

MARINA BORGES GUIMARÃES

L-ASPARAGINASE DE *Penicillium sizovae*, PRODUÇÃO NATIVA E HETERÓLOGA

BRASÍLIA, 2024

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARINA BORGES GUIMARÃES

**L-ASPARAGINASE DE *Penicillium sizovae*, PRODUÇÃO NATIVA E
HETERÓLOGA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Pérola Oliveira Magalhães

Coorientador: Prof. Dr. Jorge F B Pereira

BRASÍLIA

2024

MARINA BORGES GUIMARÃES

**L-ASPARAGINASE DE *Penicillium sizovae*, PRODUÇÃO NATIVA E
HETERÓLOGA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em 26 de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Pérola Oliveira Magalhães
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)

Profa. Dra. Mônica Caraméz Triches Damaso
Embrapa Agroenergia

Prof. Dr. Samuel Leite Cardoso (Suplente)
União Pioneira de Integração Social (UPIS)

Dedico este trabalho a todos que amo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço meus pais, Marta e Wilmar, por serem meu alicerce e porto seguro.

À minha mãe por ser minha maior inspiração de vida, pelo cuidado, amor, e por acreditar em mim.

À minha avó pelo amor incondicional.

À Micer por todo o amor, paciência, lealdade, apoio e incentivo.

Às amigas verdadeiras que a vida adulta não levou embora: Julianna, Carol, Sofia, Raul, Flora e Let.

À professora Pérola pelo acolhimento nesses anos de orientação, pela confiança e amizade.

Ao professor Jorge Pereira pela orientação, parceria e pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche na Universidade de Coimbra.

À CAPES pelas bolsas de doutorado e de doutorado sanduíche, e à FAPDF pelo financiamento do projeto.

À técnica Patrícia por todo o suporte, atenção, dedicação e organização impecáveis no Laboratório de Produtos Naturais.

Aos companheiros de pesquisa: Joel, Letícia e Ana Luisa, pelas trocas de conhecimento, auxílio na execução dos experimentos e partilha dos sofrimentos.

Aos alunos do laboratório: Samuel, Paula M., Paula G., Rosângela, Artur, Renata, Sarah, Kellen, Ana Letícia e Diegue, por tornarem os dias de trabalho mais leves.

Aos colegas da Universidade de Coimbra: Carmem, Thauane, Mariana, Alexandre, Júlia, Thercia e Cecília.

À Carol Castello pela dedicação ao TCC, o que também me ensinou muito.

À Universidade de Brasília por me incentivar até nos dias mais difíceis.

A todos que me acompanharam e contribuíram nessa jornada de alguma forma.

“Saber muito não lhe torna inteligente. A inteligência se traduz na forma que você recolhe, julga, maneja e, sobretudo, onde e como aplica a informação.”

Carl Sagan

RESUMO

A enzima L-asparaginase (L-ASNase) foi a primeira enzima terapêutica descoberta e é utilizada no tratamento de leucemia Linfoblástica aguda (LLA). Seu mecanismo de ação consiste em catalisar a hidrólise da L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia. Apesar de ser a primeira linha de tratamento para a LLA, ainda não existe produção de L-ASNase no Brasil. Além disso, todas as formulações de L-ASNase aprovadas e disponíveis no mercado são de origem bacteriana (de *Escherichia coli* nativa e peguilada, e de *Dickeya dadantii*), entretanto estas formulações podem causar toxicidade e hipersensibilidade em alguns pacientes. Visando a produção de uma L-ASNase com efeitos adversos menores e maior rendimento, este trabalho tem como objetivo a investigação da L-ASNase do fungo *Penicillium sizovae*, isolado a partir do solo do cerrado. Duas abordagens foram avaliadas neste trabalho: a enzima nativa e a enzima heteróloga, expressa em sistema *E. coli* BL21(DE3). A produção da enzima nativa foi avaliada considerando condições de baixo custo e menor impacto ambiental, com uso de sistemas aquosos bifásicos (SABs) para a purificação. O SAB escolhido foi composto por PEG-2000/tampão fosfato, com fator de purificação (FP) de 1,63, dentre as condições avaliadas. Posteriormente, a cromatografia de troca iônica foi empregada, com rendimento de até 33,66% e FP de até 8,49. Em relação à enzima recombinante, sua clonagem e expressão em *E. coli* BL21(DE3) foram confirmadas por PCR, SDS-PAGE e Western Blot, ensaios que também confirmaram a presença enzima majoritariamente nas frações insolúveis, sugerindo a formação de corpos de inclusão (CI). As condições de cultivo, incluindo concentração de indutor, tempo pós-indução e temperatura de indução foram otimizadas. Ensaios de solubilização com hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) foram conduzidos, sendo a condição de cultivo de 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C e 3 M de GdnHCl se destacou quanto à concentração de proteína e tamanho da banda correspondente à L-ASNase em SDS-PAGE. Matrizes experimentais com a finalidade de encontrar aditivos adequados para o redobramento foram realizadas, obtendo-se a enzima em tetrâmero após a adição de cátions divalentes, entretanto, sem atividade catalítica. Avaliações da construção do plasmídeo, do vetor, da linhagem celular e da expressão devem ser realizadas para que a enzima apresente atividade enzimática.

Palavras chave: L-asparaginase; fungo filamentosos; expressão heteróloga; leucemia linfoblástica aguda; sistema aquoso bifásico.

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase (L-ASNase) was the first therapeutic enzyme discovered and is used in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). Its mechanism of action involves catalyzing the hydrolysis of L-asparagine into L-aspartic acid and ammonia. Despite being the first-line treatment for ALL, there is still no production of L-ASNase in Brazil. Additionally, all approved and available L-ASNase formulations on the market are of bacterial origin (from native and pegylated *Escherichia coli*, and *Dickeya dadantii*); however, these formulations may cause toxicity and hypersensitivity in some patients. Aiming to produce an L-ASNase with fewer adverse effects and higher yield, this work focuses on investigating the L-ASNase from the fungus *Penicillium sizovae*, isolated from Cerrado soil. Two approaches were evaluated in this study: the native enzyme and the heterologous enzyme expressed in the *E. coli* BL21(DE3) system. The production of the native enzyme was assessed under low-cost and environmentally friendly conditions, using aqueous two-phase systems (ATPS) for purification. The chosen ATPS was composed of PEG-2000/phosphate buffer, yielding a purification factor (PF) of 1.63 among the conditions evaluated. Subsequently, ion-exchange chromatography was employed, achieving up to 33.66% yield and a PF of up to 8.49. For the recombinant enzyme, its cloning and expression in *E. coli* BL21(DE3) were confirmed by PCR, SDS-PAGE, and Western Blot, which also showed the enzyme's presence predominantly in the insoluble fractions, suggesting the formation of inclusion bodies (IBs). The cultivation conditions, including inducer concentration, post-induction time, and induction temperature, were optimized. Solubilization assays with guanidine hydrochloride (GdnHCl) were conducted, with the cultivation condition of 0.1 mM IPTG, 2 h, 37 °C, and 3 M GdnHCl standing out in terms of protein concentration and the corresponding L-ASNase band size in SDS-PAGE. Experimental matrices were developed to identify suitable additives for refolding, obtaining the enzyme in tetramer form after the addition of divalent cations; however, it lacked catalytic activity. Further assessments of plasmid construction, vector selection, cell strain, and expression conditions are necessary to achieve enzymatic activity.

Keywords: L-asparaginase; filamentous fungi; heterologous expression; acute lymphoid leucemia; aqueous biphasic system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Hidrólise da L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia pela ação da L-asparaginase.	29
Figura 2. Mecanismo de ação da L-asparaginase na leucemia linfoblástica aguda..	30
Figura 3. Estrutura cristalográfica do tetrâmero (A) e de um monômero (B) da L-ASNase comercial Elspar®. Protein data bank: 3ECA.	31
Figura 4. Aplicações de enzimas fúngicas nos setores industrial, do meio ambiente e biomédico.....	47
Figura 5. Mecanismo da formação da acrilamida e da sua mitigação pela L-ASNase. (A): Formação da acrilamida a partir de um açúcar redutor e da L-asparagina. (B): Mitigação da acrilamida em alimentos através da conversão da L-asparagina em L-ácido aspártico pela L-ASNase.....	49
Figura 6. Componentes da parede celular fúngica.	52
Figura 7. Curva binodal (ou diagrama de fase) de um sistema polímero-sal. Composto da fase do fundo está plotada na abscissa, e o composto da fase topo está plotado na ordenada.	57
Figura 8. Classificação geral de sistemas aquosos bifásicos e suas principais características.....	58
Figura 9. Fluxograma contendo as etapas para a obtenção da L-ASNase purificada por sistemas aquosos bifásicos polímero-sal do fungo <i>P. sizovae</i> a partir de um cultivo com um meio Czapek-Dox modificado.	62
Figura 10. Curva padrão de albumina versus a absorvância a 562 nm.	67
Figura 11. Reação da quantificação da atividade de L-ASNase pelo método de AHA.	68
Figura 12. Curva padrão de concentração β -hidroxamato (μmol) versus absorvância a 500 nm.	69
Figura 13. Biomassa (g/L) e atividade específica de L-ASNase ($\text{U/g}_{\text{cél.}}$) dos cultivos dos 3 diferentes meios de cultivo de <i>P. sizovae</i> durante 5 dias a 32 °C e 120 rpm..	74
Figura 14. Extração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) em ciclos nos diferentes sistemas ternários Etanol:Acetato de etila:Água e solventes eutéticos profundos do meio de cultura 1 (A) e do meio de cultura 2 (B).....	76

Figura 15. Atividade enzimática específica de L-asparaginase ($\text{U/mg}_{\text{proteína}}$) em extratos ($0,2 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{mL}$) obtidos a partir de sistemas ternários Etanol/Acetato de Etila/Água e solventes eutéticos profundos.....	77
Figura 16. Gel desnaturante de poliacrilamida (12%) dos extratos ($0,2 \text{ g/mL}$) obtidos a partir dos sistemas ternários Etanol/Acetato de etila/Água e solventes eutéticos profundos.....	78
Figura 17. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos métodos de rompimento celular em extratos ($0,2 \text{ g/mL}$) obtidos a partir da extração de Tampão Tris, EtOH 66%, EtOH 33%, [Ch]Cl:Lac 1:1, [Ch]Cl:Lac 1:2, [Ch]Cl:But 1:1 e [Ch]Cl:But 1:2.	81
Figura 18. Atividade específica em $\text{U/mg}_{\text{proteína}}$ de extratos obtidos com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,6 nas concentrações de $0,2 \text{ g/mL}$, $0,3 \text{ g/mL}$ e $0,4 \text{ g/mL}$	83
Figura 19. Eficiência de extração (%) e fator de purificação (FP) das fases ricas em L-ASNase dos SABs polímero-sal.	84
Figura 20. Balanço de Massa (%) e atividade relativa (%) das fases ricas em L-ASNase dos sistemas aquosos polímero-sal.....	87
Figura 21. Gel desnaturante de poliacrilamida (12%) corado com azul de Coomassie contendo as amostras: extrato bruto (EB), fase topo, fase fundo, interface (I), concentrado após ultrafiltração (C), e filtrado (FT) de um sistema aquoso bifásico PEG-2000/fosfato.	88
Figura 22. Cromatograma da eluição com Tris-HCl 50 mM pH 8,6, de 5 mL da fase topo concentrada (30 kDa) no Akta Pure, com uma coluna HiTrap DEAE FF, fluxo $0,5 \text{ mL/min}$, e tampão de eluição Tris-HCl 50 mM NaCl 500 mM pH 8,6 (A). SDS-PAGE (12%) corado com nitrato de prata. Frações 5 a 8 obtidas a partir da corrida cromatográfica descrita em A.	89
Figura 23. Mapa do plasmídeo pET28a contendo o gene L-ASNasePS.....	105
Figura 24. Curva de calibração da densidade óptica (600 nm) versus peso seco. .	111
Figura 25. Curva padrão de albumina versus absorvância de (595 nm).....	116
Figura 26. Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase nativa de <i>P. sizovae</i>	118
Figura 27. Gel de agarose 0,8% (m/v) da amplificação dos genes dos 10 clones selecionados aleatoriamente.	119
Figura 28. Análise da expressão do gene L-ASNasePS em <i>E. coli</i> BL21(DE3) com $0,5 \text{ mM}$ de IPTG e 19 h de expressão em gel desnaturante de poliacrilamida a 12%	

(m/v) com corante azul de Coomassie. C: controle negativo (<i>E. coli</i> BL21(DE3) contendo o plasmídeo pet28a vazio); (s): fração solúvel; (i) fração insolúvel; 1-10: clones.....	120
Figura 29. Análise da expressão do gene L-ASNasePS em <i>E. coli</i> BL21(DE3) por Western-Blot com o uso de anticorpo anti His-tag. (s): fração solúvel; (i): fração insolúvel; C: controle negativo; 2, 6 e 9: clones 2, 6 e 9, respectivamente.	121
Figura 30. Área das bandas detectadas pelo anticorpo anti-his tag por Western Blot calculadas pelo software ImageJ®.	121
Figura 31. Curva de crescimento da <i>E. coli</i> BL21(DE3) com o gene L-ASNasePS a 37 ° em tempo (h) versus densidade óptica (600 nm).	122
Figura 32. Curva logarítmica em ln(DO) do crescimento de <i>E. coli</i> BL21(DE3) com o gene L-ASNasePS a 37 ° versus tempo (h).	123
Figura 33. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie referente aos diferentes métodos de sonicação testados. A: fração solúvel; B: fração insolúvel. 1: 7 ciclos, 30 seg ON e 45 seg OFF, amp 30%; 2: 10 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 3: 20 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 4: 10 ciclos. 1 ciclo: 1 segundo ON e 1 segundo OFF, seguido de 1 minuto de espera, amp 30%; 5: 15 ciclos, 1 seg ON e 1 seg OFF, amp 30%.	126
Figura 34. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações insolúveis dos testes de sonicação. 1: ciclos, 30 seg ON e 45 seg OFF, amp 30%; 2: 10 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 3: 20 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 4: 10 ciclos. 1 ciclo: 1 segundo ON e 1 segundo OFF, seguido de 1 minuto de espera, amp 30%; 5: 15 ciclos, 1 seg ON e 1 seg OFF, amp 30%.....	127
Figura 35. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie do tempo zero da triagem a 37 °C. (s): frações solúveis; (i): frações insolúveis.	128
Figura 36. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações solúveis cultivadas a 37 °C.	129
Figura 37. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações insolúveis dos cultivos da triagem a 37 °C.	130
Figura 38. Área das bandas (cm ²) próximas a 45 kDa das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 37 °C calculadas pelo software ImageJ®.	131
Figura 39. Concentração de proteína (µg/mL) das frações insolúveis da triagem a 37 °C.	131

Figura 40. Cálculo da razão entre a área da banda sobre a concentração de proteína das frações insolúveis dos cultivos a 37°C.....	132
Figura 41. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações solúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C. A: 0,1 mM de IPTG; B: 0,5 mM de IPTG; C: 1 mM de IPTG.	133
Figura 42. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações solúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C calculadas pelo software ImageJ®.....	134
Figura 43. Concentração de proteína (µg/mL) das frações solúveis da triagem a 20 °C.	134
Figura 44. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C. A: 0,1 mM de IPTG; B: 0,5 mM de IPTG; C: 1 mM de IPTG.....	136
Figura 45. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C calculadas pelo software ImageJ®.....	137
Figura 46. Concentração de proteína (µg/mL) das frações insolúveis da triagem a 20 °C.....	137
Figura 47. Cálculo da área da banda sobre a concentração de proteína das frações insolúveis dos cultivos a 20 °C.	138
Figura 48. Atividade enzimática de L-ASNase (U/mL) calculada pelo método AHA das frações solúveis dos cultivos selecionados a 20 °C.	139
Figura 49. Atividade específica de L-ASNase (U/mg _{proteína}) calculada pelo método AHA das frações solúveis dos cultivos selecionados a 20 °C.....	140
Figura 50. Concentração de proteína (µg/mL) dos pellets resultantes da solubilização com diferentes concentrações de GdnHCl (1 - 4 M). CP: controle positivo (SDS a 2%); CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). A: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; B: 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; C: 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; D: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.	142
Figura 51. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie dos pellets obtidos a partir da solubilização dos corpos de inclusão com diferentes molaridades de GdnHCl (1 - 4 M). CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). CP: controle positivo (SDS a 2%); A: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; B: 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; C: 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; D: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.	143

Figura 52. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos sobrenadantes resultantes da solubilização com diferentes concentrações de GdnHCl (1 - 4 M). CP: controle positivo (SDS a 2%); CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). A: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; B: 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; C: 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; D: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.....	144
Figura 53. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie dos sobrenadantes obtidos a partir da solubilização dos corpos de inclusão com diferentes molaridades de GdnHCl (1 - 4 M). CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). CP: controle positivo (SDS a 2%); A: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; B: 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; C: 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; D: 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.	145
Figura 54. Gel de desnaturante de poliacrilamida (12%) referente aos testes de 1 a 9 da matriz primária.	148
Figura 55. Gel desnaturante de poliacrilamida dos ensaios da matriz secundária..	150
Figura 56. Native-PAGE (corado com nitrato de prata) dos testes da matriz terciária (A) e de amostras ultrafiltradas (30 kDa <i>cut-off</i>) da matriz terciária (B). Marcador molecular: albumina (132 kDa).	153
Figura 57. Native-PAGE das amostras dialisadas após triagem por matriz experimental. Marcador: L-asparaginase.	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de medicamentos utilizados no tratamento quimioterápico da LLA. .	28
Tabela 2. Lista de formulações de L-asparaginase disponíveis no mercado atualmente.	35
Tabela 3. Todas as formulações de L-ASNase aprovadas para uso no Brasil pela ANVISA.....	37
Tabela 4. Relação das proporções dos solventes ternários utilizados para a obtenção de extratos enzimáticos a partir das células de <i>P. sizovae</i>	65
Tabela 5. Construção das soluções padrão utilizadas na curva de calibração.	69
Tabela 6. Composição dos sistemas aquosos bifásicos polímero-sal.....	71
Tabela 7. Composição, pH, densidade, umidade de sistemas polímero sal PEG + tampão fosfato e PPG + [Ch]Cl.....	85
Tabela 8. Parâmetros de partição (K e EE[%], atividade relativa (%) Atividade de L-ASNase (U/mL, U/mg _{proteína} e U/g _{cél.}), concentração de proteína (mg/mL), fator de purificação e balanço de massa (%) dos SABs polímero-sal.	86
Tabela 9. Atividade total de L-ASNase (U/mL), concentração de proteína (mg/mL), atividade específica (U/mg _{proteína}), fator de purificação e recuperação das etapas de purificação da L-ASNasePS.	90
Tabela 10. Sistemas de expressão heteróloga de L-ASNase com genes de origem fungos filamentosos.	97
Tabela 11. Métodos de sonicação testados para lise celular.	111
Tabela 12. Matrix primária para seleção de tampão de redobramento, bem como ambiente redox.	115
Tabela 13. Planejamento experimental da triagem, considerando diferentes concentrações de indutor (IPTG) e tempos pós-indução na DO a 600 nm.....	124
Tabela 14. Matrix primária para seleção de tampão de redobramento, bem como ambiente redox.	146
Tabela 15. Concentração de proteínas (µg/mL) de proteínas e recuperação (%) da matriz primária.	147
Tabela 16. Matriz secundária realizada com os tampões base de redobramento 7 e 8, e a razão PEG/proteína como quarto fator de redobramento.....	149

Tabela 17. Matriz terciária realizada com os tampões base de redobramento 7 e 8, e a cátions divalentes (CaCl_2 e MgCl_2) como quarto fator de redobramento.	151
Tabela 18. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) e rendimento dos ensaios da matriz terciária.	152
Tabela 19. Estratégias biotecnológicas para a produção heteróloga de proteínas eucarióticas ativas em sistemas de <i>E. coli</i>	155

