o substrato L-prolina está representado na Figura 20. Em comparação estatística com a concentração inicial de 3%, as concentrações 15% e 20% não representam diferença significativa. Quando comparado com os resultados gráficos anteriores (3, 5, 7 e 9%), sugeri uma queda na atividade de L-asparaginase para as concentrações 15% e 20%. Lang e colaboradores (1997), em estudo de otimização de síntese enzimática por levedura, *Saccharomyces cerevisiae*,

verificaram a quantidade de fonte de nitrogênio no cultivo e discutiram sobre o efeito indesejável do aumento dos íons amônio no metabolismo celular. O excesso de moléculas de amônia pode conduzir a uma repressão catabólica por nitrogênio nas células.

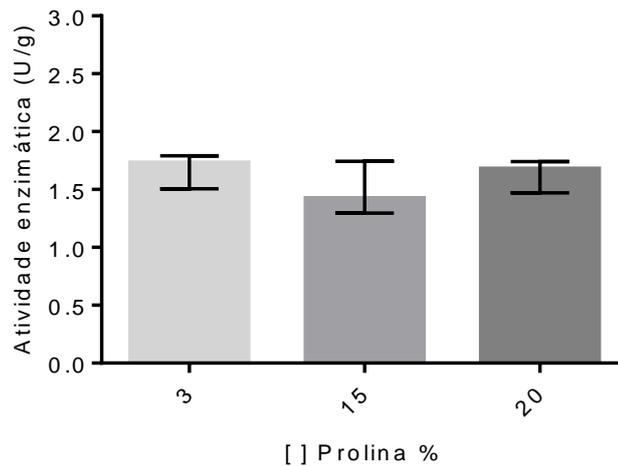


Figura 20: Gráfico de barras representando o efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 3%, 15% e 20%. Teste Kruskal-Wallis.

Durante a verificação do efeito de L-prolina nas concentrações 3%, 15% e 20%, pode-se observar uma possível influência do aumento das concentrações desses substratos no crescimento da biomassa do fungo DCFS6.

O resultado do efeito das concentrações 3%, 15% e 20% de L-prolina sob o crescimento da biomassa fúngica está representado na Figura 21 por média dos resultados. Por representação gráfica, observa-se efeito negativo no aumento das concentrações de L-prolina sob o crescimento da biomassa. Na concentração de 3% produz aproximadamente 32 g/L de biomassa e apresenta redução de produção para aproximadamente 18 g/L em 20%. Essa queda de produção, pode sugerir uma resposta inibitória de L-prolina sob o crescimento de biomassa pelo fungo DCFS6 nessas concentrações verificadas.

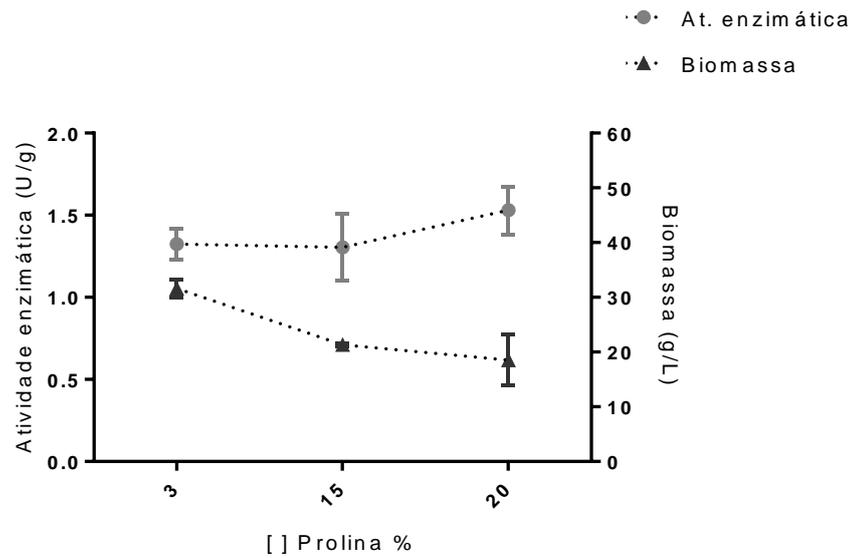


Figura 21: Gráfico representando o efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase e o crescimento de biomassa pelo fungo DCFS6.

De forma complementar, a Figura 22 apresenta o gráfico representativo dos experimentos conduzidos nesse item para verificação do efeito do substrato L-prolina sob atividade de L-asparaginase pelo isolado DCFS6.

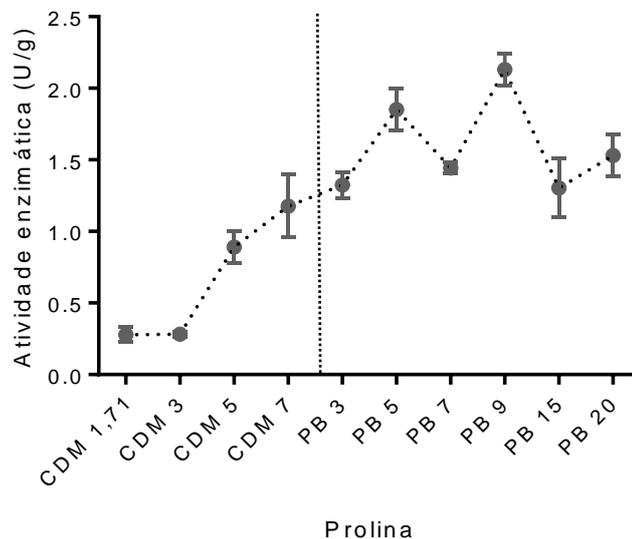


Figura 22: Gráfico representativo do efeito de L-prolina na atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. (CDM) meio Czapek Dox modificado, (PB) meio corrida 9 do Plackett Burman; seguidos das concentrações de L-prolina.

A mesma estratégia utilizada para verificar o efeito do substrato L-prolina sob o a atividade de L-asparaginase foi utilizada para identificar o efeito do substrato sulfato de amônio na produção da enzima. Inicialmente foram conduzidos 3 experimentos independentes sendo dois deles com $n = 3$ e um com $n = 2$, respeitando as mesmas condições em meio Czapek Dox modificado. O efeito do substrato sulfato de amônio nesse meio está representado na Figura 23 por mediana e amplitude dos dados.

Por representação gráfica pode-se observar a relação de efeito positivo no aumento da concentração de sulfato de amônio sob o aumento da atividade de L-asparaginase. Dentre as concentrações verificadas, o substrato sulfato de amônio à 7% apresenta diferença significativa em relação a concentração a ausência do substrato (0%) e 3%. A atividade enzimática mediana na concentração 7% corresponde a aproximadamente 2 vezes maior do que nas demais concentrações verificadas.

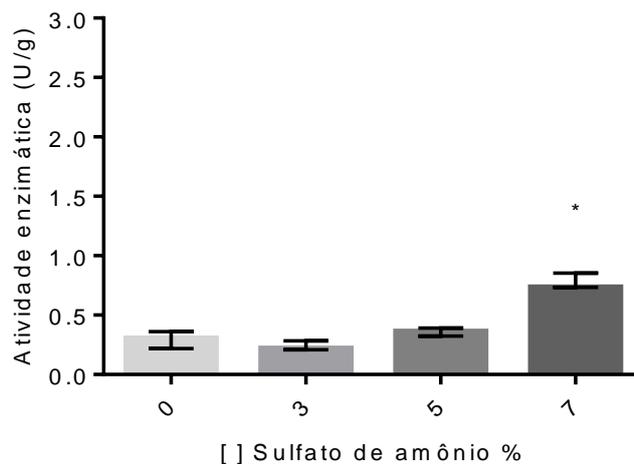


Figura 23: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob atividade de L-asparaginase em meio CDM. Teste Kruskal-Wallis. *7 \neq 0 e 3 ($p < 0,05$).

Em comparação com o resultado identificado para L-prolina em meio Czapek Dox modificado, o efeito do sulfato de amônio sobre o aumento da atividade L-asparaginase exige maior concentração do substrato. Tudzynshi (2014), em revisão da literatura sobre a regulação nos metabolismos secundários dos fungos, abordou a influência da quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio sob o crescimento e desenvolvimento do fungo, e na formação de vários metabólitos. Essa abordagem

pode sugerir, em observação aos resultados com as diferentes fontes de nitrogênio (L-prolina e sulfato de amônio) neste estudo, o efeito da fonte de nitrogênio sob a produção de L-asparaginase por DCFS6 associada não somente a quantidade, mas também ao tipo (qualidade) do substrato.