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ch]Cl	Cloreto de colina
[CP]	Concentração de proteína
AE	Atividade específica
AHA	L-aspartil- β -hidroxamato
Arg	L-arginina
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BDA	Batata Dextrose Ágar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BM	Balanço de massa
BSA	Albumina de soro bovino
But	Ácido butírico
Cl	Corpos de inclusão
CP	Concentração de proteína
CTI	Cromatografia de Troca Iônica
DDT	Ditiotreitol
DO	Densidade óptica
EcAI	L-asparaginase de <i>E. coli</i> tipo 1
EcAII	L-asparaginase de <i>E. coli</i> tipo 2
EcAIII	L-asparaginase de <i>E. coli</i> obtida a partir do gene ybIK
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de extração
ErAII	L-asparaginase de <i>Dickeya dadantii</i> tipo 2
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
EwAII	L-asparaginase de <i>Erwinia carotovora</i> tipo 2
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FP	Fator de purificação
GdnHCl	Hidrocloreto de guanidina
GLNase	Glutaminase
gor	Glutaciona redutase

GRAS	Generally Recognized As Safe
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HpAI	L-asparaginase de <i>Helicobacter pylori</i> tipo 2
IC	Indutor de crescimento
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
Ka	Coeficiente de partição da atividade enzimática de L-ASNase
Kb	Coeficiente de partição da concentração de proteínas
L-ASNase	L-asparaginase
L-ASNasePS	L-asparaginase de <i>Penicillium sizovae</i>
Lac	Ácido láctico
LB	Luria Bertani
LI	Líquido iônico
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLC	Leucemia linfoblástica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MC	Meio de cultura
MS	Ministério da Saúde
NaPa	Poliacrilato de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
pI	Ponto isoelétrico
PEG	Polietileno glicol
PfAI	L-asparaginase de <i>Pyrococcus furiosus</i> tipo 1
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPG	Polipropileno glicol
PSA	Persulfato de amônio
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SAB	Sistema aquoso bifásico
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-Page	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida
SEP	Solvente eutético profundo
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	Sistema Único de Saúde
TCA	Ácido tricoloacético
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilenodiamina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
trxB	Tioredoxina redutase
η	Rendimento

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
2.1 LEUCEMIAS	26
2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda	26
2.2 L-ASPARAGINASE	29
2.2.1 L-Asparaginase no Brasil	37
2.2.2 L-Asparaginase de fungos filamentosos do cerrado.....	39
 CAPÍTULO II	 43
1 INTRODUÇÃO	44
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	46
2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS COMO FONTES DE BIOMOLÉCULAS	46
2.1.1 L-Asparaginase fúngica na indústria.....	48
2.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE FUNGICA	50
2.2.1 <i>Upstream e downstream</i>	50
3 OBJETIVOS	61
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
4 MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.1 MANUTENÇÃO DO MICROORGANISMO	62
4.2 MEIOS DE CULTIVO.....	63
4.2.1 Peso seco	64
4.3 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	64
4.3.3 Sistemas ternários	64
4.3.4 Solventes eutéticos profundos	65
4.3.5 Lise celular por sonicação.....	65
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA.....	66
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE.....	67
4.6 ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE).....	70

4.7 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS	71
4.7.1 Ensaio físico-químico	72
4.8 ULTRAFILTRAÇÃO	72
4.9 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	73
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	73
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 MEIOS DE CULTIVO.....	74
5.2 EXTRAÇÃO POR SISTEMAS TERNÁRIOS ETANOL:ACETATO DE ETILA:ÁGUA DESTILADA.....	75
5.3 EXTRAÇÃO	80
5.3.1 Concentração dos extratos	82
5.4 SEPARAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS POLÍMERO-SAL	83
5.5 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	88
6 CONCLUSÃO	92
 CAPÍTULO III.....	 93
1 INTRODUÇÃO	94
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	95
2.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PROTEÍNAS RECOMBINANTES	95
2.2 L-ASNASE GENETICAMENTE MODIFICADA	96
2.3 CORPOS DE INCLUSÃO	99
3 OBJETIVOS	103
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	103
4 MATERIAIS E MÉTODOS	104
4.1 ORIGEM E ISOLAMENTO DA L-ASPARAGINASE FÚNGICA.....	104
4.2 CLONAGEM	104
4.2.1 Preparo de células competentes.....	104
4.2.2 Clonagem em pET28a	105
4.3 CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO PLASMÍDEO.....	106
4.3.1 Desenho dos <i>primers</i>	107
4.4 TRIAGEM ENTRE 10 CLONES SELECIONADOS ALEATORIAMENTE ..	107
4.4.1 Concentração de proteína.....	107
4.4.2 Quantificação enzimática de L-asparaginase	107

4.4.3 Precipitação de proteínas	108
4.4.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE)	108
4.4.5 Western-Blot	109
4.5 TRIAGEM DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	110
4.5.1 Medidas de crescimento	110
4.5.2 Métodos de lise celular	111
4.5.2 Otimização das condições de cultivo	112
4.6 ISOLAMENTO DOS CORPOS DE INCLUSÃO	113
4.7 TRIAGEM DA SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO	113
4.8 REDOBRAMENTO	114
4.8.1 Quantificação de proteína pelo método de Bradford	115
4.8.1 Eletroforese em gel nativo de poliacrilamida (8%).....	116
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	117
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
5.1 CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM E TRIAGEM DOS CLONES.....	118
5.2 MEDIDAS DE CRESCIMENTO E PARÂMETROS PARA A TRIAGEM DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	122
5.2.1 Métodos de sonicação	125
5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	127
5.3.1 Cultivos a 37 °C	127
5.3.2 Cultivos a 20 °C	132
5.4 PARÂMETROS SELECIONADOS	138
5.4.1 Atividade de L-ASNase pelo método de AHA.....	138
5.4.2 Solubilização de corpos de inclusão purificados.....	140
5.4.3 Redobramento	146
6 CONCLUSÃO	158
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA	160
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164

CAPÍTULO I

L-asparaginase e leucemia linfoblástica aguda: revisão bibliográfica

1 INTRODUÇÃO

A L-asparaginase (L-asparagina amido hidrolase, EC 3.5.1.1) é uma enzima capaz de catalisar a hidrólise da L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia. Foi a primeira enzima terapêutica a ser descoberta e é atualmente a principal linha de tratamento para a leucemia linfoblástica aguda (LLA) (BATOOL et al., 2016).

O desenvolvimento da LLA ocorre através de mutações genéticas em linfoblastos não ocorrendo sua maturação completa. Desta forma, as células mutadas apresentam ausência ou pouca produção da enzima L-asparagina sintetase pelas células neoplásicas, impedindo desta forma que células neoplásicas produzam L-asparagina em níveis satisfatórios, ao contrário do que ocorre em células saudáveis. Tanto as células saudáveis quanto as leucêmicas necessitam do aminoácido L-asparagina para seu funcionamento metabólico, portanto, as células leucêmicas necessitam de uma fonte exógena para sua sobrevivência. Desta forma, a ação quimioterápica da L-ASNase consiste na redução de L-asparagina na corrente sanguínea, que é necessária para a síntese proteica, consequentemente induzindo à apoptose das células neoplásicas (BRUMANO et al., 2019; KRALL et al., 2016).

A incidência da LLA é maior em crianças até 5 anos de idade e após essa idade o risco declina lentamente até a faixa dos 20 anos, começando a aumentar após os 50 anos. Cerca de 75% dos casos de LLA ocorrem em crianças e adolescentes, e representa 25% dos diagnósticos de leucemia nesta faixa etária, porém a maior taxa de mortalidade é em adultos. A maior incidência em crianças e adolescentes se deve ao fato de o sistema imunológico ainda estar em desenvolvimento, aumentando a vulnerabilidade a alterações genéticas, além do crescimento celular acelerado das células sanguíneas. Já a taxa de mortalidade é maior em adultos devido a uma menor tolerância farmacológica ao tratamento, devido aos efeitos adversos relacionados ao tratamento, a presença de comorbidades, uma baixa resposta ao tratamento, além de diagnósticos em estágios mais avançados da doença (INCA, 2020; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2018). Desde 1978, medicamentos a base de L-ASNase, juntamente com vincristina e dexametasona ou prednisona, já eram aprovados para o tratamento de LLA pela Food and Drug Administration (FDA), bem como pelo Ministério da Saúde, e este protocolo de tratamento tem proporcionado taxas de sobrevivência de até 90% em pacientes pediátricos, e 50% em pacientes adultos

(INABA; PUI, 2021; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; QUINTANILLA-FLORES et al., 2014).

As formulações de L-ASNase disponíveis atualmente são de origem bacteriana, de *Escherichia coli* e *Dickeya dadantii* (sin. *Erwinia chrysanthemi* pv. *zeae*), sendo a proveniente de *E. coli* (tanto nativa, quanto recombinante) considerada o tratamento de primeira linha, e de *D. dadantii* administrada em pacientes que apresentaram reações de hipersensibilidade (COSTA-SILVA et al., 2020; LIMA et al., 2020). Uma abordagem sendo explorada atualmente com a finalidade de reduzir as reações de hipersensibilidade é a produção de L-ASNase a partir de organismos eucariotos, baseado no fato de que células eucarióticas possuem maior similaridade com células humanas (SARQUIS et al., 2004). Já foram reportados na literatura L-ASNase fúngica dos gêneros *Aspergillus* (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012), *Penicillium* (FREITAS et al., 2022; SHRIVASTAVA et al., 2012), *Fusarium* (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2014), *Cladosporidium* (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013), *Flammulina* (EISELE et al., 2011) e *Saccharomyces* (DUNLOP; ROON, 1975) com potencial antileucêmico. Entretanto, a produção fúngica nativa, normalmente possui baixo rendimento.

Explorar métodos de extração a partir de células fúngicas, bem como condições de cultivo e a utilização de plataformas que simulam o ambiente celular, além de serem amigáveis ao meio ambiente pode ser interessante considerando-se as limitações da produção fúngica.

Outra alternativa para uma melhor resposta na qualidade e produção de L-ASNase fúngica pode ser explorada em sistemas de expressão heteróloga em organismos geneticamente modificados. Além do aumento do rendimento, outras características podem ser adicionadas na enzima como maior estabilidade, especificidade e feedback de inibição (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; TRIPATHI; SHRIVASTAVA, 2019). Portanto, a produção L-ASNase fúngica em sistemas de expressão heteróloga pode ser uma alternativa para a produção de uma enzima menos tóxica e com maior rendimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEUCEMIAS

As leucemias consistem em um grupo de neoplasias caracterizadas pelo crescimento descontrolado de células sanguíneas e do acúmulo de leucócitos imaturos na medula óssea, que substituem as células sanguíneas saudáveis. Existem mais de 12 tipos de leucemia, sendo as quatro principais: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfoblástica crônica (LLC). O tipo de leucemia varia de acordo com a linhagem de glóbulos brancos, sendo mieloide ou linfoblástica, e a depender do seu crescimento pode ser caracterizada como aguda ou crônica. Sua principal ocorrência é em adultos acima de 55 anos e em crianças de até 15 anos de idade (INCA, 2020, 2022a).

No mundo ocorrem anualmente 249 mil novos casos de leucemia em homens, sendo a décima neoplasia mais incidente, com risco de 6,5/100 mil. Para mulheres, são estimados 187 mil novos casos, com taxa de incidência de 5,0/100 mil, ocupando a décima segunda posição de neoplasia mais incidente neste grupo (BRAY et al., 2018; FERLAY et al., 2013). No Brasil, o número de novos casos para cada ano do triênio 2020 – 2022 é de 5920 em homens e 4890 em mulheres (INCA, 2020). Em relação à mortalidade, no ano de 2020 no Brasil ocorreram 3703 óbitos com uma taxa de bruta de mortalidade de 3,58/100 mil homens e 3035 óbitos com uma taxa bruta de 2,8/100 mil mulheres (INCA, 2022b).

2.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A LLA é uma neoplasia causada por uma série de mutações genéticas nas células linfoblásticas, gerando proliferação, expansão, diferenciação anormais, e redução na capacidade de apoptose, promovendo o acúmulo de células linfoblásticas T ou B na medula óssea, corrente sanguínea e sítios extramedulares, substituindo células saudáveis. Os principais sintomas são anemia, trombocitopenia e granulocitopenia, podendo resultar em meningite leucêmica, anemia, insuficiência hepática e renal, podendo levar o paciente a óbito (EMADI; LAW, 2022; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A LLA apresenta alta incidência entre todas as leucemias, afeta homens e mulheres, adultos, crianças e aflixe todas as regiões do mundo. Apesar da sua alta prevalência, esta leucemia ocorre principalmente em crianças, com seu pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade, e é o tipo mais comum de leucemia em crianças. A LLA corresponde 75% dos diagnósticos de leucemia em crianças e adolescentes e 20% dos diagnósticos de leucemia em adultos (AVRAMIS, 2012; ONCIU, 2009; SOCIETY, 2021). Apesar de apenas 20% dos casos de LLA serem em adultos, esta é a população com maior mortalidade da doença. Crianças e adolescentes apresentam uma alta resposta ao tratamento, enquanto 30 – 40% dos pacientes adultos atingem uma remissão de longo período (JABBOUR et al., 2015; TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017).

A introdução da L-ASNase no tratamento da LLA foi considerada um marco na medicina devido à sua completa remissão em crianças e adolescentes após sua administração (BRUMANO et al., 2019). A ação quimioterápica da L-ASNase consiste na redução da replicação de células leucêmicas por reduzir o suprimento de aminoácidos necessários para a síntese proteica que permite o metabolismo e sobrevivência celular na corrente sanguínea, consequentemente causando apoptose das células malignas (KRALL et al., 2016). Tanto células saudáveis quanto células leucêmicas necessitam do aminoácido L-asparagina para seu funcionamento metabólico. Entretanto, células saudáveis são capazes de sintetizar tanto a L-asparagina quanto a L-asparagina sintetase, enquanto células leucêmicas não possuem esta capacidade de síntese do aminoácido. Desta forma, elas dependem de uma L-asparagina exógena para sua sobrevivência. A administração de L-ASNase leva à morte de células neoplásicas devido à depleção de L-asparagina na corrente sanguínea (BATOOL et al., 2016).

O diagnóstico da LLA ocorre por meio de hemograma completo, esfregaço de sangue, avaliação da medula óssea, estudos histoquímicos, citogenéticos e imunofenotipagem. O diagnóstico indica LLA quando blastos de origem linfoblástica são maiores que 20% das células nucleadas da medula, ou maiores que 20% das células não-eritrócitas, quando o componente eritrócito é > 50% (EMADI; LAW, 2022).

O tratamento quimioterápico para LLA inclui 4 fases gerais: 1) indução da remissão, com a finalidade de obter uma remissão completa; 2) consolidação pós remissão, um tratamento intensivo com quimioterápicos diferentes; 3) manutenção e

reindução, com o uso dos mesmos medicamentos utilizados na fase 1; 4) manutenção, com um tratamento mais brando e mantido por vários meses. Para casos diagnosticados em estágios iniciais, o tratamento consiste em 3 ou 4 ciclos de blocos quimioterápicos pelos primeiros 9 – 12 meses, seguido de 2,5 – 3 anos de quimioterapia de manutenção (EMADI; LAW, 2022). Apesar de longo, o tratamento para LLA utiliza baixas doses de quimioterápicos (ACS, 2019). Os principais antineoplásicos utilizados no tratamento são inibidores da topoisomerase, antraciclinas, antimetabólitos, corticoides e agentes alquilantes (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de medicamentos utilizados no tratamento quimioterápico da LLA.

Fármaco	Classe medicamentosa
Vincristina	Antimitótico
Daunorubicina Doxorubicina Idarubicina	Antraciclina
Etoposídeo	Inibidor da topoisomerase II
Citarabina 6-Mercaptopurina 6-tioguanina Metotrexato	Antimetabólito
L-asparaginase	Inibidor de proteína
Ciclofosfamida	Agente alquilante
Mitoxantrona	Antracediona
Prednisona Prednisolona Dexametasona Hidrocortisona	Corticoide

Fonte: EMADI; LAW (2022).

Os medicamentos quimioterápicos normalmente ocasionam um grande número de efeitos adversos, incluindo perda capilar, feridas na mucosa bucal, perda de apetite, diarreia, náusea, além do aumento do risco de infecções, redução de plaquetas na corrente sanguínea e fadiga. Os principais efeitos de hipersensibilidade

relatados em relação à administração da L-ASNase é o risco do aumento de coágulos sanguíneos, relativos ao fator de coagulação antitrombina III (EMADI; LAW, 2022).

A L-asparaginase é considerada o padrão ouro para tratamento de LLA, estando listada na 22ª Lista de Medicamentos Essenciais e na 8ª Lista de Medicamentos Essenciais Para Crianças da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2021).

2.2 L-ASPARAGINASE

A L-ANSase foi identificada pela primeira vez por LANG (1904), e CLEMENTI (1922) observou a presença da L-ASNase no plasma sanguíneo de porcos-da-índia. Mais de 20 anos depois, KIDD (1953) fez uma progressão de experimentos para provar a habilidade do plasma sanguíneo dos porcos-da-índia funcionarem como inibidores de tumores. Nestes estudos, ele testou injetar de forma subcutânea o sêrum sanguíneo em camundongos com linfossarcoma. Nestes casos, as células cancerígenas não se reproduziram, enquanto camundongos não tratados morreram. Entretanto, foi apenas em 1961 que BROOME (1961) identificou a L-ASNase como o agente antitumoral encontrado no plasma sanguíneo dos porcos-da-índia.

O mecanismo de ação da L-ASNase inclui a catálise da reação de hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido L-asparagina, liberando L-ácido aspártico e amônia (Figura 1) (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

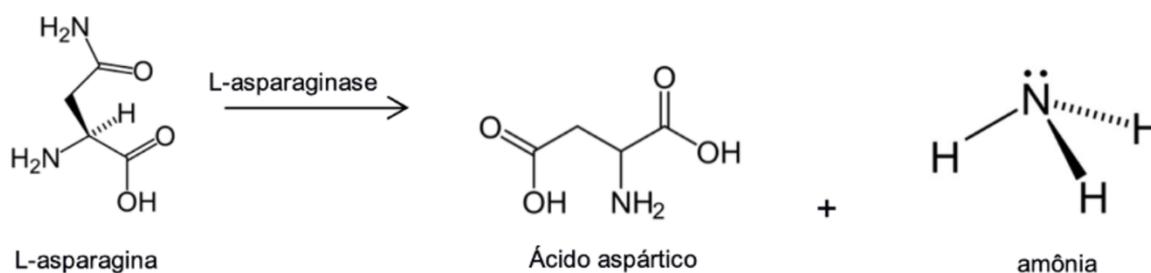


Figura 1. Hidrólise da L-asparagina em L-ácido aspártico e amônia pela ação da L-asparaginase.

Sua ação antineoplásica ocorre devido à necessidade de L-asparagina tanto em células saudáveis quanto leucêmicas para a síntese de proteínas. As células saudáveis utilizam a enzima L-asparagina sintetase para a produção deste aminoácido. Em humanos, esta enzima usa a glutamina para fornecer uma amina e adicioná-la ao aspartato, formando o grupo amida característico da L-asparagina

(GOODSELL, 2005). Células leucêmicas, entretanto, exigem um fornecimento constante do aminoácido L-asparagina devido à ausência da L-asparagina sintetase, obtendo a L-asparagina necessária para seu metabolismo a partir do sangue (Figura 2).

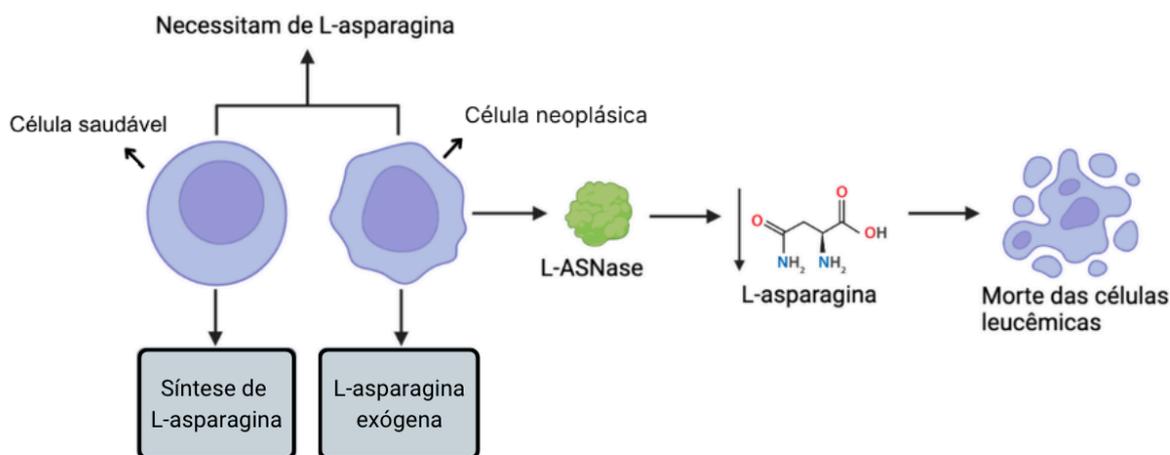


Figura 2. Mecanismo de ação da L-asparaginase na leucemia linfoblástica aguda.