O efeito do substrato sulfato de amônio na produção de L-asparaginase na corrida 9 do PBD (L-asparagina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, peptona 1,5 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 % e cloreto de potássio 0,01 %, K_2HPO_4 0,152%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,052%, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001% e $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,052%) também foi verificada com o objetivo de identificar o comportamento desse substrato em meio mais enriquecido em comparação ao Czapek Dox modificado.

A Figura 24 representa o comportamento do substrato sulfato de amônio na produção de L-asparaginase na corrida 9 do PBD por mediana e amplitude dos dados, baseado nos resultados verificados em 3 experimentos independentes com $n = 3$, respeitando as mesmas condições. Em análise pode-se observar graficamente o aumento da atividade enzimática na concentração à 7%. Por análise estatística não foi identificada diferença significativa das atividades de L-asparaginase para as concentrações em estudo.

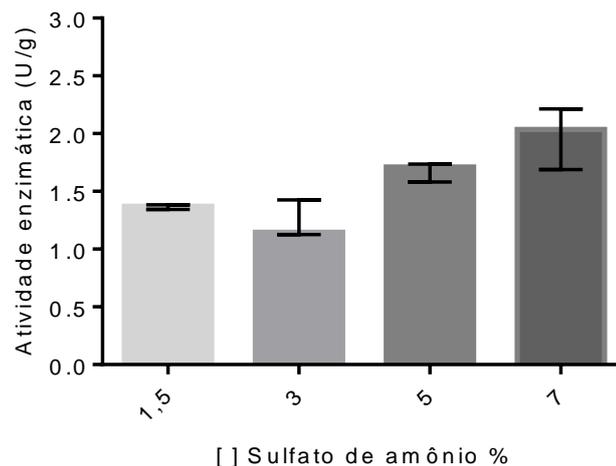


Figura 24: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 1,5%, 3%, 5% e 7%. Teste Kruskal-Wallis.

A atividade enzimática na concentração 7% corresponde a aproximadamente 1,8 vezes maior em relação a atividade em menores concentrações. Isso, em comparação aos resultados identificados para L-prolina no mesmo meio representa comportamento semelhante de aumento de atividade.

No meio Czapek Dox modificado a evidência do efeito dos substratos (L-prolina e sulfato de amônio) sob a atividade de L-asparaginase é maior, em comparação com o meio mais enriquecido desenhado por PBD (corrida 9). Podendo ser justificado pela quantidade menor de substratos e conseqüentemente menor influência de fontes de carbono e nitrogênio no meio.

Ainda, usando o mesmo meio – corrida 9 identificada no planejamento PBD, com objetivo de identificar o comportamento do efeito do substrato sulfato de amônio em concentrações maiores que as verificadas, foi realizada outra análise, com 3 experimentos independentes e $n = 3$, com sulfato de amônio nas concentrações 1,5%, 10% e 15%.

O efeito dos resultados para essa comparação com o uso do substrato sulfato de amônio está representado na Figura 25. Em análise estatística não foi observado diferença significativa entre as concentrações 1,5%, 10% e 15%. Em comparação aos resultados dos experimentos anteriores (1,5, 3, 5 e 7%) com o mesmo substrato, sugeri estabilização ou queda na atividade de L-asparaginase para as concentrações 10% e 15%.

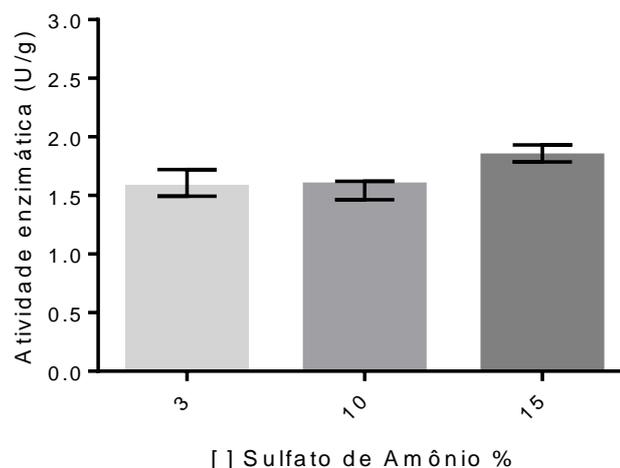


Figura 25: Gráfico de barras representando o efeito de sulfato de amônio sob a atividade de L-asparaginase na corrida 9 do PBD nas concentrações 1,5%, 10% e 15%. Teste Kruskal-Wallis.