Fonte: autoria própria.

Com a presença da L-ASNase, a L-asparagina da corrente sanguínea é hidrolisada, e conseqüentemente ocorre o bloqueio de ciclos metabólicos da célula neoplásica, levando-as de maneira seletiva à apoptose (LOPES et al., 2017).

A L-ASNase pode ser encontrada em vários organismos e já foi reportada em animais, plantas e microrganismos (bactérias, fungos, algas, leveduras e actinomicetos). Apesar desta grande variedade de fontes, as que tem maior destaque na pesquisa são de origem microbiana, devido sua facilidade para produção em larga escala e seus métodos de produção (PATRO; SATPATHY; GUPTA, 2011). Pelo menos 40 espécies bacterianas já foram reportadas como produtoras de L-ASNase, variando entre gram-positivas e gram-negativas (BATOOL et al., 2016).

A L-ASNase é considerada um biofármaco. De acordo com a legislação brasileira, a RDC 55/2010 da Anvisa define que biofármacos (ou biomedicamentos) podem ser classificados como medicamentos obtidos a partir de fluidos biológicos ou de tecidos de origem animal, ou medicamentos obtidos por procedimentos biotecnológicos (ANVISA, 2010).

A estrutura cristalográfica da L-ASNase II comercial de *E. coli* (Elspar®) realizada por SWAIN et al. (1993a) determinou que a enzima é um homotetrâmero, no qual cada monômero é formado por 330 aminoácidos (Figura 3). O peso molecular total é de 139,04 kDa, sendo que possui 4 subunidades de peso molecular 34,8 kDa. As subunidades são constituídas por dois domínios α/β conectados pelos aminoácidos 191-212 da sequência. O tetrâmetro possui 2 subunidades enzimáticas e dois domínios em cada subunidade, e cada domínio possui um sítio ativo responsável pela catálise dos substratos. Os monômeros são capazes de se associar fortemente, formando dímeros unidos por forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. Os dois dímeros também são ligados da mesma forma, sendo ativos apenas na conformação tetramétrica (Figura 3) (SWAIN et al., 1993).

Além disso, a L-ASNase é uma enzima que se mostra estável estruturalmente em uma ampla faixa de pH (4,5 - 11,5), e apresenta um leve aumento na atividade e estabilidade em valores de pH alcalinos (STECHEER et al., 1999).

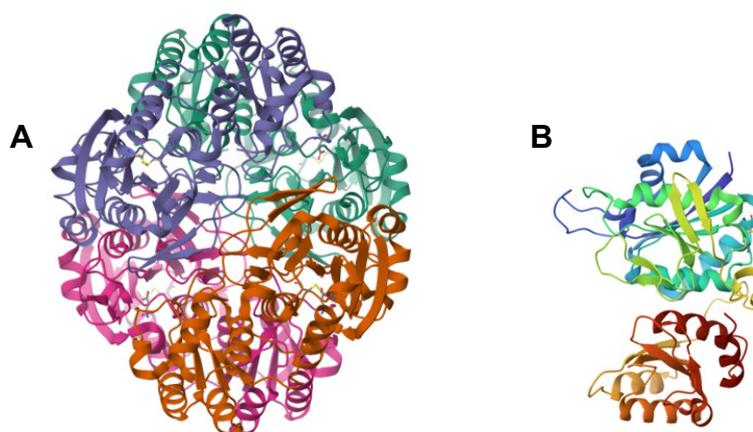


Figura 3. Estrutura cristalográfica do tetrâmero (A) e de um monômero (B) da L-ASNase comercial Elspar®. Protein data bank: 3ECA.

A L-ASNase pode ser classificada em 3 famílias, baseada em suas propriedades bioquímicas e sequência de aminoácidos (MÜLLER; BOOS, 1998). A família 1, a qual pode ser dividida em dois tipos, previamente era considerada L-ASNase do tipo bacteriana, a família 2 é a L-ASNase do tipo vegetal, e a família 3 é composta pela L-ASNase rizobial (BOREK; JASKÓLSKI, 2001; IZADPANA QESHMI et al., 2022).

No sistema de classificação atual, a L-ASNase do tipo bacteriana conserva um motivo contendo treonina na sua sequência de aminoácidos, e um resíduo de lisina correspondendo à EcAll Lys162. Além de bactérias, arqueas e eucariotos também estão incluídos neste grupo (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). A L-ASNase tipo bacteriana é dividida em dois subgrupos que codificam os genes *ansA* e *ansB* que são traduzidos como EcAI (tipo 1) e EcAll (tipo 2). Este sistema de classificação é amplamente aplicado em bactérias, eucariotos e arqueas (LOCH; JASKOLSKI, 2021). A EcAI é citosólica, possui baixa afinidade com a L-asparagina e alta especificidade por L-glutamina. Por outro lado, EcAll é expressa no espaço periplasmático com alta afinidade pela L-asparagina e baixa afinidade pela L-glutamina. Tais propriedades enzimáticas são ideais para seu uso terapêutico (CAMPBELL et al., 1967; IZADPANAH et al., 2018; LOCH; JASKOLSKI, 2021). A nomenclatura (EcAI e EcAll, por exemplo) considera o organismo de origem e o tipo de enzima, com a adição do numeral romano, e é utilizada em outras L-ASNases. Alguns exemplos são PfAI (*Pyrococcus furiosus* tipo 1), HpAll (*Helicobacter pylori* tipo 2), ErAll (*D. dadantii* tipo 2), e EwAll (*E. carotovora* tipo 2) (LOCH; JASKOLSKI, 2021).

A primeira estrutura cristalográfica em alta resolução obtida de uma L-ASNase tipo bacteriana foi da EcAll (Elspar®), o que revelou a presença de um sítio ativo contendo a tríade Thr-Lys-Asp, similar com a tríade Ser-His-Asp encontrada em serino proteases (SWAIN et al., 1993).

A segunda família do sistema de classificação atual é conhecida como L-ASNase de origem vegetal. Elas foram distinguidas por apresentar conservação absoluta no resíduo catalítico de treonina (GUO et al., 1998; LIU; GUAN; ARONSON, 1998; OINONEN et al., 1995; XUAN et al., 1998). Altos níveis de atividade enzimática foram observados em tecidos do desenvolvimento de plantas, como folhas e raízes (MICHALSKA; BUJACZ; JASKOLSKI, 2006). No contexto de plantas altas, duas formas distintas de L-ASNase presentes no citosol foram identificadas: potássio dependente e potássio independente, que apresentam diferenças imunológicas (SODEK; LEA; MIFLIN, 1980). O cDNA da L-ASNase tipo vegetal revela diferenças de enzimas tipo bacteriano, e com similaridades às aspartilglicosaminidases (LOUGH et al., 1992). Tal enzima apresenta sequências semelhantes a L-ASNases de plantas, leveduras, arquea, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *E. coli* (EcAIII, a partir do gene *ybiK*), dentre outros. L-ASNases do tipo vegetal catalisam a hidrólise da cadeia

lateral da amida na L-asparagina, e pertence à superfamília das hidrolases nucleofílicas de N-terminal (IZADPANA et al., 2018). Estudos demonstraram que a variante potássio independente apresenta maior afinidade à L-asparagina, além de baixa afinidade à L-glutamina (CHAGAS; SODEK, 2001; MOHAMED et al., 2016).

A terceira família refere-se à L-ASNase do tipo rhizobial. *Rhizobium etli* é uma bactéria simbiótica fixadora de nitrogênio, hospedeira de plantas leguminosas, e utiliza a L-asparagina como sua única fonte de carbono e nitrogênio através da atividade de duas L-ASNases, uma constitutiva e uma induzível (HUERTA-ZEPEDA et al., 1997). A análise filogenética das sequências da L-ASNase de *R. etli* demonstrou que a enzima induzível não apresenta nenhuma similaridade às L-ASNases das outras famílias (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). Entretanto, a sequência de nucleotídeos da L-ASNase de *R. etli* constitutiva apresentou similaridades às de *E. coli* e *D. dadantii*, sugerindo diferentes especificidades imunobiológicas. Além disso, a L-ASNase do tipo rhizobial constitutiva demonstrou baixa afinidade à L-glutamina (MORENO-ENRÍQUEZ et al., 2012).

O sistema de nomenclatura que inclui a fonte da L-ASNase e o tipo (numeral romano) também é aplicado atualmente às L-ASNases do tipo vegetal e do tipo rhizobial. EcAI e EcAII pertencem à família tipo bacteriana, EcAII (que também é oriunda de *E. coli*) pertence à família tipo vegetal. Diferentes reinos estão presentes nas famílias bacteriana e vegetal, gerando discrepâncias. Em uma revisão da literatura, DA SILVA et al. (2021) propuseram um sistema reformulado desconsiderando a taxonomia biológica das fontes de L-ASNases (LOCH; JASKÓLSKI, 2021).

A L-ASNase tipo II atualmente produzida a partir de *E. coli* (nativa e peguilada) (EcAII) e de *D. dadantii* (ErAII) são utilizadas como agente antitumoral há de 30 anos para o tratamento de LLA, sendo ainda as únicas fontes disponíveis no mercado para uso clínico (BOREK; JASKÓLSKI, 2001). As duas se encontram no espaço periplasmático, que é caracterizado como um compartimento separado pelo citoplasma, o qual o ambiente redutor permite mecanismos mais eficientes para o enovelamento correto das proteínas (MILLER; SALAMA, 2018).

Uma formulação de L-ASNase com alta estabilidade e tempo de meia-vida são cruciais para uma formulação ideal, pois essas características podem evitar a necessidade de múltiplas administrações, o que pode ocasionar menos chances de

reações de hipersensibilidade nos pacientes (KRISHNAPURA; BELUR; SUBRAMANYA, 2015). Uma modificação para prevenir a depleção de L-ASNase na corrente sanguínea, aumentando seu tempo de meia-vida, é a conjugação com PEG (polietileno glicol). Nestas formulações, unidades de PEG são ligadas às enzimas por ligações covalentes (MÜLLER; BOOS, 1998; XIONG et al., 2021; YOSHIMOTO et al., 1986).

As principais manifestações clínicas das reações de hipersensibilidade da administração da L-ASNase incluem anafilaxia, reações alérgicas, edema, broncoespasmo, urticária e erupção cutânea, prurido e inchaço nas extremidades, dentre outros (AVRAMIS, 2012). De 10-15% dos pacientes desenvolvem hipersensibilidade, de 5-10% apresentam pancreatite, 5% trombose, além de hepatotoxicidade em até 60% dos pacientes. Fatores de risco incluem variações genéticas, idade e obesidade (MAESE; RAU, 2022). Além das reações adversas, outro fator limitante é que cerca de 70% dos pacientes tratados com EcAll desenvolvem anticorpos contra a enzima, o que leva à sua inativação (CHEN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2020).

Recursos para reduzir reações indesejadas incluem o uso de enzimas PEGuiladas, pois a camada contendo moléculas neutras de PEG escondem a enzima do sistema imunológico, além de manter a proteína por mais tempo na corrente sanguínea. Esta camada tende a induzir uma menor formação de anticorpos, maior meia-vida e menos imunogênica que L-ASNases nativas de *E. coli* e *D. dadantii* (GOODSELL, 2005; KEATING et al., 2009). Entretanto, reações graves são descritas na bula do medicamento como anafilaxia, trombose, pancreatite, intolerância à glicose, hepatotoxicidade, efeitos no sistema nervoso central, mielossupressão e hiperamonemia (SERVIER, 2020). Apesar da L-ASNase PEGuilada possuir vantagens para sua utilização na prática clínica, ela também pode ser responsável para alta incidência de hiperamonemia em crianças, devido à superprodução de amônia no plasma (HEITINK-POLLÉ et al., 2013; VROOMAN et al., 2019).

A L-ASNase de *D. dadantii* é normalmente utilizada como segunda linha de tratamento, para pacientes que tiveram reações com as L-ASNases de *E. coli* (nativa ou peguilada). No entanto, esta L-ASNase possui um menor tempo de meia vida (0,65 dia) comparado às de *E. coli* nativa (1,2 dia) e da peguilada (5,7 dias), desta forma sendo necessárias administrações mais frequentes para um efeito adequado. Além

disso, o uso de L-ASNase de *D. dadantii* está relacionado a reações anafilactóides, além da formação de anticorpos anti-*D. dadantii* L-ASNase, gerando alterações na farmacocinética durante a administração intravenosa e intramuscular (ALBERTSEN et al., 2002; ASSELIN et al., 2016; EVANS et al., 1980).

A busca de novas fontes microbianas de L-ASNase inclui a busca de enzimas com alta afinidade pela L-asparagina, baixa toxicidade e tempo de meia-vida prolongada. Organismos eucariotos, como fungos, já vêm sendo considerados como alternativa por apresentarem menor toxicidade (SARQUIS et al., 2004). Devido sua maior semelhança com células humanas do que seres procariotos, a enzima de espécies fúngicas possui maior sucesso para o tratamento em humanos do que de outros microrganismos (SHRIVASTAVA et al., 2012). Células fúngicas são capazes de glicosilar proteínas e possuem maior termoestabilidade, portanto é esperado que causam menos imunogenicidade (CHAND et al., 2020). Além dos fungos filamentosos, as leveduras também já demonstraram apresentar menos efeitos adversos, mantendo sua atividade antitumoral (NAGARETHINAM et al., 2012). Outras fontes com atividade antitumoral de L-ASNase encontradas e investigadas na literatura são a partir de actinomicetos e algas (DHEVENDARAN; ANNIE, 1999; PAUL, 1982).

O mercado global da L-ASNase é de 778,8 milhões de dólares (em 2023) e a previsão é de que cresça anualmente até 2030 numa taxa de 16,7%. Além disso, mais de 65% da L-ASNase no mercado é proveniente de *E. coli*, e o setor farmacêutico ser o detentor da maior parte do mercado (MARKETYSERS GLOBAL CONSULTING LLP, 2021). Na Tabela 2 há as formulações de L-ASNase para o tratamento da LLA disponíveis no mercado.

Tabela 2. Lista de formulações de L-asparaginase disponíveis no mercado atualmente.

Nome comercial	Laboratório	País	Microrganismo
Crasnitin®	Bayer AG	Alemanha	<i>E. coli</i>
Elspar®	Ovation Pharmaceuticals	EUA	<i>E. coli</i>
Kidrolase®	EUSA Pharma	Reino Unido	<i>E. coli</i>
Leunase®	Sanofi-Aventis	França	<i>E. coli</i>
Medac®	Kyowa Hakko Kirin	Japão	<i>E. coli</i>
Erwinase®	EUSA Pharma	Reino unido	<i>D. dadantii</i>

Leuginase®	Beijin SL Pharmaceutical	China	<i>E. coli</i>
Spectrila®	Rentschler Biopharma SE	Alemanha	<i>E. coli</i> (recombinante)
Oncaspar®	Exelead, Inc.	Alemanha	<i>E. coli</i> (pergaspase)
Asparlas®	Servier Laboratories	França	<i>E. coli</i> (calaspargase pegol)
Rylaze®	Jazz Pharmaceuticals	Irlanda	<i>D. dadantii</i> (recombinante)
Hamsyl®	Gennova Biopharmaceuticals	Índia	<i>E. coli</i> (pergaspase)

Fonte: PIETERS et al. (2011); LI et al. (2020); MARKETYSERS GLOBAL CONSULTING LLP (2021).

Pergaspase: L-asparaginase de *E. coli* peguilada; calaspargase pegol: L-ASNase de *E. coli* conjugada com pegol.

Além das marcas registradas presentes na Tabela 2, já foram aprovadas uma série de L-ASNases genéricas na Europa e Índia (SANKARAN et al., 2020; SCHNUCHEL et al., 2023). Todas as formulações se apresentam como pó para solução intravenosa, apenas a Rylaze®, recentemente aprovada pela FDA em 2022, é uma injeção intramuscular. A formulação do laboratório irlandês também é aprovada para o tratamento de linfoma linfoblástico, um câncer raro e agressivo que tem sua progressão semelhante à da LLA (MARKETYSERS GLOBAL CONSULTING LLP, 2021).

A primeira L-ASNase recombinante é aprovada para uso clínico foi a Oncaspar®, obtida a partir da PEGuilação da Elspar® em 1994 (HOLLE, 1997). Outras quatro formulações já foram aprovadas para uso clínico, com o uso de estratégias biotecnológicas para mitigar as possíveis reações de hipersensibilidades que a administração da enzima pode causar nos pacientes, Spectrila®, Asparlas®, Rylaze® e Hamsyl®. As abordagens para aprimoramento da L-ASNase usando bioengenharia serão discutidas no capítulo III deste trabalho.

Tendo em vista os crescentes esforços e demanda da uma L-ASNase que tenha mínimos efeitos tóxicos, fontes fúngicas se tornam atrativas, porém a enzima precisa ter alta especificidade e ser capaz de escalonamento industrial. Frente aos recentes avanços tecnológicos no campo de biologia celular e molecular, o uso de bioengenharia pode ser relevante para a obtenção de uma L-ASNase com todas essas as características desejáveis para a indústria farmacêutica.

2.2.1 L-Asparaginase no Brasil

Apesar da sua importância no tratamento da LLA, especialmente em crianças, a L-ASNase não consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) do Ministério da Saúde (MS) desde o ano de 2013 (BRASIL, 2022). Entretanto, até o ano de 2010 o medicamento era listado na categoria de outros agentes citotóxicos, na classe de Medicamentos Utilizados no Manejo das Neoplasias.

Até 2013 o Ministério da Saúde realizava a compra da L-asparaginase da marca Elspar®, fornecida pelo Laboratórios Bagó do Brasil S/A que, por sua vez, detinha os direitos de comercialização da Elspar®, original da empresa Merck Sharp & Dohme (número de registro 100290146, vencimento em 05/2012) (Tabela 3). Em 2011, a Merck Sharp & Dohme transferiu sua tecnologia de produção da Elspar® para a empresa Lundbeck, que em seguida terceirizou sua produção para a Oso Biopharmaceutical. Em agosto de 2012 a empresa anunciou o fim da produção da Elspar®. A partir de janeiro de 2013 houve desabastecimento de L-asparaginase nos hospitais do Brasil.

Tabela 3. Todas as formulações de L-ASNase aprovadas para uso no Brasil pela ANVISA.

Nome do Produto	Empresa Detentora da Regularização	Situação da Regularização	Vencimento da Regularização
L-asparaginase	Laboratório Químico Farmacêutico Bergamo LTDA	Inativo	04/2003
L-asparaginase	Ítaca Laboratórios LTDA	Inativo	05/2005
Elspar®	Prodome Química e Farmacêutica LTDA	Inativo	05/2007
Elspar®	Organon Farmacêutica LTDA	Inativo	05/2012
Elspar®	Laboratórios Bagó do Brasil S/A	Inativo	09/2013
Oncaspar®	Baxalta Brasil Biociência LTDA	Inativo	06/2022
Oncaspar®	Shire Farmacêutica Brasil LTDA	Inativo	06/2022
Oncaspar®	Laboratórios Servier do Brasil LTDA	Ativo	06/2027
Spectrila®	Laboratórios Bagó do Brasil S/A	Ativo	01/2029

Adaptado de ANVISA (2024).

No mesmo ano, o MS realizou uma compra emergencial de 52.300 frascos, com o investimento de R\$ 17,6 milhões, com a intenção de suprir a demanda nacional por um ano (FIOCRUZ, 2013). O MS adquiriu emergencialmente a L-asparaginase

Aginasa®, produzida pela Medac Alemanha e fornecida pelos Laboratórios Bagó do Brasil S/A, nos anos 2013 e 2014, que também não possuía registro pela Anvisa.

Em 2013 e 2014 o MS adquiriu a L-asparaginase Aginasa®, produzida pela Medac Alemanha representada no Brasil pelos Laboratórios Bagó do Brasil S/A, a qual não possuía registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) devido à indeferimento desta pela ausência de estudos clínicos para demonstração de segurança e eficácia. Diante da indisponibilidade do medicamento no mercado brasileiro e do risco de desabastecimento, o MS importou a L-asparaginase conforme determina a legislação nacional para atender a uma demanda emergencial de seis meses. Na ausência de uma empresa com registro no Brasil, em abril de 2016, uma cotação internacional foi realizada, conforme a legislação, para a aquisição emergencial do medicamento. A empresa Xetley, representante legal no Brasil do laboratório chinês Beijing S L Pharmaceutical Co, venceu a licitação ao oferecer menor preço do medicamento Leuginase®, pois apresentou um valor 34,21 % inferior ao da última aquisição conforme lei de licitações. Até 2017 o MS repassava mensalmente um valor médio da quimioterapia dos pacientes com LLA, que dura cerca de três anos. Entretanto, relatos de graves reações adversas ocasionadas pela administração de Leuginase® gerou controvérsias acerca da segurança deste fármaco, necessitando de estudos para verificar tais aspectos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; ZENATTI et al., 2018).

Somente em 2017, um novo medicamento obteve aprovação do registro pela ANVISA, a enzima peguilada Oncaspar®. Atualmente, a Spectrila® da Medac Alemanha e fornecida pelos Laboratórios Bagó do Brasil S/A também é aprovada para o uso no Brasil (Tabela 3). Além disso, a partir da publicação da RDC Nº 488 em 7 de abril de 2021, a ANVISA estabeleceu requisitos para a importação de produtos sujeitos à vigilância sanitária. Portanto, em casos de desabastecimento da enzima para o tratamento de LLA no Brasil, é possível importá-la.

Entretanto, os preços no Brasil ainda são altos. A Oncaspar® (L-ASNase peguilada) pode chegar a mais de R\$ 13.000,00 a ampola (3.750 UI) e a Spectrila® (L-ASNase recombinante de *E. coli*) até R\$ 10.800,00 a ampola (10.000 UI). Apesar da Spectrila® ser fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS), desabastecimentos podem acontecer. Os protocolos de tratamento para ALL, além de conter uma série de medicações indicam altas doses de L-ASNase (EMADI; LAW, 2022).

Na fase de indução da remissão são utilizados corticoesteróides, uma antraciclina, vincristina, L-ANSase e ciclofosfamida. Se a L-ASNase for nativa, são administrados a 5.000 UI/m², em 8 doses. Caso a L-ASNase for peguilada, são 15 doses de 2.500 UI/m². Em caso de alergia, há a troca para a formulação de L-ASNase de *D. dadantii* (20.000 UI/m², três vezes por semana). Na intensificação, a L-ASNase também é administrada, normalmente de 14 doses (1.500 UI/m²), ou a depender dos exames laboratoriais. Na fase de intensificação também pode ocorrer a administração de 4 doses L-ASNase (5.000 UI/m²), a depender dos exames laboratoriais (EMADI; LAW, 2022; KLOOS et al., 2017). Considerando os custos da L-ASNase e dos outros medicamentos associados ao tratamento, exames laboratoriais, gastos para a administração e o cuidado farmacêutico, os custos para o tratamento de LLA são elevados.

Diante deste cenário, vê-se a necessidade de estudar alternativas para a produção de L-ASNase, visando apoiar a produção nacional de L-ASNase, redução de custos e de efeitos de hipersensibilidade aos pacientes.

2.2.2 L-Asparaginase de fungos filamentosos do cerrado

Considerando a alta taxa de imunogenicidade de L-ASNases oriundas de bactérias, além da crise de desabastecimento do medicamento ocorrida em 2013 no Brasil, a partir de 2015 o grupo de pesquisa “Produção de L-Asparaginase de Origem Fúngica em Formulação Estável Para Tratamento Antileucêmico” coordenado pela profa. Dra. Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista, da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília vem desenvolvendo estudos acerca de L-ASNases tipo II de fungos filamentosos do cerrado. Na literatura, L-ASNases de fungos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. já haviam apresentado atividade catalítica (SARQUIS et al., 2004). L-ASNases de *Bipolaris* sp. (LAPMAK et al., 2010) e *Mucor hiemalis*. (MONICA et al., 2013) também já haviam sido encontradas. Em relação à atividade anti-tumoral realizada *in vitro*, a L-ASNase de *P. cyclospium* inibiu o crescimento de linhagens celulares de câncer de mama (MCF7), carcinoma hepatocelular (Hep-G2) e de câncer de próstata (PC3) (SHAFEI et al., 2015). Além disso, considerando que os fungos filamentosos são evolucionariamente mais próximos a seres humanos, em comparação com bactérias, uma menor imunogenicidade era esperada (SHRIVASTAVA et al., 2012).

Inicialmente, 22 isolados fúngicos isolados a partir do solo do cerrado foram triados em relação à formação de halo ao redor da colônia, utilizando vermelho de fenol como marcador de pH. Os fungos compunham espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor*, *Guignardia*, *Phaecilomyces* e *Trichoderma*. Em todos foi possível observar a presença de halo, porém, apenas em *Aspergillus terreus* e *A. flavus* foram identificados genes descritos para a produção da enzima. Em meio líquido, os fungos *Guignardia mangiferae*, *Aspergillus sydowii*, *P. crustosum*, *A. terreus*, *P. decumbens*, *P. glandicola*, *A. versicolor*, *P. aurantiogriseum* e *Fusarium* sp. Apresentaram atividade enzimática (U/mL), variando entre 0,019 – 0,610. A maior atividade foi encontrada em *G. mangiferae* (ALMEIDA, 2015). Testes de melhoramento de produção foram realizados e a L-prolina foi identificada como a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de L-ASNase.

CARDOSO (2018), avaliou o cultivo submerso do fungo filamentosso do cerrado 2DSST1 (não identificado) em resíduos agroindustriais (farelo de trigo e casca de soja). O meio de cultivo foi otimizado considerando L-asparagina, L-prolina e sulfato de amônia como fontes de nitrogênio, e resíduo, caldo batata dextrose, sacarose, glicose e extrato de levedura como as fontes de carbono. O meio com a maior relação C/N (3,37) apresentou maiores atividades catalíticas (2,33 U/mL), com o farelo de trigo. Posteriormente, foi realizada a purificação da L-ASNase obtida a partir deste cultivo com sistema micelar de duas fases aquosa, o qual apresentou 1,4 como o fator de purificação máximo e rendimento de até 100%.

ANDRADE (2019) identificou uma nova espécie produtora de L-ASNase do cerrado, o *P. cerradense*, com atividade máxima de 2,36 U/g_{cél.} Este resultado foi obtido após otimização do meio de cultivo, com a relação C/N de 1,7, sendo a L-prolina e o sulfato de amônio as principais fontes de nitrogênio. FREITAS (2020) realizou triagem com 22 fungos filamentosos isolados do solo do cerrado produtores de L-ASNase. Como a atividade de GLNase está relacionada à presença de efeitos adversos, nesta triagem também foi avaliada a atividade enzimática de GLNase (FONSECA et al., 2021; FREITAS et al., 2021). Os fungos *P. sizovae* e *F. proliferatum* foram identificados e apresentaram maiores atividades catalíticas, além de não apresentarem atividade de GLNase. Após otimização dos meios de cultivo de cada fungo, as maiores atividades obtidas foram de 1,13 U/mg_{proteína} (*P. sizovae*) e 0,96 U/mg_{proteína}, sendo as razões C/N de 2,06 e 2,64, respectivamente. No mesmo estudo,

o extrato bruto de *P. sizovae* (obtido por maceração) foi submetido à purificação por cromatografia de exclusão de tamanho e de troca iônica, tendo os fatores de purificação de 0,36 e 0,32, respectivamente. Os rendimentos foram de 9,22 e 3,48, respectivamente (FREITAS et al., 2021).

A partir destes resultados, foi possível observar que apesar de promissoras as L-ASNases dos fungos *P. sizovae* e *F. proliferatum*, suas purificações foram ineficazes tanto com cromatografia, quanto com sistemas micelares de duas fases, sendo o último o mais promissor por apresentar fator de purificação maior que 1, além de um alto rendimento. Entretanto, as atividades enzimáticas foram baixas com as duas estratégias de purificação. Como forma de aumentar a produção de L-ASNase nas duas espécies fúngicas, técnicas de bioengenharia foram aplicadas visando um aumento na atividade catalítica, na purificação e no rendimento.

A primeira estratégia abordada foi a expressão heteróloga da L-ASNase de *P. sizovae* na levedura *Komagataella phaffii*, por ser um sistema eucarioto, com alto rendimento, rápido crescimento, expressar com sucesso proteínas maiores de 50 kDa, permitir modificações pós-translacionais (FREITAS, 2020). A expressão da L-ASNase foi confirmada por PCR e diferentes meios de cultivo foram avaliados ao longo de 72 h de incubação. A maior atividade de L-ASNase intracelular (tipo II) foi de 3,05 U/g_{cél.}, não sendo identificada no meio extracelular (FREITAS et al., 2022).

O gene da L-ASNase de *F. proliferatum* foi clonado também em *K. phaffii*, entretanto, utilizando um peptídeo sinal visando uma produção extracelular. Porém a expressão ocorreu intracelularmente, atingindo atividade enzimática específica máxima de 1,04 U/mg_{proteína}. Foi realizada purificação por cromatografia de troca iônica o qual teve fator de purificação de 0,29 e rendimento de 7,25%. Ensaio de citotoxicidade contra células da linhagem Jukat foram realizados, observando-se redução na proliferação celular (CARDOSO, 2023).

Paralelamente, ANDRADE (2023) utilizou ferramentas *in silico* para caracterizar a enzima de *P. cerradense*, propondo um modelo estrutural e verificando seu grau de imunogenicidade compatível ao uso clínico (epítomos de células T e B). A predição de imunogenicidade também foi realizada com a L-ASNase de *P. sizovae*, dentre outras espécies *Penicillium* sp., *Aspergillus*, devido suas semelhanças filogenéticas, e as bacterianas de *D. dadantii* e *E. coli*, as que são utilizadas no mercado atualmente. Quando avaliados os epítomos de células T, que estão relacionadas a reações

alérgicas, a L-ASNase de *P. sizovae* apresentou uma densidade de epítomos menor que a enzima de *E. coli* e *D. dadantii* (0,492, 0,526 e 0,653, respectivamente). A predição de epítomos de células B avaliou a habilidade da enzima gerar anticorpos. Nesta avaliação, dentre as espécies de *Penicillium*, a L-ASNase de *P. sizovae* apresentou o menor nível de imunogenicidade (0,052), menor que a da enzima de *E. coli* (0,117) e de *D. dadandii* (0,061) (ANDRADE et al., 2024).

Avaliando esses estudos, observa-se o potencial clínico da L-ASNase de *P. sizovae*, devido seu grau de imunogenicidade predito, menor que das enzimas disponíveis atualmente no mercado, bem como em relação às reações alérgicas. Entretanto, é necessária a otimização da expressão, por ela não ter sido satisfatória nem com a cepa selvagem, nem com a expressão em levedura. Visando uma maior expressão, com maior rendimento e purificação, foi considerado para o presente estudo duas abordagens: uma com a enzima nativa e outra com a enzima heteróloga de *P. sizovae*. A enzima nativa foi produzida e purificada com sistemas aquosos bifásicos polímero-sal, visto o alto rendimento da L-ASNase de *F. proliferatum* purificada com sistemas micelares de duas fases aquosas. Também foram avaliados meios de cultivo, métodos de extração da enzima e solventes. A enzima heteróloga foi expressa em sistema de *E. coli* BL21(DE3) com o vetor pet28a. Este sistema promove rápido crescimento celular com meios de cultivo baratos, além da não expressão de proteases, e um forte promotor (T7). Todos estes fatores propiciam a expressão enzimática na fração insolúvel, em corpos de inclusão. Apesar de não possuírem atividade enzimática, os corpos de inclusão possuem vantagens na produção de biofármacos, por gerarem produtos com alta pureza, rendimento e fator de purificação. A enzima recombinante foi avaliada quanto às condições de cultivo do hospedeiro, além de solubilização dos corpos de inclusão e testes de redobramento da enzima.

CAPÍTULO II

**Produção, extração e purificação da L-asparaginase do fungo *Penicillium*
sizovae por sistemas aquosos bifásicos polímero-sal**

1 INTRODUÇÃO

A L-ASNase disponível atualmente no mercado para o tratamento de câncer é de origem procariótica (*Escherichia coli* e *Dickeya dadantii*), apresentando uma série de complicações e reações de hipersensibilidade. Além disso, a contaminação com glutaminase (GLNase) e uma curta meia-vida são os maiores problemas relacionados à ineficiência da L-ASNase bacteriana (EL-NAGGAR; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; PARASHIVA et al., 2023). Por outro lado, a L-ASNase fúngica possui menos reações adversas por ser de origem eucariótica. Várias espécies vêm sendo estudadas, bem como seu potencial anti-tumoral (SARQUIS et al., 2004). Já foram reportados na literatura L-ASNase fúngica dos gêneros *Aspergillus* (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012), *Penicillium* (FREITAS et al., 2022; SHRIVASTAVA et al., 2012), *Fusarium* (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2014), *Cladosporidium* (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013), *Flammulina* (EISELE et al., 2011), *Saccharomyces* (DUNLOP; ROON, 1975), e *Ganoderma* (CHAKRABORTY; SHIVAKUMAR, 2021) com potencial antileucêmico.

Após uma triagem entre 40 fungos filamentosos coletados a partir do solo do cerrado brasileiro, o fungo *Penicillium sizovae* se destacou em relação aos outros, quanto à sua atividade de L-ASNase, além de apresentar baixa atividade de GLNase (FREITAS, 2020; FREITAS et al., 2021). A L-ASNasePS (L-ASNase do fungo *P. sizovae*) é uma enzima formada por 4 monômeros, sendo uma proteína de 139,0 kDa em sua conformação tetramérica, sendo assim mais susceptível à degradação durante seu processamento. Desta forma, é preciso avaliar os processos *upstream* e *downstream* que mantenham sua estabilidade e rendimento (MITRAGOTRI; BURKE; LANGER, 2014).

A etapa *upstream* consiste no seu cultivo celular. Sendo que todas as formulações de L-ASNase para uso clínico presentes no mercado são de origem bacteriana, e há apenas duas enzimas comercializadas de origem fúngica (*Aspergillus nigger* e *Aspergillus oryzae*) utilizada na indústria alimentícia. Apesar das diferentes origens, a produção em escala industrial ocorre principalmente por fermentação submersa. Esta produção é influenciada por uma série de fatores como relação de carbono e nitrogênio, bem como suas fontes, pH, temperatura, tempo de fermentação e aeração (LOPES et al., 2017).

FREITAS (2020) avaliou diferentes fatores relacionados à produção de L-ASNase em cultivos de *P. sizovae*. Os nutrientes foram: L-prolina, L-asparagina, ureia, nitrato de sódio, sulfato de amônio, peptona, extrato de levedura, glicose, sacarose e extrato de malte. Condições de crescimento como temperatura e tamanho do inóculo foram consideradas. Entretanto, apesar de afunilarem as condições de cultivo, não foi possível chegar a uma condição final mais favorável à produção de L-ASNase, pois os dois meios apresentaram atividades específicas sem diferenças estatísticas (1,02 e 1,13 U/mg_{proteína}). Desta forma, uma nova avaliação dos meios de cultivo, considerando as outras etapas do processo podem ser útil na identificação de condições de cultivo que promovem maior produção enzimática.

O *downstream* representa todos os processos após o cultivo celular. Estes processos levam à purificação da proteína alvo, até o produto final. As etapas *downstream* podem atingir entre 50 – 80% dos custos totais da produção da enzima. O *downstream* inclui o rompimento celular, a precipitação das proteínas (quando necessário), seguida da sua purificação. Portanto, uma otimização de todos os processos pode resultar na redução de custos totais e maior rendimento enzimático (LOPES et al., 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FUNGOS FILAMENTOSOS COMO FONTES DE BIOMOLÉCULAS

Dentre os microrganismos não patogênicos capazes de produzir moléculas de interesse humano, os fungos filamentosos são particularmente interessantes devido sua facilidade de cultivo. Os fungos filamentosos desempenham um papel fundamental na natureza degradando matéria orgânica, sendo capazes de degradar os mais complexos substratos. Seu modo de crescimento, através dos filamentos, permite sua colonização em diversos substratos, além de possuírem uma proporção superfície/volume alta, facilitando a absorção de nutrientes (GUIMARÃES et al., 2006). Desta forma, fungos podem secretar uma série de metabólitos, primários e secundários, como ácidos orgânicos, compostos antimicrobianos e uma grande variedade de enzimas (WÖSTEN, 2019).

Os fungos filamentosos possuem alto potencial na indústria por serem eficientes e sustentáveis “fábricas celulares” (SUN et al., 2024). O mercado atual exige estratégias sustentáveis além de demandar compostos naturais. Fungos filamentosos são capazes de produzir, por exemplo, ácido cítrico e kójico, os quais possuem alto interesse nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Por outro lado, a produção enzimática é uma característica de destaque dos fungos filamentosos. Por possuírem um sistema de hidrólise eficiente, podem ser utilizados não só para a produção de enzimas como também em processos para a agricultura, biorremediação e alimentação (GANDÍA; GARRIGUES, 2024).

A utilização de enzimas fúngicas sempre esteve presente em nossa sociedade, vindo de tradições milenares que incluem a preparação de bebidas, pães e bolos. Entretanto, o primeiro registro de patente de uma enzima fúngica data de 1894 com a Taka-díastase, uma α -amilase de *Aspegillus oryzae* cultivada em arroz, registrada por KANGO; JANA; CHOUKADE (2019). Evoluindo para os tempos atuais, há um maior entendimento sobre suas funções e estrutura, permitindo novas utilizações de enzimas industriais. As enzimas fúngicas promovem a catálise de uma série de reações químicas, além de oferecer uma série de vantagens econômicas. Desta forma, mais da metade das enzimas industriais utilizadas hoje no mundo são de origem fúngica (PECIULYTE et al., 2017). Os fungos têm sido importantes em processos biotecnológicos tanto ancestrais quanto modernos. Tais processos e produtos incluem uma variedade de moléculas e enzimas com as mais diversas

finalidades. O uso de células fúngicas para a produção da maior parte das enzimas industriais se baseia nas suas características como tolerância ao pH, termo estabilidade, rendimento, baixos custos operacionais, processos *downstream* fáceis e baratos, dentre outros. Além disso, enzimas fúngicas são caracterizadas por alta produtividade, facilidade na purificação e separação, e eficiente estabilidade de catálise em condições severas (KANGO; JANA; CHOUKADE, 2019).

Dentre as principais enzimas fúngicas do mercado estão as proteases, lipases e celulasas. Estas enzimas são utilizadas em processos industriais de amido, bebidas, alimentos, têxtil, alimentação animal, papel, couro, químicos, produtos biomédicos e aplicações no meio ambiente (Figura 4) (GUIMARÃES et al., 2006; WEISS et al., 2020).

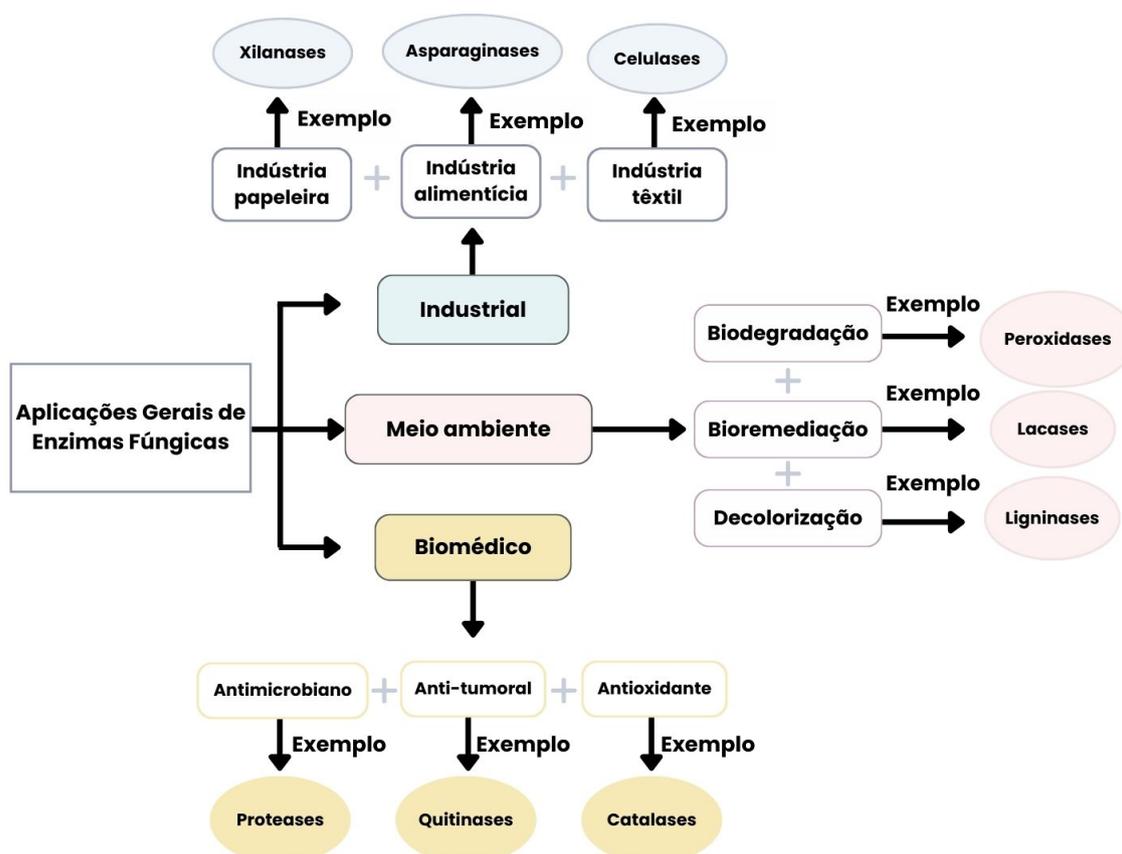


Figura 4. Aplicações de enzimas fúngicas nos setores industrial, do meio ambiente e biomédico.