Durante a verificação do efeito do sulfato de amônio nas concentrações 1,5%, 10% e 25%, pode-se observar uma possível influência do aumento das concentrações desses substratos no crescimento da biomassa do fungo DCFS6. Para o substrato sulfato de amônio é observado um comportamento similar ao identificado para L-prolina. O resultado do efeito das concentrações 1,5%, 10% e 15% de sulfato de amônio sob o crescimento da biomassa fúngica está representado na Figura 26 por média dos resultados. O efeito negativo no aumento das concentrações de sulfato de amônio sob o crescimento da biomassa também pode ser observado por representação gráfica. Na concentração inicial de sulfato de amônio em 1,5% a produção de biomassa é aproximadamente 32 g/L, com redução na produção para aproximadamente 13 g/L em na concentração à 15%. Essa queda, pode representar uma resposta inibitória maior por sulfato de amônio (15%) sob a produção de biomassa em comparação com o substrato L-prolina (20%), considerando que nessa comparação o sulfato de amônio está em concentração menor. Os ions NH_4^+ presentes, quando da utilização de sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio podem ser considerados tóxicos para as células diante de elevadas concentrações (Lehninger, Nelson e Cox, 1995)

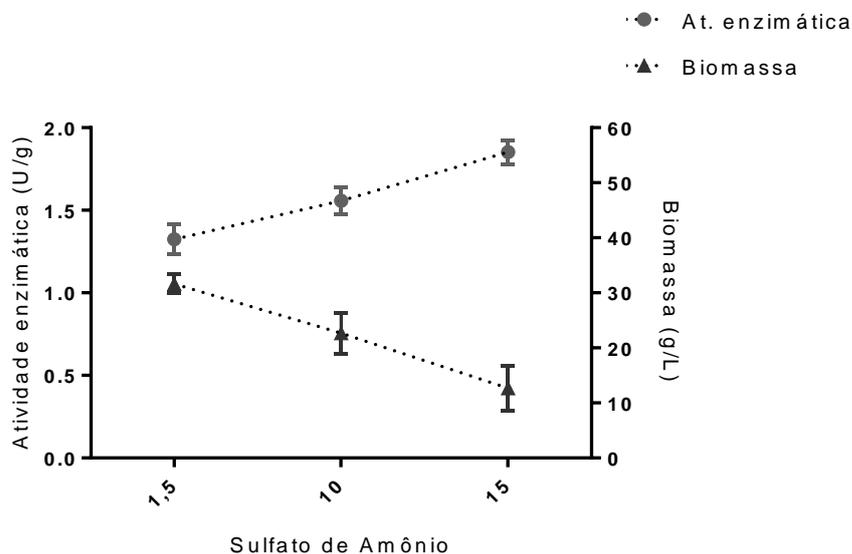


Figura 26: Gráfico representando o efeito de sulfato de amônio na atividade de L-asparaginase e no crescimento de biomassa pelo fungo DCFS6.

Essa resposta inibitória pelos dois substratos sob o crescimento de biomassa fúngica foi observado no trabalho com espécies de *Aspergillus*, por Han et al. (2016),

quando comparou o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre o crescimento dos fungos em meios suplementados, e observou aumento ou inibição de crescimento variando conforme o tipo de substrato. Os fungos são capazes de responder a mudanças quantitativas e qualitativas na disponibilidade de nitrogênio através de mecanismos regulatórios (Tudzynshi, 2014).

A figura 27 apresentanda, de forma complementar, o gráfico representativo dos experimentos conduzidos nesse item para verificação do efeito do substrato sulfato de amônio sob atividade de L-asparaginase pelo isolado DCFS6.