Adaptado de EL-GENDI et al. (2022).

Devido a versatilidade de substratos que os fungos são capazes de degradar, muitas enzimas fúngicas são robustas o suficiente para resistir a condições de escassez de água e altas temperaturas. Especialmente na fermentação em estado sólido de substratos complexos, como resíduos agroindustriais, naturalmente é favorecido o crescimento fúngico xerofítico, devido à menor biodisponibilidade de água (DIAZ et al., 2016; HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004).

Nas últimas décadas, o mercado de enzimas apresentou um rápido crescimento. Em 2017 foi avaliado em 7 bilhões de dólares, e a projeção para 2024 é de 10,5 bilhões de dólares. Este crescimento está relacionado à maior demanda de enzimas amilolíticas e celulolíticas utilizadas para a geração de biocombustíveis (KANGO; JANA; CHOUKADE, 2019). Dentre as principais 260 enzimas comerciais não farmacêuticas, 60% são obtidas a partir de 25 gêneros de fungos. Os principais microrganismos são *Aspergillus* sp. (representando 25%), *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Humicola*, sp. O mercado de enzimas industriais é dominado por hidrolases (85%), oxidoreductases (8%), lipases (4%), transferases (2%) e isomerases (1%) (AMFEP, 2015).

Apesar da maior parte do mercado global da L-ASNase ser de origem bacteriana, pelo seu uso no tratamento da LLA, a L-ASNase fúngica também possui importância econômica devido seu uso na indústria de alimentos.

2.1.1 L-Asparaginase fúngica na indústria

Em 2002 foi descoberto que alimentos ricos em carboidratos submetidos a altas temperaturas apresentaram altos teores de acrilamida (TAREKE et al., 2002). A acrilamida é formada entre um açúcar redutor e a L-asparagina, durante a fritura e cozimento do amido a mais de 120 °C, em baixa umidade, através de um processo não enzimático chamado reação de Maillard. O mecanismo envolve a formação de uma base de Schiff, seguido da descarboxilação e eliminação da amônia ou de uma imina substituída com o calor, formando assim a acrilamida (Figura 5A) (JIA et al., 2021; ZYZAK et al., 2003). A acrilamida é neurotóxica, genotóxica, carcinogênica e tóxica ao sistema reprodutor humano (CORRÊA et al., 2021; TAREKE et al., 2002). A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer classificou a acrilamida como um provável carcinogênico humano (Grupo 2A) (STADLER et al., 2002).

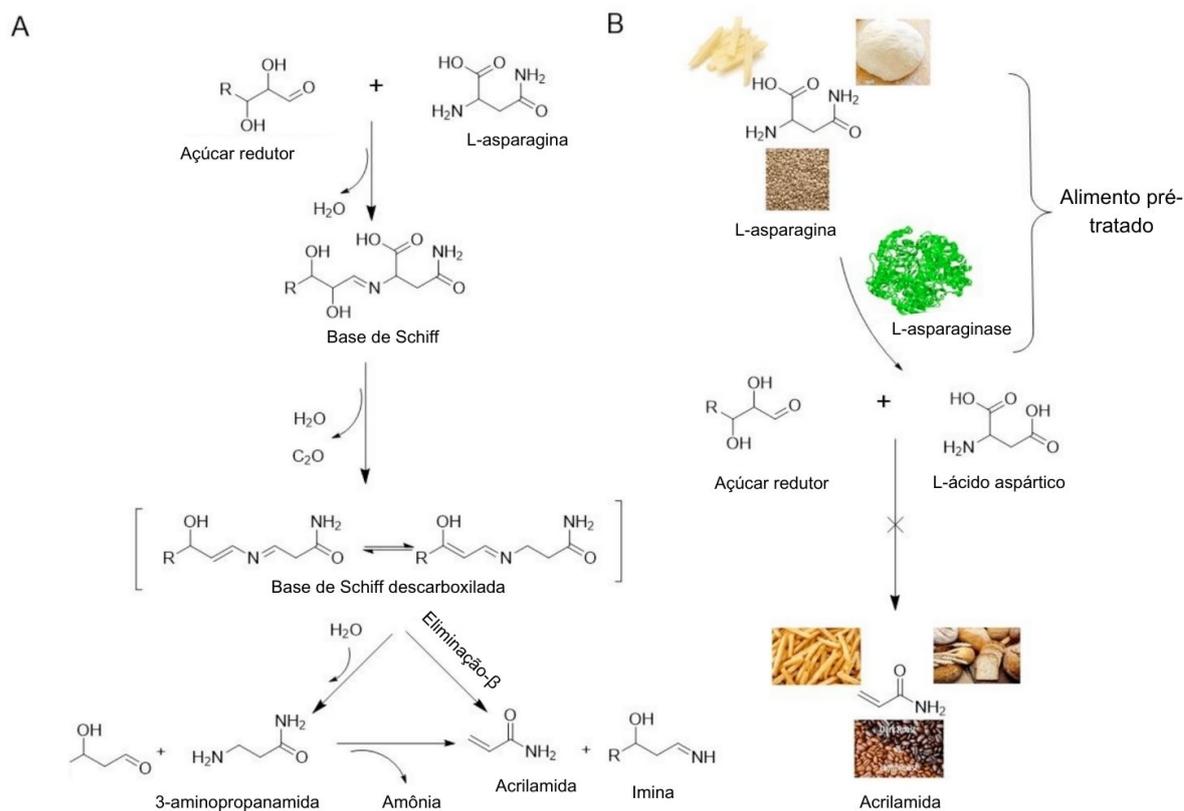


Figura 5. Mecanismo da formação da acrilamida e da sua mitigação pela L-ASNase. **(A):** Formação da acrilamida a partir de um açúcar redutor e da L-asparagina. **(B):** Mitigação da acrilamida em alimentos através da conversão da L-asparagina em L-ácido aspártico pela L-ASNase.

Adaptado de JIA et al. (2021)

As estratégias de mitigação de acrilamida propostas vão desde a seleção de matéria-prima, composição dos produtos, otimizações de condições de processamento e pré-tratamentos. Entretanto, o tratamento enzimático é uma alternativa mais simples e efetiva para reduzir a acrilamida presente nos alimentos sem afetar o sabor e as propriedades nutricionais do alimento (JIA et al., 2021; KORNBRUST et al., 2009). O tratamento dos alimentos ricos em carboidratos antes o aquecimento com L-ASNase impede que a reação de Maillard ocorra, devido à hidrólise da L-asparagina em L-ácido aspártico, reduzindo em até 99% a formação de acrilamida (Figura 5B) (LINDSAY; JANG, 2005).

L-ASNases obtida a partir de *A. oryzae* e *A. niger* são utilizadas atualmente na indústria de alimentos sob os nomes comerciais de Acrylaway[®] e PreventAse[®], respectivamente (MUNEER et al., 2020). Estas enzimas possuem uso seguro e

recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como aditivos alimentares, e reconhecida pela Food and Drug Administration (FDA) como *generally recognized as safe* (GRAS), geralmente reconhecido como seguro, tradução livre), além disso, a L-ASNase é degradada nos processos de aquecimento, garantindo sua degradação após a hidrólise da L-asparagina (CORRÊA et al., 2021; HENDRIKSEN et al., 2009; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

2.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE FUNGICA

2.2.1 *Upstream e downstream*

Os processos para a produção enzimática consistem nos estágios iniciais da biotransformação. Estas etapas incluem o planejamento e preparação do meio de cultivo do fungo, obtenção da enzima, seleção dos solventes para compor o extrato bruto e otimização de metodologias. A escolha dos processos *upstream* também afeta os processos *downstream*, envolvidos posteriormente na purificação. Por exemplo, uma extração com a presença de muitas proteínas contaminantes dificulta a purificação da proteína (GUAJARDO; SCHREBLER, 2023; RINALDI et al., 2016).

Portanto, os parâmetros relacionados à fermentação microbiana são determinantes. Extratos enzimáticos obtidos a partir de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* já vem demonstrando resultados interessantes de atividade enzimática para a enzima L-ASNase (16,05 – 43,99 U/mL) em meio Czapek-Dox (pH 6,0 – 6,3, 30 – 35 °C, 140 – 160 rpm, 96 h) suplementado com asparagina, L-prolina e sacarose (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2011, 2012). Por outro lado, resultados com menor atividade enzimática foram reportados em cultivos de fungos do mesmo gênero, no mesmo meio, porém suplementados apenas com glicose e asparagina, a 35 °C, 120 rpm e 96 h (ZIA et al., 2013).

Em outro estudo, foram detectados valores de atividade enzimática entre 404,0 e 376,0 U/mL em um cultivo submerso de *Fusarium semitectum* e *Fusarium moniliforme* utilizando L-prolina e glicose como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente (TIPPANI; SIVADEVUNI, 2014). Estes resultados demonstram a importância da escolha das fontes de carbono e nitrogênio para uma maior produção de L-ASNase.

Além do cultivo submerso, alguns estudos utilizando a fermentação em estado sólido e quantificaram elevada atividade enzimáticas (LOPES et al., 2017). UPPULURI

et al. (2013) registraram uma produção de 344,0 U/g_{substrato} de L-ASNase de *A. niger* em torta de gergelim preto. Cultivos de *Aspergillus* sp. em casca de laranja e em romã produziram 70,67 U/g_{substrato} e 253,0 U/g_{substrato}, respectivamente (NAIR et al., 2013; RANI; SUNDARAM; VASANTHA, 2012). Apesar da alta produção enzimática em cultivos em estado sólido, estes cultivos requerem meios complexos e difícil de alcançar os parâmetros de pureza necessários para aplicações farmacêuticas (LOPES et al., 2017).

2.2.2.1 Lise celular

A lise celular é a primeira etapa para a obtenção da enzima a partir do microrganismo, visando um maior rendimento (GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020). Especialmente em escala industrial, a escolha da técnica utilizada é um desafio. É necessário considerar seletividade, eficiência de energia, custos operacionais e facilidade para escalonamento (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; MEVADA; DEVI; PANDIT, 2019).

A primeira etapa para a obtenção da L-ASNase de interesse farmacêutico inclui a desintegração da membrana celular (COSTA-SILVA et al., 2018). Esta etapa é necessária porque existem dois tipos de L-ASNase de origem microbiana, tipo I e tipo II. A L-ASNase tipo II é a enzima de interesse clínico, pois é esta que apresenta alta afinidade pela asparagina e, portanto, maior atividade antitumoral (SOUZA et al., 2017). Este tipo de L-ASNase encontra-se no espaço periplasmático das células, portanto a etapa de rompimento celular é crítica para sua recuperação (CHAKRAVARTY et al., 2021; SOUZA et al., 2017).

Os métodos devem ser avaliados de acordo com a espécie microbiana, tempo e temperatura de cultivo, bem como o meio. Em bactérias a maior barreira é a camada peptidoglicana, em leveduras a espessa parede celular de β -glucanas e manoproteínas fosforiladas, enquanto em fungos filamentosos a parede celular se forma em várias camadas de β -glucanas, glicoproteínas e quitina (Figura 6) (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; KULA; SCHÜTTE, 1987).

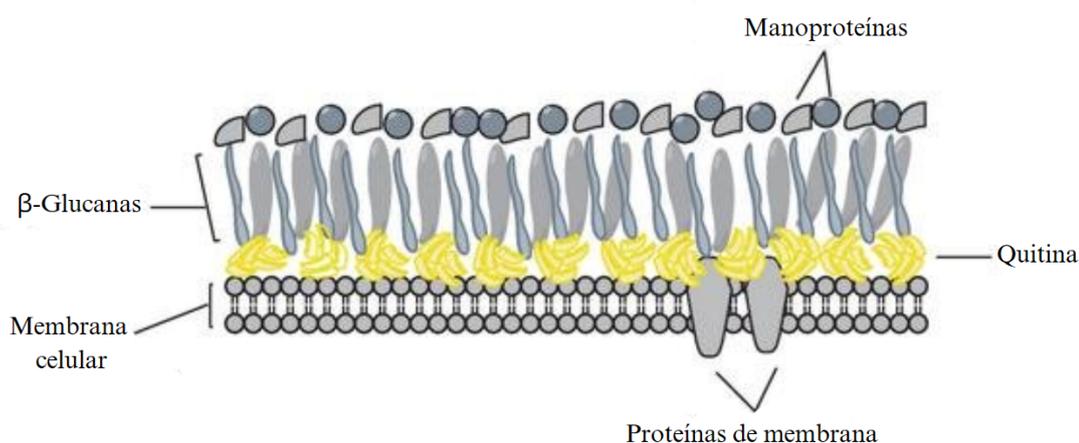


Figura 6. Componentes da parede celular fúngica.

Adaptado de VEGA; KALKUM (2012).

As técnicas utilizadas para o rompimento celular podem ser severas, gentis, ou uma combinação das duas. Os métodos mecânicos são os mais severos, devido sua não especificidade e, porque além de romper a célula, podem promover a destruição de componentes da membrana, e possivelmente das proteínas de interesse (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020). As principais técnicas mecânicas incluem ultrassonicação, homogeneização à alta pressão, e prensa francesa (ZHOU et al., 2014). Já as técnicas não mecânicas, as quais são menos agressivas às células, possuem alta seletividade e especificidade. Estes métodos incluem choque osmótico, congelamento e descongelamento, lise celular, e tratamentos com solventes e detergentes (GECIOVA; BURY; JELEN, 2002; GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020; MANERA et al., 2011). Solventes orgânicos (etanol, acetona, tolueno, éter, acetato de etila) são comumente utilizados para a recuperação de enzimas e biomoléculas (GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020).

Além dos métodos citados anteriormente, novos métodos vêm sendo desenvolvidos considerando o tipo de parede celular de cada microrganismo. Por exemplo, pérolas de vidro, ou outros materiais do mesmo formato, são amplamente utilizados para a recuperação de biomoléculas de bactérias, fungos, leveduras e microalgas (GOLDBERG, 2015; MONTALESCOT et al., 2015).

A agitação das células fúngicas com barra magnética em solventes promove uma permeação celular, sendo capaz de extrair e promover a recuperação de biomoléculas de origem fúngica e de leveduras (MUSSAGY et al., 2022b, 2022a).

Pode-se considerar este um método misto, devido ao uso da barra magnética e por ser uma extração sólido-líquido, com o uso de solventes. Apesar disso, é um método não agressivo, visto que é possível controlar sua temperatura e intensidade, e bastante versátil por poder permitir o uso de uma série de solventes orgânicos e líquidos iônicos (LIs). LIs e solventes eutéticos profundos são sais que possuem alta carga positiva, normalmente ligados em um ânion orgânico ou inorgânico. ILs são considerados solventes amigáveis ao meio ambiente, bem como possuem várias propriedades físico-químicas de interesse como baixa pressão de vapor, baixa inflamabilidade, alta condutividade iônica, alta capacidade de dissolução, e estabilidade térmica e química (ZHAO; BAKER, 2013).

2.2.2.2 Solventes

A escolha do solvente para a extração sólido-líquido na etapa da lise celular é fundamental. É importante que o solvente tenha afinidade com a proteína, que não degrade a mesma e que também não a precipite. Além dos solventes citados anteriormente, misturas ternárias podem ser uma opção a se considerar, visto que já apresentam bons rendimentos na extração e recuperação de biomoléculas de fungos e leveduras (MUSSAGY et al., 2021, 2023).

A escolha do solvente deve considerar a polaridade da enzima, o ponto isoelétrico, não desnaturar a enzima, além de sua toxicidade ao meio ambiente, a qual idealmente deve ser baixa. Além disso, o solvente pode auxiliar na atividade enzimática, por aumentar a taxa de conversão e rendimento (GUAJARDO; SCHREBLER, 2023). Além do uso de solventes de baixa polaridade amigáveis ao meio ambiente, como etanol, solventes eutéticos profundos (SEP) são uma possibilidade devido ao seu baixo custo, facilidade de produção e baixa toxicidade (LING; HADINOTO, 2022).

SEPs são formados por um receptor de hidrogênio, como cloreto de colina, e um doador de hidrogênio, como álcoois, ácidos orgânicos, ou ureia (ABBOTT et al., 2003; LING; HADINOTO, 2022). SEPs vem sendo aplicados como meio de reação para catálise enzimática, pois permitem reações com substratos de diferentes polaridades. Além disso, a adição de uma baixa fração de água reduz efetivamente a viscosidade dos SEPs (GUAJARDO et al., 2016, 2017; ROMANO et al., 2023).

Devido sua alta presença em células vivas, a água continua sendo o principal solvente utilizado para a extração de uma série de componentes celulares como ácidos nucleicos, carboidratos e principalmente enzimas (BUTLER, 1979). Entretanto, é interessante estudar solventes menos polares que a água, sejam puros ou em misturas ternárias com água, especialmente em extrações que visam enzimas presentes no espaço periplasmático das membranas, devido aos diferentes graus de polaridade das membranas celulares. Além disso, o uso de solventes e misturas menos polares que a água também é relevante para o entendimento da enzima em questão (BUTLER, 1979; PINHO; PASSOS, 2011).

Entretanto, um fator crucial a ser analisado é o efeito do solvente orgânico na proteína, pois é possível ocorrer a desnaturação da enzima. É importante o desenvolvimento de processos extrativos para caracterizar o impacto do solvente orgânico na estrutura da proteína, para fins de conhecimento acerca da enzima. Existem uma série de enzimas que possuem boa estabilidade e atividade quando extraídas por solventes orgânicos a partir de microrganismos, elas enzimas são chamadas de enzimas tolerantes a solventes orgânicos (DOUKYU; OGINO, 2010). Algumas destas enzimas são proteases, lipases, amilases e tirosinares (DOUKYU; KUWAHARA; AONO, 2003; GUPTA; KHARE, 2007; ITO et al., 2001; OGINO et al., 2004)

2.2.2.3 Sistemas aquosos bifásicos (SABs)

As técnicas tradicionais de purificação de proteínas incluem precipitação e cromatografia em coluna, que normalmente possuem baixos rendimentos e altos custos. Novas abordagens vêm sendo utilizadas, como a centrifugação seguida de eletroforese, porém esta apresenta dificuldades no escalonamento para a indústria, além de altos custos. Uma técnica eficiente, custo-benefício, rápida, fácil e amigável ao meio ambiente são os sistemas aquosos bifásicos (SABs) (SINGLA; SIT, 2023).

SABs são produzidos quando uma combinação de solutos hidrofílicos apresenta incompatibilidade acima de concentrações críticas. Podem ser sistemas polímero/polímero, polímero/sal, etanol/sal e micelares. No caso dos sistemas com polímeros, grandes agregados são formados e os dois polímeros tendem a se separar em duas fases diferentes devido à exclusão estérica. Os polímeros mais utilizados são polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol (PPG) e dextran. No caso dos sistemas

polímero/sal, o fenômeno de exclusão é observado quando uma alta concentração de sal, na presença de um polímero, captura uma grande quantidade de água presente, formando duas fases, devido a hidrofobicidade dos polímeros em relação a soluções salinas. Sistemas polímero/sal possuem vantagens em relação aos sistemas convencionais água/solvente para a separação de moléculas, pois cada fase possui mais de 80% de água, e com o uso de tampões adequados, pode-se simular o ambiente celular (PETKOVIC et al., 2010). Outras vantagens incluem o equilíbrio alcançado rápido, baixo custo, amigável ao meio ambiente e facilidade para escalonamento (MAGRI et al., 2020; ULBRICHT; JORDAN; LUXENHOFER, 2014).

Os sistemas aquosos bifásicos vêm sendo amplamente usados na separação e recuperação de biomoléculas, especialmente proteínas, como por exemplo, lipase, lacase, protease, colagenase, invertase, penicilina acilase, L-ASNase, dentre outras (AGUILAR et al., 2006; KARKAŞ; ÖNAL, 2012; LIMA et al., 2013; MAGRI et al., 2020; MAYOLO-DELOISA; TREJO-HERNÁNDEZ; RITO-PALOMARES, 2009; MOREIRA et al., 2013; SENPHAN; BENJAKUL, 2014; SOUZA et al., 2015). Além disso, devido ao alto teor de água em casa fase, SABs são amplamente utilizados para a recuperação de biofármacos como anticorpos monoclonais, DNA, células, fatores de crescimento, e hormônios, garantindo alta estabilidade das biomoléculas durante o processo de extração (PEREIRA ALCÂNTARA et al., 2013).

Os eventos físico-químicos envolvidos na formação e separação dos SABs são extremamente complexos. Simplificando, tais eventos são baseados na entalpia de hidratação e no saldo líquido de entropia. Apesar dos compostos principais de um SAB serem primariamente hidrofílicos, a entalpia da hidratação entre estes compostos é diferente. Como resultado, dois cenários termodinâmicos são possíveis. Se a quantidade de energia no sistema for alta o suficiente para superar a diferença entre a entalpia e a diferença de entalpia de hidratação, os dois compostos devem coexistir em uma única fase homogênea. Caso contrário, a separação dos dois compostos é energeticamente favorecida, promovendo a formação de duas fases. A caracterização inicial de um SAB é altamente importante para a determinação da curva binodal, que compõe as propriedades mais importantes que abrange a composição da fase e a proporção da massa entre as fases topo e fundo (AMRHEIN et al., 2014; RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2017).

No geral, a partição de proteínas é conduzida por ligações de Van der Waals, ligações hidrofóbicas e hidrofílicas, interações iônicas entre as biomoléculas, e a fase presente. Desta forma, a partição é influenciada pelas concentrações e peso molecular do polímero, tipo e concentração do sal, e pH (NAGARAJA; IYYASWAMI, 2015). A preferência de uma proteína para migrar para uma fase depende de uma série de fatores, os quais incluem peso molecular, área da superfície, carga eletroquímica, ponto isoelétrico, e o teor de resíduos hidrofóbicos (SEBASTIAO et al., 1997). Os parâmetros do SAB desempenham um papel importante durante a partição da molécula de interesse para uma fase específica. Para obter alto fator de purificação e rendimento, é necessário fazer uma seleção do tipo e peso molecular do polímero, tipo e concentração de sal, o comprimento da linha de amarração (*tie-line*), a proporção do volume das fases, temperatura, e o pH do sistema (RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2017)

A curva binodal (Figura 7) fornece a composição exata das fases topo e fundo. As composições representadas pelos (pontos abaixo da curva binodal são homogêneos. Duas fases são formadas apenas nos pontos acima da curva. Tradicionalmente, curvas binodais são construídas seguindo o método de ponto de névoa. Soluções estoque de polímero ou sal (ou polímero-polímero e álcool-sal) são adicionadas à outra por gotejamento até a detecção de uma solução enevoadada. Neste ponto crítico, o ponto de névoa, a turbidez da mistura é um indicativo para a formação de duas fases (DE ARAUJO SAMPAIO et al., 2016). Após isso, a composição da mistura pode ser calculada pela quantificação do peso de todos os componentes adicionados. Este procedimento deve ser realizado em condições de constante agitação e controle de temperatura.

O comprimento da *tie-line* (Figura 7), que representa a concentração final dos componentes das fases topo e fundo, é normalmente utilizada para expressar os efeitos da composição do sistema na partição do material.

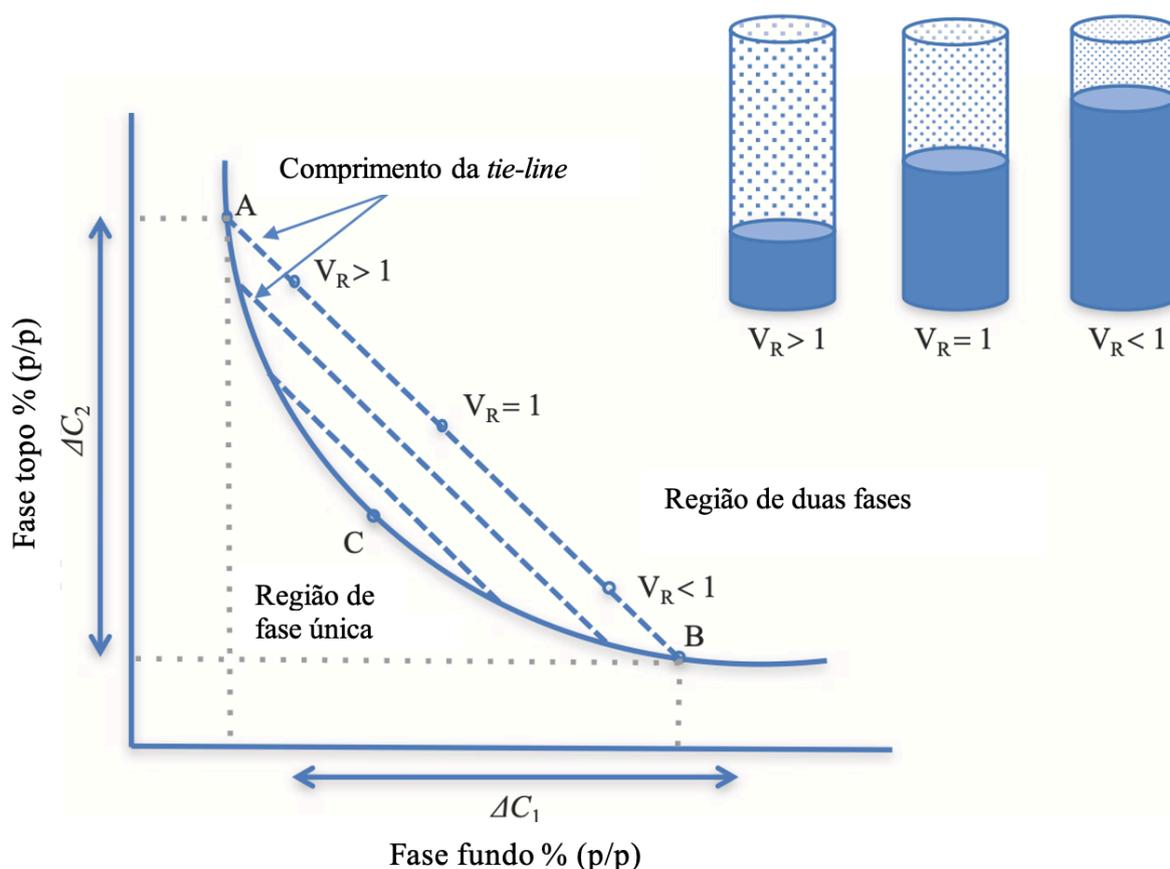


Figura 7. Curva binodal (ou diagrama de fase) de um sistema polímero-sal. Composto da fase do fundo está plotada na abscissa, e o composto da fase topo está plotado na ordenada.

A – B: Comprimento da *tie-line*; A: composição da fase topo; B: composição da fase fundo; C: ponto crítico (ponto de névoa); V_r : proporção dos volumes; ΔC_1 e ΔC_2 : diferença absoluta na concentração dos constituintes formadores das fases. Adaptado de RITO-PALOMARES; BENAVIDES (2017).

Os sistemas aquosos bifásicos são tradicionalmente classificados em dois grupos principais: sistemas polímero-polímero e polímero-sal. Atualmente, é possível classificar SABs em 5 grupos principais, incluindo álcool-sal, micelares, e líquidos iônicos (Figura 8).

Polímero-polímero	Polímero-sal	Álcool-sal	Micelar	Líquidos iônicos
<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas baseados em polímeros/eletrólitos, ou polímeros/solutos de baixo peso molecular • Fracionamento e recuperação de proteínas, ácidos nucleicos, células e organelas • Ambiente adequado para proteínas e biomoléculas sensíveis à força iônica • Alguns polímeros possuem alto custo 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas formados com a adição de soluções salinas à certos polímeros • Fracionamento e recuperação de proteínas, ácidos nucleicos, nanopartículas, e compostos de baixo peso molecular • Sistemas de baixo custo • Alta concentração de sal, alta força iônica 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas formados por álcoois alifáticos e soluções salinas aquosas • Fracionamento e recuperação de compostos de baixo peso molecular • Baixa viscosidade, baixos custos e fácil recuperação do solvente • Muitas proteínas não são compatíveis com a fase rica em álcool 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas formados por alguns surfactantes em condições específicas • Fracionamento de produtos sensíveis à força iônica • Os componentes do sistema podem ser reciclados • Pode promover um ambiente amigável ao meio ambiente para materiais biológicos 	<ul style="list-style-type: none"> • Sistemas compostos por IIs hidrolíticos e sais cosmotrópicos • Fracionamento de macromoléculas sensíveis à força iônica • IIs possuem propriedades benéficas comparados a solventes orgânicos, como por exemplo, não inflamabilidade e não volatilidade • Alguns IIs são altamente tóxicos

Figura 8. Classificação geral de sistemas aquosos bifásicos e suas principais características.

Adaptado de RITO-PALOMARES; BENAVIDES (2017)

Como demonstrado na Figura 8, os SABs são versáteis, os componentes de cada sistema são variáveis, e suas propriedades de partição auxiliam na separação de um amplo espectro de moléculas como proteínas, partículas de vírus, células, pigmentos, compostos bioativos de baixo peso molecular, metais e alcaloides (RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2017). Portanto, a seleção do tipo de sistema depende das características da molécula de interesse, sua fonte e sua aplicação.

O número de experimentos necessários para determinar as condições de uma extração por SAB pode ser reduzida utilizando os parâmetros do sistema como por exemplo, o tamanho da linha de amarração, a razão dos volumes das fases, o pH e a massa molar do polímero na partição da proteína (RITO-PALOMARES, 2004). A efetividade da partição pode ser avaliada através do coeficiente de partição, fator de purificação, seletividade, recuperação e pureza.

2.2.2.3.1 Polímeros

A definição mais simples de polímero é uma molécula de cadeia longa composta por unidades menores chamadas monômeros, repetidas e ligadas quimicamente. A estrutura dos polímeros pode variar de acordo com a forma como esses monômeros estão conectados. Em uma estrutura linear (unidimensional), os monômeros se organizam em cadeias simples. Em um arranjo bidimensional, as cadeias podem interagir entre si através de ligações químicas ou interações fracas, formando uma rede mais complexa. Já na estrutura tridimensional, as cadeias de polímeros se

entrelaçam, criando uma configuração ainda mais intrincada e robusta (BABOORAM, 2020).

Os principais polímeros utilizados em SABs para a separação de proteínas incluem PEG (variando seu peso molecular entre 300 – 8000), PPG (200 – 600 de peso molecular), dextran, UCON™, PVBA_m, poliacrilato de sódio (NaPa), dentre outros polímeros sintéticos (RITO-PALOMARES; BENAVIDES, 2017). Neste trabalho, os polímeros a serem testados são PEG 400, 1500, 2000 e 4000, e PPG 400 por serem biocompatíveis e não-tóxicos (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016; FRIED, 2014).

O PEG e o PPG são polímeros amplamente utilizados em diversas aplicações industriais e biomédicas devido às suas propriedades químicas e físicas versáteis. O PEG é sintetizado a partir da polimerização do óxido de etileno, enquanto o PPG é obtido pela polimerização do óxido de propileno. Ambos os polímeros possuem uma estrutura de cadeias repetitivas de éteres, o que lhes confere flexibilidade e resistência química. No entanto, diferem em sua solubilidade e comportamento hidrofílico: o PEG é altamente solúvel em água, o que o torna ideal para aplicações farmacêuticas, como transportador de medicamentos e em formulações cosméticas. O PPG, por sua vez, apresenta solubilidade reduzida em água, sendo mais utilizado em lubrificantes, espumas e adesivos. Outra diferença significativa entre os dois polímeros é a biocompatibilidade. O PEG é amplamente biocompatível e não tóxico, o que permite seu uso em sistemas de liberação controlada de fármacos, enquanto o PPG, embora útil em muitas aplicações industriais, tem menor aplicabilidade em sistemas biomédicos devido à sua maior hidrofobicidade (D'SOUZA; SHEGOKAR, 2016; FRIED, 2014).

2.2.2.4 Cromatografia de troca iônica

A separação de proteínas por sistemas aquosos bifásicos é considerada de baixa resolução, especialmente em proteínas nativas, portanto, não é raro a adição de pelo menos mais uma etapa cromatográfica após a separação por duas fases (LI; BEITLÉ, 2002; MAGRI et al., 2020).

A cromatografia de troca iônica (CTI) é uma técnica não desnaturante amplamente e historicamente utilizada para a caracterização de proteínas terapêuticas, anticorpos monoclonais, aminoácidos, ácidos nucleicos e outras moléculas, sendo o método cromatográfico mais utilizado na purificação e

caracterização de proteínas terapêuticas (FEKETE et al., 2015). Apesar de ser considerada o padrão ouro na análise de proteínas carregadas, parâmetros como tipo de coluna, fase móvel, pH e concentração do gradiente de sal precisam ser otimizados para cada proteína (REA et al., 2011).

A separação de proteínas pela CTI se baseia na diferença da carga das moléculas, a partir da interação das proteínas com a fase estacionária. A clássica CTI utiliza um gradiente de sal linear aplicado na eluição (FEKETE et al., 2015). A CTI apresenta alta seletividade, pois pequenas diferenças na carga das moléculas permitem tempos de retenção diferentes. Além disso, possui capacidade de purificar substâncias complexas, de compostos com cargas semelhantes; escalabilidade, alta capacidade de ligação, ser um método rápido e possui facilidade de modulação (alterar parâmetros de acordo com a proteína) (FEKETE et al., 2015; REA et al., 2011)

3 OBJETIVOS

Produzir e purificar a L-asparaginase produzida pelo fungo *Penicillium sizovae* a partir de sistemas aquosos bifásicos polímero-sal.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as etapas *downstream* e *upstream* da produção de L-ASNase a partir do fungo *Penicillium sizovae*;
- Particionar a L-asparaginase através de sistemas aquoso bifásicos polímero-sal;
- Purificar a L-asparaginase por cromatografia de troca iônica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo, foram realizados uma série de ensaios com a finalidade de avaliar o melhor meio de cultivo, o método de extração enzimática (ultrassom ou agitação com barra magnética), a concentração da extração sólido-líquido, e o solvente (tampão, misturas eutéticas com etanol, acetato de etila e água destilada, e solventes eutéticos), visando encontrar as condições para um maior rendimento da L-ASNase nativa obtida a partir de cultivo do fungo *P. sizovae* (L-ASNasePS). Ao final, uma condição foi escolhida para purificação por um sistema aquoso bifásico polímero/sal, seguido de cromatografia por troca iônica. O processo ocorreu conforme fluxograma representado na Figura 9.

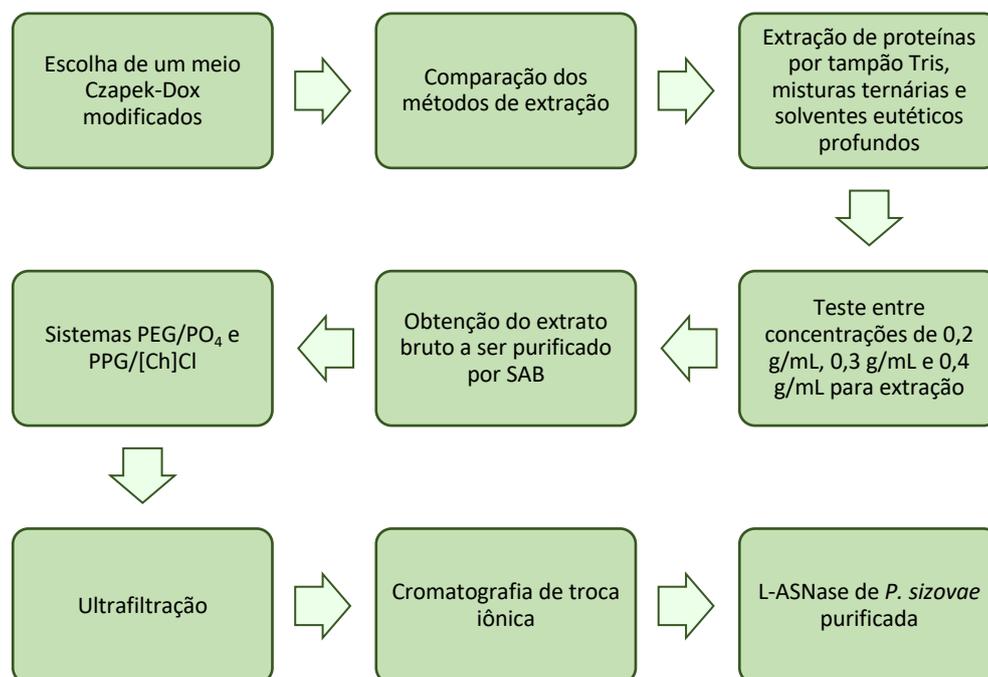


Figura 9. Fluxograma contendo as etapas para a obtenção da L-ASNase purificada por sistemas aquosos bifásicos polímero-sal do fungo *P. sizovae* a partir de um cultivo com um meio Czapek-Dox modificado.

4.1 MANUTENÇÃO DO MICROORGANISMO

O fungo *Penicillium sizovae* foi obtido a partir de amostras do solo do cerrado, coletadas em Água Fria de Goiás – GO (14°58'10.21"S, 48°1'19.43"W). O isolado obtido em batata dextrose ágar (BDA) foi depositado no SisBiota Brasil (Sistema

Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com o acesso de herança genética de número 010770/2013-5 e autorização do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) de acordo com a lei número 12.123/2015 (registro: AEFBB51). A cepa foi mantida no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, e foram doadas pelo professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. Os isolados foram armazenados a – 80 °C em meio Castellani (CASTELLANI, 1967).

A partir do estoque os fungos foram repicados em placas de BDA, a 28 °C durante 7 dias. O pré-inóculo foi repicado a partir dos cultivos em BDA, sendo este o meio indutor de crescimento (IC) contendo 2,4% de BDA e 1% de extrato de levedura, cultivado a 32 °C por 5 dias.

4.2 MEIOS DE CULTIVO

Neste trabalho, foram testados três diferentes meios Czapek-Dox modificados, a partir do meio descrito por BASKAR; RENGANATHAN (2012), e de meios descritos por FREITAS et al., (2021). 50 mL de meio em Erlenmeyers de 250 mL foram inoculados com 1 disco de 8 mm de pré-inóculo e cultivados a 32 °C durante 5 dias a 120 rpm.

- Meio de Cultura 1 (MC 1): L-Prolina 1,71%; NaNO₃ 1,99%; L-Asparagina 1,38%; Glicose 0,65%; Caldo Batata Dextrose 2,4%; Extrato de levedura 1% K₂HPO₄ 0,0152%; MgSO₄.7H₂O 0,052%; KCl 0,052%; elementos traço (C:N 4,65) (BASKAR; RENGANATHAN, 2012);
- Meio de Cultura 2 (MC 2): L-Prolina 3%, L-Asparagina 3%, Ureia 1%, Extrato de Malte 3%; Extrato de levedura 3%; MgSO₄.7H₂O 0,052%; KCl 0,052%; elementos traço (C:N 2,82) (FREITAS et al., 2021);
- Meio de Cultura 3 (MC 3): L-Prolina 5%; L-Asparagina 3%; NaNO₃ 3%; NH₄SO₄ 3%; Extrato de levedura 3%; Peptona 5%; MgSO₄.7H₂O 0,052%; KCl 0,052%; elementos traço (C:N 2,06) (FREITAS et al., 2021);

- Sendo que, a solução de elementos traço foi composta por ZnSO_4 0,001%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001% e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001%. Todos os meios tiveram o pH ajustado para 6,5 com KOH 5 M.¹

Ao término dos cultivos, as biomassas foram filtradas em filtro de papel com auxílio do funil Büchner em condições de baixa pressão. O meio de cultura foi descartado e as biomassas foram mantidas em freezer a -20°C até as extrações.