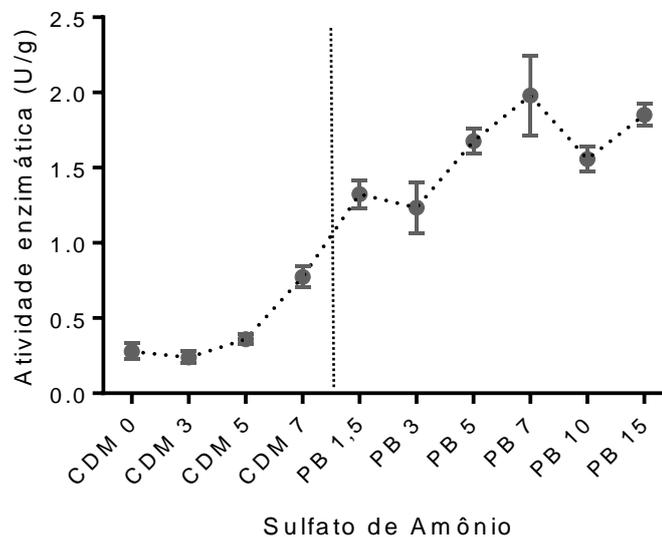


Figura 27: Gráfico representativo do efeito de sulfato de amônio na atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6. (CDM) meio Czapek Dox modificado, (PB) meio corrida 9 do Plackett Burman; seguidos das concentrações de sulfato de amônio.

Para os dois substratos L-prolina e sulfato de amônio percebe-se o efeito positivo sob o aumento da atividade de L-asparaginase, e em altas concentrações, sugerem inibição da atividade enzimática. Corroborando com a identificação de significância para esses substratos nos resultados do planejamento experimental utilizado neste trabalho com o isolado DCFS6.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho representa a identificação de uma nova espécie de fungo filamentoso isolado do solo do Cerrado Centro-Oeste brasileiro produtor da enzima L-asparaginase. A Análise filogenética por Inferência Bayesiana com combinação multigênica das regiões ITS (*Internal Transcription Spacer*) e RPB2 (RNA polymerase II second largest subunit) revelou o isolado DCFS6 em estudo como representante de nova linhagem filogenética e confirmado como nova espécie de *Penicillium* por observação morfológica, que será proposto seguindo as normas do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas, representando nova linhagem filogenética.

Na fase de identificação do gene do isolado DCFS6 que expressa a enzima L-asparaginase, os resultados de amplificação com os primers sintetizados utilizando as temperaturas 48, 50, 52 e 55 °C não corresponderam a indicação da região gênica de L-asparaginase. Esses resultados podem contribuir como informações preliminares para desenho de novos experimentos quanto à amplificação da região L-asparaginase para o isolado DCFS6 e outras espécies do gênero *Penicillium*.

Em delineamento final por Composto Central Rotacional, os dados obtidos na análise de variância, não foi possível obter um modelo matemático que gerasse uma superfície de resposta e determinar as concentrações otimizadas dos substratos para o meio de cultivo submerso na produção da enzima L-asparaginase para o isolado DCFS6. No entanto, foi possível, durante as análises dos planejamentos utilizados, identificar os substratos L-prolina e sulfato de amônio como variáveis independentes significativas com efeito positivo na produção de L-asparaginase pelo fungo DCFS6.

No planejamento experimental propostos, a atividade de L-asparaginase pelo fungo DCFS6 foi 4 vezes maior na melhor corrida do PBD ($1,77 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,04$) e 5,4 vezes maior na melhor corrida do DFF ($2,36 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,08$), ambas em comparação ao encontrado no meio Czapek Dox modificado ($0,44 \text{ U/g}_{\text{células}} \pm 0,04$).

Nos delineamentos iniciais do planejamento experimental empregando o modelo Placket-Burman a maior atividade enzimática $1,77 \text{ U/g}_{\text{células}}$ foi observada em meio de cultivo composto por L-asparagina 3,0 %, L-prolina 3,0 %, ureia 0,1 %, nitrato de sódio 2,5 %, extrato de levedura 0,1 %, sulfato de amônio 1,5 %, peptona 2,0 %, glicose 0,2 %, sacarose 0,2 %, extrato de malte 0,5 %, cloreto de potássio 0,01 %, e identificou a variável L-prolina com efeito significativo positivo. No emprego do

Delineamento Fatorial Fracionado a maior atividade enzimática de 2,36 U/g_{células} foi obtida em meio de cultivo composto por L-prolina 5,0 %, peptona 2,0 %, sacarose 0,2 %, ureia 2,0 %, sulfato de amônio 2,0 %, extrato de levedura 1,5 %, glicose 1,0%, L-asparagina 3,0 %, e identificou o sulfato de amônio como variável significativa de efeito positivo. O efeito dessas variáveis identificadas como significativas (L-prolina e sulfato de amônio), na produção da enzima L-asparaginase pelo isolado DCFS6, foi confirmado em análise independente por comparação estatística.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHAIYPOUR, K.; WLODAWER, A.; LUBKOWSKI, J. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. **Biochemistry**, v. 40, n. 19, p. 5655-5664, 2001.