4.2.1 Peso seco

O peso seco foi calculado a partir da filtração de cultivos de 50 mL com papel filtro previamente pesados. A biomassa foi seca em estufa com circulação de ar a 70°C durante 48 h e pesada juntamente com os filtros. A massa final foi subtraída da massa do papel filtro e, assim, foi obtido o peso seco. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

As extrações foram realizadas conforme metodologia de MUSSAGY et al., (2022b), com adaptações. A biomassa descongelada foi pesada e adicionada de solvente (descritos a seguir) inicialmente na concentração de 0,2 g/mL (concentrações de 0,3 e 0,4 mg/mL foram testadas posteriormente). Em tubos de vidro, as biomassas foram então agitadas a 700 rpm em placa magnética, à temperatura ambiente. Foram realizadas quatro extrações seguidas para cada condição. Ao final, os extratos brutos foram centrifugados a 12 000 g, 10 minutos e 4°C . Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas e, de atividade enzimática de L-Asparaginase e eletroforese em gel de acrilamida.

4.3.3 Sistemas ternários

Para a extração celular foram utilizados sete sistemas ternários com diferentes proporções de acetato de etila (EtOAc), etanol (EtOH) e água destilada (H_2O). Os

¹ A razão C/N dos meios de cultivo foram quantificadas conforme bibliografia citada referente à cada meio.

sistemas foram: 1:0:2, 2:0:1, 1:1:1, 2:1:2, 3:0:1, 3:1 (EtOH:EtOAc:H₂O), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Relação das proporções dos solventes ternários utilizados para a obtenção de extratos enzimáticos a partir das células de *P. sizovae*.

Etanol (%)	Acetato de Etila (%)	Água destilada (%)
33	0	66
66	0	33
33	33	33
40	20	40
75	0	25
42,5	15	42,5
50	0	50

O Tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 foi testado como controle positivo, devido o pH ótimo da L-ASNase ser entre 6 – 10 (MUNEER et al., 2020). O tampão não foi usado nos sistemas ternários pois assim deixariam de serem ternários, devido a presença de Tris no tampão além da água.

4.3.4 Solventes eutéticos profundos

A síntese dos solventes foi realizada conforme descrito por MUSSAGY et al., (2022c). As diferentes molaridades do ácido láctico ou ácido butírico (Lac e But, respectivamente), ambos doadores de ligações de hidrogênio foram adicionados ao receptor de ligações de hidrogênio, cloreto de colina ([Ch]Cl), para formar um líquido transparente e homogêneo após 2 horas de agitação a 80 °C. Foram realizadas extrações, conforme descrito no tópico 2.3.3, com solventes eutéticos compostos de [Ch]Cl com Lac e But nas proporções 1:1 e 1:2 (80% p/v). Os extratos foram submetidos à quantificação de proteínas e, de atividade enzimática de L-ASNase.

4.3.5 Lise celular por sonicação

A lise celular por sonicação foi realizada os sistemas de extração que apresentaram melhores resultados. A biomassa foi suspensa nos sistemas de

extração na mesma concentração utilizada anteriormente (0,2 g/mL). A mistura foi sonicada em ultrassom (Sonics Vibra-Cell VCX-500, Sonics & Materials, inc, Newtown CT, Estados Unidos) com 8 ciclos, 45 segundos de pulso e 30 segundos de repouso e 40% de amplitude (COSTA-SILVA et al., 2018). Ao final, os extratos foram centrifugados 12 000 g, 10 minutos e 4 °C. O sobrenadante foi coletado e denominado extrato bruto.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A quantificação de proteína foi realizada conforme BCA Protein Assay Kit (Pierce®, Thermo-Fisher Scientific). Este ensaio se baseia na reação de Birueto, que consiste na redução de Cu^{2+} para Cu^{1+} , em condições básicas, e o reagente colorimétrico é o ácido bicinconínico. Duas moléculas do ácido reagem com um íon de cobre Cu^{2+} , e a coloração produzida pelo reagente é proporcional à concentração de proteína. A coloração púrpura é lida no espectrofotômetro a 562 nm (SMITH et al., 1985)

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços, sendo pipetados 25 μL de amostra, ou padrão, em triplicata, e 200 μL do reagente. A placa foi então incubada por 30 minutos a 37 °C e lida a 562 nm em leitora de microplaca. A quantidade de proteína foi estimada através de uma curva padrão feita com padrão de albumina em nove pontos (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), conforme Figura 10. Brancos contendo cada sistema ternário e solvente eutético profundo foram realizados.

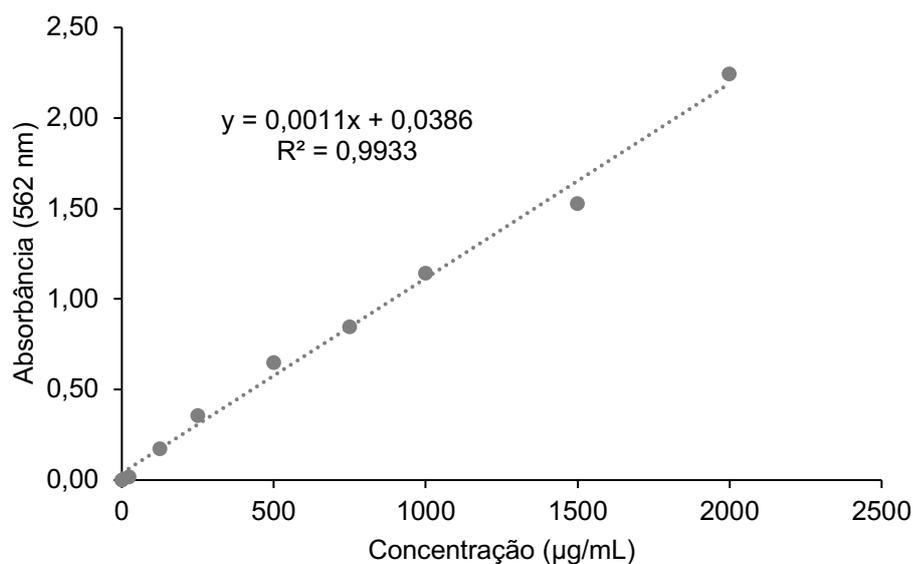


Figura 10. Curva padrão de albumina versus a absorvância a 562 nm.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE L-ASPARAGINASE

A quantificação da L-ASNase foi realizada através do método L-aspartil- β -hidroxamato (AHA). Esta metodologia se baseia na reação de formação do β -hidroxamato-aspártico quando o ácido aspártico fica em contato com a hidroxilamina, na presença de L-ASNase. Esta reação é parada com o ácido tricloroacético (TCA), ácido clorídrico (HCl) e cloreto férrico (FeCl_3). O FeCl_3 irá se complexar com o β -hidroxamato aspártico, sendo assim o reagente colorimétrico da reação (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). A reação, conforme demonstrada na Figura 11, é lida em espectrofotômetro a 500 nm.

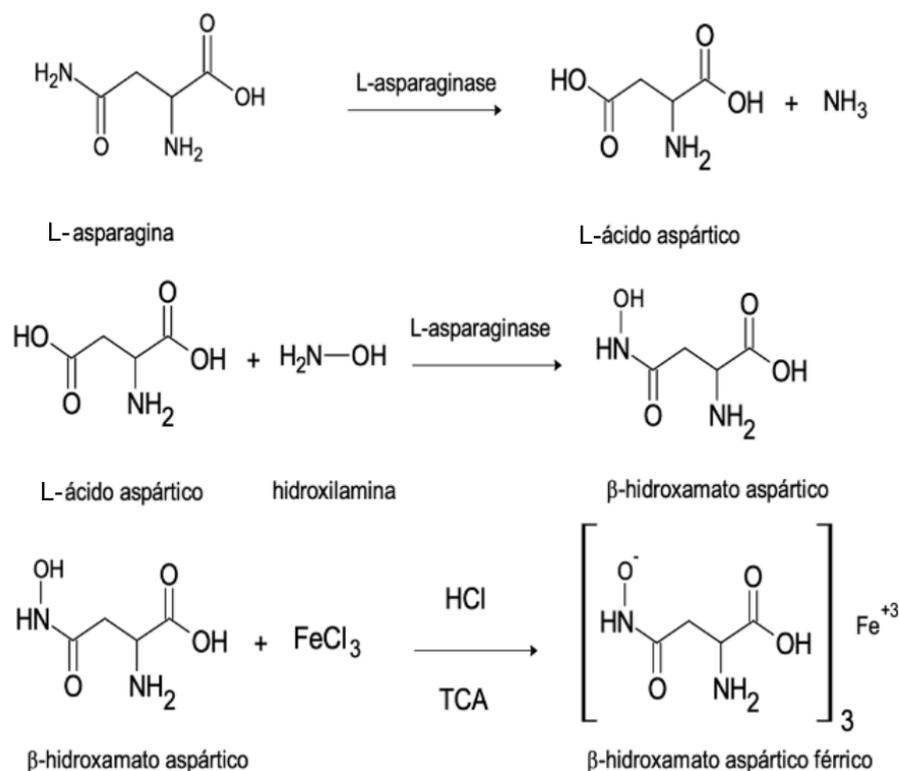


Figura 11. Reação da quantificação da atividade de L-ASNase pelo método de AHA.

Esta metodologia foi escolhida para a quantificação de L-ASNase pois a metodologia de Nessler, além de superestimar a atividade enzimática, pode também quantificar amônia presente no extrato bruto produzida pelo metabolismo microbiano (FREITAS et al., 2021; MAGRI et al., 2018).

Cada ensaio foi realizado em triplicata em tubos cônicos de 5 mL. Foram adicionados 200 µL de L-asparagina 0,1 mol/L, 200 µL de hidroxilamina 1 molar (neutralizada com NaOH), 1,4 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L e 100 µL de amostra (extrato bruto). Foram preparados brancos de cada amostra, compostos de 1,9 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol/L e 100 µL de amostra, além de brancos de cada solvente utilizado e sistema ternário. Todas as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos em banho-maria. Após os 30 minutos, foram adicionados 500 µL do reagente colorimétrico, composto por 5% de FeCl₃ (p/v) e 10 % de TCA (p/v) em 0,33 molar de HCl. As amostras foram centrifugadas a 10000 g durante 5 minutos, a 4 °C. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 500 nm. Também foram realizados ensaios enzimáticos quantificando a L-ASNase a partir de amostras de células fúngicas. Neste caso, foram utilizados 100 mg de células, substituindo 100 µL de extrato bruto.

Para a quantificação em μmol s de β -hidroxamato-aspártico, foi realizada uma curva de calibração construída com um padrão de β -hidroxamato (Sigma-Aldrich®) a 5,0 mmol/L. A curva foi construída conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Construção das soluções padrão utilizadas na curva de calibração.

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

Todos os padrões da curva foram feitos em triplicata. Após a adição da solução de FeCl₃/TCA/HCl, os padrões foram lidos em espectrofotômetro a 500 nm. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Figura 12.

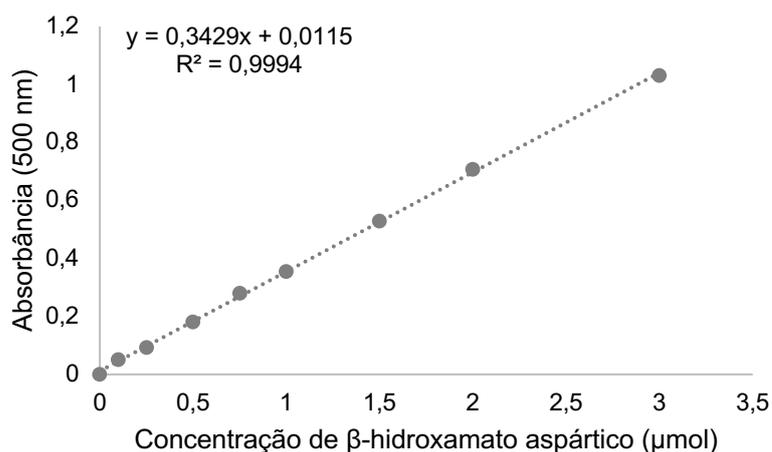


Figura 12. Curva padrão de concentração β -hidroxamato (μmol) versus absorvância a 500 nm.

O cálculo da atividade enzimática foi realizado conforme seguinte equação:

$$\frac{U}{\text{mL}} \text{ASNase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{volume da amostra}) \times (\text{tempo de reação})} \right] \quad (2)$$

Para o cálculo a atividade enzimática específica em U/mg_{proteína}, a o cálculo foi realizado conforme seguinte equação:

$$\frac{U}{\text{mg}_{\text{proteína}}} \text{ASNase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{teor de proteína} \times \text{volume da amostra}) \times (\text{tempo de reação})} \right] \quad (3)$$

Já para a atividade específica expressa em U/g_{cél.}, a equação foi a seguinte:

$$\frac{U}{\text{g}_{\text{cél.}}} \text{ASNase} = \left[\frac{(\mu\text{mol } \beta\text{-hidroxamato aspártico})}{(\text{concentração de células} \times \text{volume da amostra}) \times (\text{tempo de reação})} \right] \quad (4)$$

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA (SDS-PAGE)

As proteínas dos extratos foram precipitadas com a adição de 5 volumes de acetona gelada (- 20°C) (SIMPSON; BEYNON, 2010). As amostras foram então incubadas a - 20°C por 24 horas, centrifugadas a 10000 g, 15 minutos, 4°C.

As amostras foram suspensas em 20 µL de tampão Laemmli (LAEMMLI, 1970) (Tris-HCl 0,125 M; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,004%; 2-mercaptoetanol 10%) e aplicadas em gel desnaturante de acrilamida/bisacrilamida a 12% (LAEMMLI, 1970). O marcador de massa molecular utilizado foi de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, MI, EUA), contendo as proteínas fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovo albumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa). As corridas de eletroforese ocorreram a 150 V e 30 mA para o gel concentrador e 250 V e 50 mA para o gel separador.

Os géis foram corados com coloração de nitrato prata e Azul de Coomassie. A coloração de prata foi realizada conforme descrito por Blum, Beier e Gross (BLUM; BEIER; GROSS, 1987) com PlusOne Silver Staining Kit™ (GE Healthcare, IL, EUA). A coloração com Azul de Coomassie foi realizada conforme descrito por Borejdo e Flynn (BOREJDO; FLYNN, 1984), utilizando PhastGel™ Blue R (GE Healthcare, IL, EUA).

4.7 SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Cada sistema foi preparado a partir de uma mistura ternária polímero + sal + água, de acordo com a Tabela 6. Foram escolhidos sistemas PEG + tampão fosfato e PPG + [Ch]Cl, com a composição de 15% de polímero, 20% de sal e 65% de água para os sistemas com PEG, e 30% de polímero, 16% de sal e 54% de água para o sistema com PPG (GLYK; SCHEPER; BEUTEL, 2014; MAGRI et al., 2020; NEVES et al., 2016). O tampão fosfato foi preparado no pH 7,4 ($K_2HPO_4:KH_2PO_4$ 3:1).

Tabela 6. Composição dos sistemas aquosos bifásicos polímero-sal.

Sistema	Composição (%)		
	Polímero	Sal	Água
PEG + Tampão fosfato			
PEG-400	15	20	65
PEG-1500	15	20	65
PEG-2000	15	20	65
PEG-2000	15	20	65
PPG + [Ch]Cl			
PPG-400	30	16	54

O polímero, o sal e o extrato de L-ASNase (a 1,5 mg/mL de proteína) foram adicionados a vidros graduados de 15 mL, para se obter uma massa total de 10 g, fixando a concentração de proteína em cada sistema em 0,25 mg/mL. A seguir, os sistemas foram agitados vigorosamente com o auxílio de um agitador de tubos vórtex, seguido de um equilíbrio de 1 h a 25 °C em banho maria. Os sistemas foram centrifugados a 2000 g por 30 minutos a 25 °C para a completa separação das fases. As fases (topo e fundo) foram separadas cuidadosamente com o auxílio de pipeta Pasteur. Brancos também foram preparados, compostos pelos sistemas com a adição de água destilada ao invés do extrato bruto enzimático (MAGRI et al., 2020).

A partição foi avaliada a partir do coeficiente de partição da atividade enzimática da L-ASNase e concentração de proteínas (K_a e K_b , respectivamente), a eficiência de extração da L-ASNase [EE (%)], o fator de purificação (FP), e o balanço de massa [MB(%)], determinados conforme equações descritas abaixo:

$$K_a = \frac{[L\text{-ASNase}]_{\text{fase topo}}}{[L\text{-ASNase}]_{\text{fase fundo}}} \quad (5)$$

$$K_b = \frac{[CP]_{\text{fase topo}}}{[CP]_{\text{fase fundo}}} \quad (6)$$

$$EE (\%) = \frac{[L\text{-ASNase}]_{\text{fase rica}} \times V_{\text{fase rica}}}{([L\text{-ASNase}]_{\text{fase rica}} \times V_{\text{fase rica}}) + ([L\text{-ASNase}]_{\text{fase pobre}} \times V_{\text{fase pobre}})} \times 100 \quad (7)$$

$$FP = \frac{AE_{\text{fase rica}}}{AE_{\text{inicial}}} \quad (8)$$

$$BM (\%) = \frac{([CP]_{\text{fase topo}} \times V_{\text{fase topo}}) + ([CP]_{\text{fase fundo}} \times V_{\text{fase fundo}})}{(V_{\text{fase topo}} + V_{\text{fase fundo}}) \times ([CP]_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (9)$$

$$AR = \frac{AE_{\text{fase rica}}}{AE_{\text{inicial}}} \times 100 \quad (10)$$

No qual AE corresponde à atividade específica (U/mg_{proteína}), [CP] à concentração de proteína (µg/mL), BM a balanço de massa (%), AR à atividade relativa (%). A fase rica corresponde à fase rica em L-ASNase e, conseqüentemente, a fase pobre à fase pobre em L-ASNase.

4.7.1 Ensaios físico-químicos

As fases topo e fundo de todos os sistemas foram submetidas a ensaios físico-químicos para sua caracterização. Foram calculadas e aferidos densidade, umidade (Analisador de Umidade por Infravermelho IV2000, Gehaka, SP, Brasil), e pH (pHmetro EDGE HI2002-02, Hanna Instruments Woonsocket, RI EUA).

4.8 ULTRAFILTRAÇÃO

Para a remoção do polímero e sal e concentrar a proteína, as fases ricas em L-ASNase foram coletadas e ultrafiltradas com membrana de 30 kDa de *cut-off*, por sistema de ultrafiltração tangencial (Amicon™ 8200, MilliporeSigma™) antes da cromatografia de troca iônica.

4.9 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Foi utilizada uma coluna HiTrap DEAE FF 5 mL (Sigma-Aldrich®) em sistema cromatográfico ÄKTA pure™ (Cytiva™, Danaher Corporation, DC, USA). A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 numa taxa de 0,5 mL/min. Para a aplicação das amostras concentradas e sem polímero (previamente filtradas a 0,45 µm), foi injetado 2 mL de amostra e a lavagem de coluna foi realizada com 5 volumes de coluna. Em seguida, a eluição ocorreu com variações de NaCl de 0 a 0,5 M e frações de 2 mL foram coletadas, e em seguida foi feito SDS-PAGE segundo Laemmli (LAEMMLI, 1970) (Sessão 4.6). As frações com presença de bandas sugestivas de L-ASNase foram liofilizadas e reconstruídas com água ultrapura. Após, a atividade enzimática e a concentração de proteína foram medidas e o rendimento e o fator de purificação foram calculados.