AIDA, M. F. et al. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 295–302, 2015.

AKTUGANOV, G. E. et al. Purificação e caracterização de exo- β -1,4-glicosaminidase produzida por fungos degradadores de quitosana, *Penicillium* sp. IB-37-2A. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 18. 2019.

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**, Viçosa, 2ª edição: Ed. UFV, 2016.

ALHUSSAINI MS. Mycobiota of wheat flour and detection of α -amylase and L-asparaginase enzymes. **Life Science Journal**, v. 10, p. 1112–1122, 2013.

ALMEIDA, R. P. C. D. Avaliação da produção de l-asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado. 104 p. (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

ANTOINE, A. A et al. Xylanase production by *Penicillium canescens* on soya oil cake in solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 1, p. 50-62, 2010.

APARNA, C.; RAJU, K. J. Optimization of process parameters for l-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 under solid state fermentation using mixed substrate. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 4, p. 354-360, 2015.

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 2016.

ARIF, H. M., HUSSAIN, Z. Important sources and medicinal applications of L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, p. 35–45, 2014.

AVRAMIS, V. I. Asparaginases: Biochemical Pharmacology and Modes of Drug Resistance. **Anticancer Research**. v. 32, n. 7, p. 2423-2437, jul. 2012.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212-220, 2012. ISSN 1932-2143.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental health perspectives**, p. 138-145, 2007.

BENNETT, J. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal Biotechnology**, v. 66, n. 2-3, p. 101-107, 1998.

BON, E. P. S., Ferrara, M. A., Corvo, M. L. Enzimas em Biotecnologia Produção, aplicações e Mercado. Rio de Janeiro, Editora Interciência. 2008.

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

BROOME, J. D. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the l-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **Journal the Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 99-120, 1963a.

BROOME, J. D. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. II. Lymphoma 6C3HED cells cultured in a medium devoid of l-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **Journal the Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 121–148, 1963b.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A. Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes, **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553-556, 1999.

CARDOSO, B. B. *et al.* β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 2017.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Localization of the Two L-Asparaginases in Anaerobically Grown *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 16, p. 3753-3755, 1967.

CHELLEGATTI, M. A. *et al.* Sequential synthesis and secretion of pectinases by *Penicillium frequentans*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 5-6, p. 319-326, 2000.

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

CLEMENTI, A. Presence of L-asparaginase in animals and its significance. **Arch Int Physiol**, v.19, p. 369–398, 1922.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Preparative Biochemistry Biotechnology**. v. 48, n. 8, p. 707-717, 2018.

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

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.

EL-ENSHASY, H.; KLEINE, J.; RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 10, p. 2103–2112, 2006.

EL-NAGAR, N.; EL-EWASY, S.; EL-SHWEIHY, N. Microbial L-asparaginase as a Potential Therapeutic Agent for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia: The Pros and Cons. **International Journal of Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 182-199, 2014.

EL-REFAI, H. A.; EL-SHAFEI, M.S.; MOSTAFA, H.; EL-REFAI, A.M.H.; EL-BEIH, F.M.; AWAD, G.E.A.; EASA, S.M.; GOMAA, S.K. Statistical optimization of anti-leukemic enzyme L-asparaginase production by *Penicillium cyclopium*. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**. v. 8, n. 2, p. 130–142, 2014.

EL-SHAFEI, A. M. et al. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**. v. 2, n. 3, p. 158-174, 2012.

FARAG, A.M.; HASSAN, S.W.; BELTAGY, E.A.; EL-SHENAWY, M.A. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**. v. 41, n. 4, p. 295–302, 2015.

GERINIERE L.; BASTION Y.; DUMONTET C.; SALLES G.; ESPINOUSE D.; COIFFIER B. Heterogeneity of acute lymphoblastic leukemia in HIV-seropositive patients. **Annals of Oncology**, v. 5, p. 437-440, 1994.

GLASS, N. L.; DONALDSON, G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening L-Asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23-26, 1997.

GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923-929, 2012.

HAN, X. et al. Functional Analysis of the Nitrogen Metabolite Repression Regulator Gene *nmrA* in *Aspergillus flavus*. **Frontiers Microbiology**, v. 7, n. 1794, 2016.

HEINEMMAN, B.; HOWARD, A. J. Production of Tumor-Inhibitory L-asparaginase by Submerged Growth of *Serratia marcescens*. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 550-554, 1969.

HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 2009.

HERTZBERG, L. et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1006-1017, 2010.

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

HOFFBRAND A. V.; MOSS P. A. H. **Fundamentos da hematologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

HOOG, G. D.; ENDE, A. H. G. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. **Mycoses**, v. 41, n. 5-6, p. 183-189, 1998.

HOUBRAKEN, J. et al. Taxonomy of *Penicillium* section Citrina. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 53–138, 2011.

IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-89, 1973.

INCA. **Leucemia**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia>>. Acesso em 01/02/2019.

INCA. **Informações do Registro de Câncer de Base Populacional**. 2016. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/BasePopIncidencias/PrepararConsultarRelatorioValorAbsoluto.action?tipoFaixaEtaria=2>>. Acesso em 07/03/2019.

INCA. Leucemias Agudas na Infância e Adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 47, n. 3, p. 245-257, 2001.

KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. John Wiley & Sons, 2017.

KEATING, M. J. et al. L-Asparaginase and PEG Asparaginase— Past, Present, and Future. **Leukemia & Lymphoma**. v. 10, (sup1), p. 153-157, 1993.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. **Journal Experimental Medicine**, v. 98, n., p. 565-581, 1953.

KIRK, P. M.; et al. Dictionary of the Fungi 10th ed. Wallingford, UK: CABI. p. 505, 2008.

KRALL, A. S.; XU, S.; GRAEBER, T. G.; et al. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. **Nature Communications**. v. 7, n. 11457, 2016.

KRISHNAN, S. et al. Screening and selection of media components for lactic acid production using Plackett–Burman design. **Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 61–65, 1998.

KUMAR, D. S.; SOBHA, K. L-Asparaginase from microbes: a comprehensive review. **Advances in Bioresearch**. v. 3, n. 4, p. 137-157, 2012.

KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 29, n. 4, p. 577–587, 2013.

KUMAR, S. et al. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870-1874, 2016.

LANG, C.; GÖLLNITZ, C.; POPOVIC, M.; STAHL, U. Optimization of fungal polygalacturonase synthesis by *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch culture. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, n. 3, p. 219–226, 1997.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Enzimas**. Princípios de Bioquímica. New York: Ed. Sarvier. 1995.

LIU, Y. J. et al. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, p. 1799–1808, dez. 1999.

LLS. **Facts and Statistics**. 2018. Disponível em: <
<https://www.ils.org/http%3A/ilsorg.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics>>. Acesso em 13/02/2019.

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

LOUREIRO, C. B. **Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)**. 67 p. (Dissertação de mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MARTIN, B. et al. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. **Environmental Health Perspectives**. v. 115. n. 1, p. 138-145, 2008.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi — Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 2, p. 177-185, 2008.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway **Computing Environments Workshop** (GCE), New Orleans, LA pp 1 – 8, nov. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2017. **Esclarecimento L-asparaginase**. Disponível em:<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/22/2.%20b%20-%20L-ASPARAGINASE CIT 22 06 2017.pdf>. Acesso em: 07 fev. 2019.

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium sp.* **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, n. 1573-0972, p. 577-587, 2013.

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

MULLIGHAN, C. G. New strategies in acute lymphoblastic leukemia: translating advances in genomics into clinical practice. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 396–400, 2011.

NOMME, J.; SU, Y.; KONRAD, M.; LAVIE, A. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816-6826, 2012.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v.2 - Programme distributed by the author. **Evolutionary Biology Center**, 2004.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, p. 465-493, 1997.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655-674, 2009.

ONIONS, A.H.S., BRADY, B.L. 1987. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. Peberdy, J.F. (Ed.) Biotechnology Handbooks 1 *Penicillium* and *Acremonium*. New York and London, Plenum Press, p. 1-36.

PÁDUA, A. P. S. L. et al. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 1, p. 39-49, 2019.

PATRO, K. R.; GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**. v. 3, n.3, p. 30–34, 2012.

PITT, J. I. A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1991.

PLACKETT, R. L., BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305–325, 1946.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, p. 1030–1043, 2008.

QUAEDVLIEG, W. et al. Zymoseptoria gen. nov.: a new genus to accommodate Septoria-like species occurring on graminicolous hosts, *Persoonia* - **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 26, p. 57-69, 2011.

QUINTANILLA-FLORES, D. L. et al. Acute pancreatitis and diabetic ketoacidosis following L-asparaginase/prednisone therapy in acute lymphoblastic leukemia. **Case reports in oncological medicine**, v. 2014, 2014.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of molecular evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

RAPER, K. B., THOM, C. A manual of the Penicillia. Baltimore, Williams and Wilkins. 1949.

REHMAN, S. et al. Improved catalytic properties of *Penicillium notatum* lipase immobilized in nanoscale silicone polymeric films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 279-286, 2017.

RODRIGUES, M.; IEMMA, A. **Planejamento de experimentos e otimização de processos** – ed. 3^a. Campinas/SP, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Casa do Pão Editora, 2005.

RONQUIST, F. et al. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. **Systematic Biology** 61, 2012.

SAEED, H. et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 106, p. 1041-1051, jan. 2018.

SAMSON, R.A., FRISVAD, J.C. Penicillium Subgenus Penicillium: new Taxonomics Schemes, Mycotoxins and Other Extrolites. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1-260. 2004.

SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

SEHGAL S.; MUJTABA S.; GUPTA D.; AGGARWAL R.; MARWAHA R. K. High incidence of Epstein Barr virus infection in childhood acute lymphocytic leukemia: a preliminary study. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, p. 63-67, 2010.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, p. 1-12, 2015.

SHRIVASTAVA, A.; et al. Kinetic Studies of L-Asparaginase From *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SILVA, L. F. et al. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for L-asparaginase production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34; n. 11, p. 162, 2018.

SILVA, L. R. C. **Espécies de penicillium em solos de caatinga e mata atlântica, produção de tanase e detecção do potencial micotoxigênico**. 203 p. (Tese de Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SINGH K, MARTIN SM. Purification and properties of a protease from *Penicillium cyaneo-fulvum*. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 38, p. 969-980, 1960.

SMITH, P. K. et al. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v. 85, p. 76-85, 1985.

STECHER, A.L.; MORGANTETTI, P.; DE, D.; POLIKARPOV, I.; ABRAHAO-NETO, J. Stability of L-asparaginase-an enzyme used in Leukemia treatment. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74. P. 1-9.1999.

STEFANO, S. et al. 3-o-Methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum*. **Phytochemistry, Oxford**, v. 52, p. 1399-1401, 1999.

SUN, R.; GAO, Y.; SHEN, K.; XU, Y.; WANG, C.; LIU, H.; DONG, J. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2011.

SUNG, G. H, et al. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, n. 3, p. 1204-1223, 2007.

TIPPANI, R; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 3692–3696, 2012.

TUDZYNSHI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers Microbiology**, v. 5, n. 656, 2014.

ULLAH, S. F. et al. Structural and functional characterisation of xylanase purified from *Penicillium chrysogenum* produced in response to raw agricultural waste. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 14, n. 127, p. 385-395, 2019.

VILGALYS, R., HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 4239-4246, 1990.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**. v. 30, p. 1119–1139, 2012.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomedical Journal**, v. 37, n. 6, p. 345-56, 2014.

YADAV, N. C.; SARKAR, S. Production of L-Asparaginase by *Fusarium oxysporum* using submerged fermentation, **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**. v. 3, n. 6, p. 32-40, 2014.

YELLIN, T.; WRISTON JR, J. Antagonism of Purified Asparaginase from Guinea Pig Serum toward Lymphoma. **Science**, v. 151, n. 3713, p. 998-1004, 1966.

YU, X. et al. Application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements for the production of *Colletotrichum coccodes* spores. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 301-305, mar. 1997.

YUN, M. et al. Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **Journal of Molecular Biology**, v. 369, n. 3, p. 794-811, 2007.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137-2143, 2011.