Os cálculos de atividade relativa e fator de purificação foram realizados de acordo com eqs. 8 e 10, respectivamente, e o rendimento (η) foi calculado conforme equação a seguir:

$$\eta = \frac{(V_{\text{final}} \times [\text{L-ASNase}]_{\text{final}})}{(V_{\text{inicial}} \times [\text{L-ASNase}]_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (11)$$

Sendo que, V_{final} representa o volume (mL) da fase em que a L-ASNase foi extraída na maior proporção; $[\text{L-ASNase}]_{\text{final}}$ corresponde à atividade enzimática (U/mL) onde houve a maior proporção de extração; V_{inicial} é o volume (mL) do extrato bruto inicial; e $[\text{L-ASNase}]_{\text{inicial}}$ é a atividade enzimática (U/mL) do extrato bruto.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios realizados em triplicata tiveram suas médias submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Willk, e as médias apresentaram distribuição normal. Para a comparação de duas médias foi realizado o teste-t, e para a comparação de três médias ou mais foi realizada análise de variância (ANOVA). Em caso de $p < 0,05$, os dados foram submetidos a pós-teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com software RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MEIOS DE CULTIVO

Os três meios de cultura apresentaram diferentes resultados de peso seco (Figura 13). Isso se deve às diferenças da relação C/N entre os meios. Nos meios com maior presença de carbono (Meio 1 e Meio 2), com relações de 4,65 e 2,82, respectivamente, é possível observar um maior peso seco, devido à maior quantidade de carbono disponível para o crescimento fúngico. O mesmo comportamento foi observado em cultivos de *P. sclerotigenum* em meio Czapek-Dox contendo dextrose e meio de Aveia, dois meios que possuem alta relação C/N (CUTRIM et al., 2006). MONTARROYOS et al. (2007) também identificaram que a presença das fontes de carbono maltose, sacarose e dextrose favoreceram o crescimento micelial do fungo *Mycosphaerella musicola*.

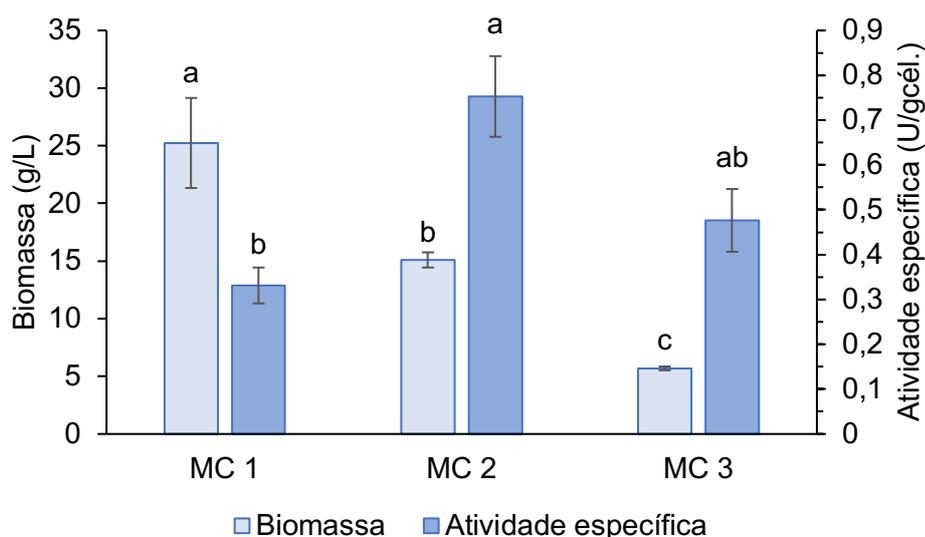


Figura 13. Biomassa (g/L) e atividade específica de L-ASNase (U/g_{cél.}) dos cultivos dos 3 diferentes meios de cultivo de *P. sizovae* durante 5 dias a 32 °C e 120 rpm. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

Outro fator intrinsecamente ligado à relação de carbono e nitrogênio do meio de cultura, diz respeito à produção enzimática do microrganismo. Apesar do MC 1 apresentar maior crescimento que o MC 2, o último apresentou maior atividade específica de L-ASNase. A biomassa de cultivos em MC 2 apresentou, em média, maior atividade de L-ASNase (0,75 U/g_{cél.}) do que do MC 1 (0,33 U/g_{cél.}) (Figura 13).

Apesar da biomassa obtida após o cultivo com o MC 3 apresentar atividade de L-ASNase maior que do MC1 (0,47 U/mL), este meio apresentou um crescimento celular insuficiente para prosseguir com os próximos ensaios (5,7 g/L). O baixo crescimento fúngico neste meio pode ser explicado pela sua baixa relação C/N, havendo uma disponibilidade reduzida de carbono necessário para o metabolismo celular fúngico. Além disso, as fontes de nitrogênio também podem interferir na atividade enzimática de fungos filamentosos. Os 3 meios possuem L-prolina e L-asparagina em comum como fontes de nitrogênio, porém em concentrações diferentes. Além disso, outras fontes de nitrogênio estão presentes em cada meio, CM 1 possui NaNO_3 a 1,99%, CM 2 possui ureia a 1% e CM 3 possui NaNO_3 e NH_4SO_4 , ambos a 3%. LIMA et al. (2013) avaliaram diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipases por *Penicillium aurantiogriseum*. Foi observado que fontes inorgânicas de nitrogênio e relações C/N mais baixas (2,5) promoveram uma maior atividade específica de lipases, do que cultivos com meios de maior C/N. No presente trabalho, CM 1 tem a maior razão C/N, a menor concentração de nitrogênio inorgânico e menor atividade específica (Figura 13).

5.2 EXTRAÇÃO POR SISTEMAS TERNÁRIOS ETANOL:ACETATO DE ETILA:ÁGUA DESTILADA

Foram testados 11 sistemas ternários, sendo que 7 consistem em misturas de solventes e 4 em solventes eutéticos profundos. Foi realizada quatro ciclos de extração para extratos dos dois meios selecionados. A mesma biomassa foi extraída 4 vezes, tendo seu extrato de cada extração quantificada em relação à sua concentração de proteína. Através destes resultados, podemos observar que o controle positivo Tris-HCl 50 mM pH 8,6 foi capaz de extrair a maior quantidade de proteínas nas células fúngicas obtidas pelos dois meios de cultivo (Figura 14).

Foi observado também que a concentração de proteína nos extratos com tampão do MC 2 foi superior à do MC 1 (1040 $\mu\text{g/mL}$ e 1520 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Isso pode se explicar devido à maior presença de L-ASNase nos extratos do meio 2, como foi observado na quantificação de L-ASNase das biomassas dos cultivos (Figura 14). Além disso, os extratos com tampão na quarta extração ainda tinham concentrações de proteína mais altas que de outros solventes, portanto o tampão Tris foi capaz de extrair a maior quantidade de proteínas.

A partir destes resultados, MC 2 foi considerado o mais vantajoso para a produção de L-ASNasePS, portanto ele foi o meio escolhido para os próximos ensaios.

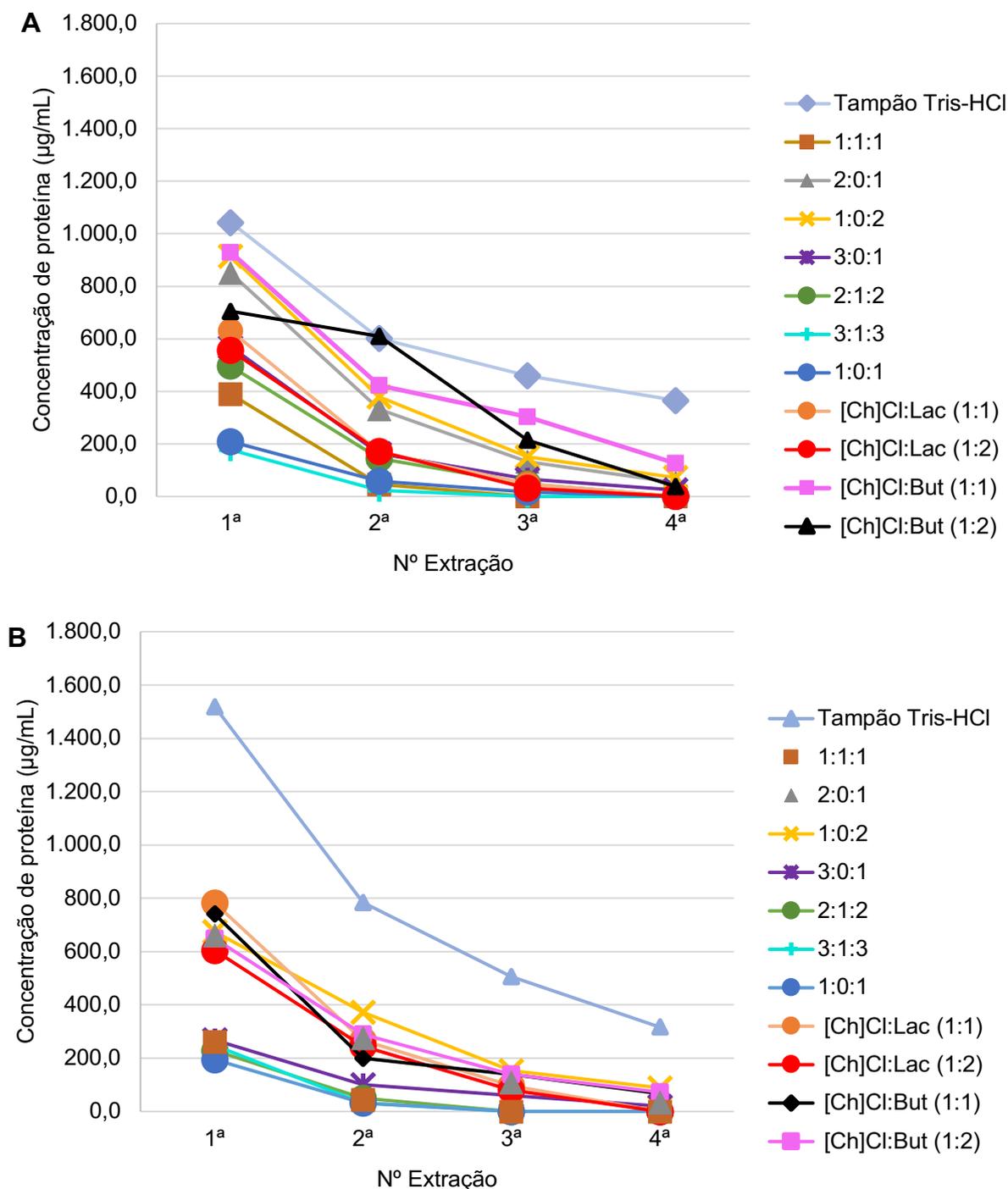


Figura 14. Extração de proteína (µg/mL) em ciclos nos diferentes sistemas ternários Etanol:Acetato de etila:Água e solventes eutéticos profundos do meio de cultura 1 (A) e do meio de cultura 2 (B).

Tampão Tris-HCl: Tris-HCl 50 mM pH 8.6; Misturas ternárias: EtOH:EtOAc:H₂O; [Ch]Cl:Lac (1:1): [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:1; [Ch]Cl:Lac (1:2): [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:2; [Ch]Cl:But (1:1): [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:1; [Ch]Cl:But (1:2): [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:2.

Foram testadas as atividades enzimáticas de L-ASNase dos extratos da primeira extração dos seguintes sistemas: tampão, etanol 33%, etanol 50%, etanol 66%, etanol 75%, Lac 1:1, Lac 1:2, But 1:1, e But 1:2 (Figura 15). Os extratos contendo acetato de etila foram excluídos deste ensaio devido sua interação com a hidroxilamina presente no ensaio de L-ASNase (SCHULZ; WAKIL, 1970).

Assim como observado na concentração de proteína dos extratos, a maior atividade específica de L-ASNasePS foi observada em extratos de tampão tris (Figura 15). Foi possível observar que a atividade específica foi crescente de acordo com a porcentagem de etanol presente no sistema. Também foi observado uma maior atividade específica em [Ch]Cl:Ácido butírico 1:2 em relação ao solvente com menor quantidade de ácido butírico.

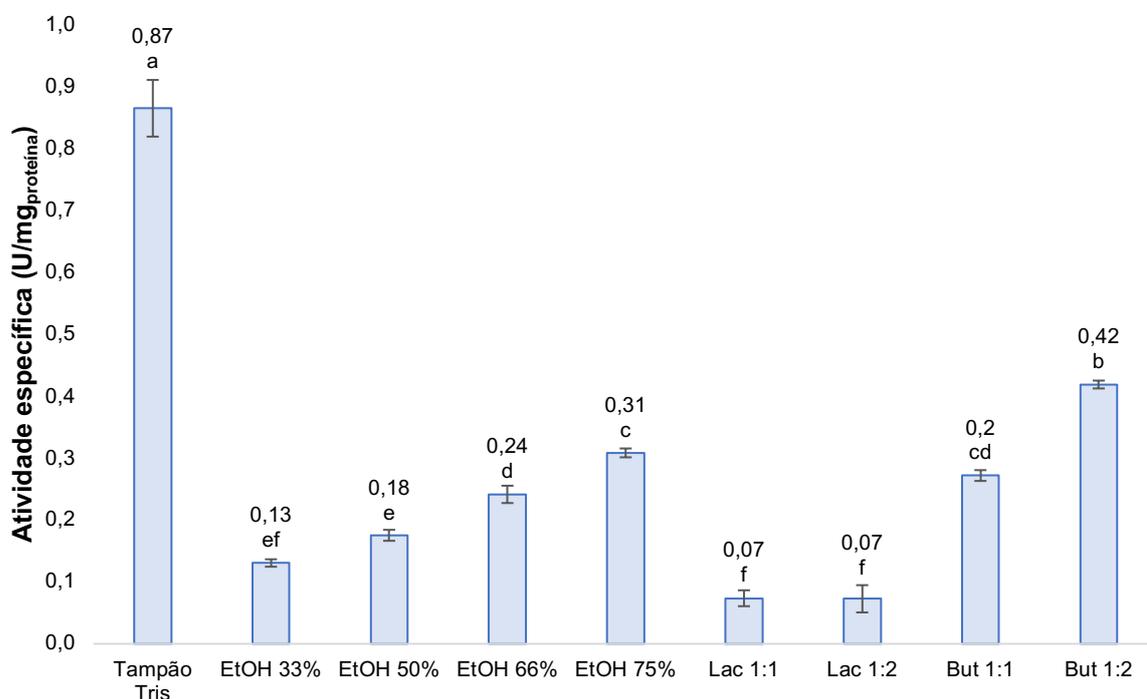


Figura 15. Atividade enzimática específica de L-asparaginase (U/mg_{proteína}) em extratos (0,2 g_{cel}/mL) obtidos a partir de sistemas ternários Etanol/Acetato de Etila/Água e solventes eutéticos profundos.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Tampão Tris: Tris-HCl 50 mM pH 8.6; EtOH 33%: etanol 33%; EtOH 50%: etanol 50%; EtOH 66%: etanol 66%; EtOH 75%: etanol 75%; Lac 1:1: [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:1; Lac 1:2: [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:2; But 1:1: [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:1; But 1:2: [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:2.

Através da análise do SDS-PAGE, é possível verificar a presença de bandas sugestivas à L-ASNasePS, próximas de 45 kDa, em todos os extratos, exceto no sistema 1:0:1 (Etanol 50%) (Figura 16A). Os sistemas com acetato de etila (1:1:1, 2:1:3 e 3:1:3) também apresentaram bandas sugestivas à L-ASNase, com destaque ao sistema 1:1:1 (etanol 33%, acetato de etila 33% e água 33%). Os extratos de etanol 66% (1:0:2), etanol 33% (2:0:1) e etanol 75% (3:0:1) apresentaram poucas bandas, comparando-se aos outros extratos, e bandas próximas a 45 kDa, o que corrobora com os resultados da Figura 15 de atividade específica.

Já a análise do gel de extratos de solventes eutéticos profundos (Figura 16B) demonstrou que quanto maior a presença dos ácidos orgânicos (ácido láctico e butírico), maior a quantidade de proteínas extraídas. Além disso, nestes extratos é capaz de se distinguir poucas bandas, sendo uma delas próxima ao marcador molecular de 45 kDa, sugerindo maior atividade específica de L-ASNasePS.

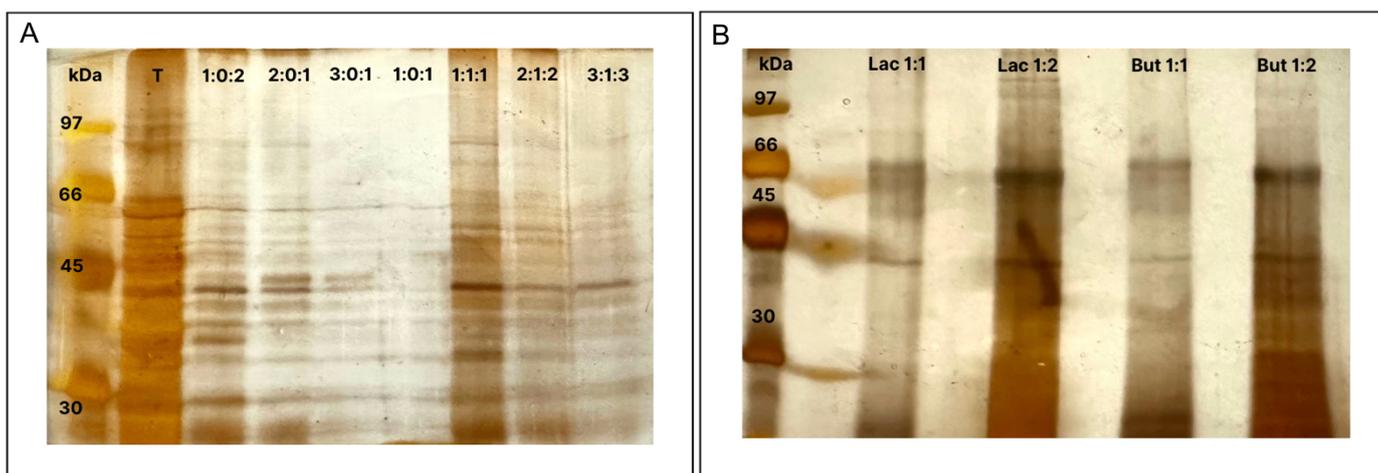


Figura 16. Gel desnaturante de poliacrilamida (12%) dos extratos (0,2 g/mL) obtidos a partir dos sistemas ternários Etanol/Acetato de etila/Água e solventes eutéticos profundos.

Tampão Tris-HCl: Tris-HCl 50 mM pH 8.6; Misturas ternárias: EtOH:EtOAc:H₂O; [Ch]Cl:Lac (1:1): [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:1; [Ch]Cl:Lac (1:2): [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:2; [Ch]Cl:But (1:1): [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:1; [Ch]Cl:But (1:2): [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:2.

Apesar de um ceticismo inicial por parte da comunidade científica no uso de solventes orgânicos em proteínas, nos últimos 30 anos vem sendo um tópico de pesquisa em biotecnologia em desenvolvimento. Sabe-se que a atividade catalítica de enzimas é menor em solventes orgânicos do que em água, porém enzimas em solventes orgânicos podem apresentar diferentes propriedades como maior seletividade e maior termo estabilidade (KLIBANOV, 1997; YANG; RUSSELL, 1996). Além disso, industrialmente o uso de solventes orgânicos na solubilização de proteínas pode ser útil devido a facilidade de se obter o produto final e rendimento, além de reduzir o risco de contaminação microbiana em reatores (YANG; RUSSELL, 1996). Neste cenário, a maior atividade específica nos extratos com tampão Tris-HCl já era esperada, devido o controle de pH e estabilidade enzimática (SCOPE, 1994).

Uma das principais questões acerca do uso de solventes orgânicos em enzimas é se a proteína vai manter sua conformação nativa, pois estes solventes podem ser desnaturantes. Porém, nem sempre isso é reportado (YANG; RUSSELL, 1996). Uma hipótese é de que quando propriamente solubilizada em um solvente orgânico, a enzima fica cineticamente (mas não termodinamicamente) “presa” na sua conformação nativa (ZAKS; KLIBANOV, 1988). Outra possível vantagem do uso de solventes durante a extração das células é o rompimento celular ser facilitado devido à degradação de moléculas da membrana das células (YANG; RUSSELL, 1996). A água é necessária para a manutenção da atividade catalítica enzimática, o que pode explicar a presença de atividade em todos os sistemas EtOH:EtOAc:H₂O testados neste trabalho, pois todos apresentam água.

Outros possíveis desafios encontrados incluem desestabilização das estruturas secundária e terciária causada pelo etanol, pH, mobilidade, bloqueio do sítio ativo, dentre outros (KLIBANOV, 1997). Já existem estratégias para contornar todos esses problemas, incluindo a otimização da adição de água, liofilização da enzima na presença de crioprotetores, uso de detergentes em conjunto com os solventes orgânicos e tampões de fase orgânica (MATTOS; RINGE, 2001; TAHA; COUTINHO, 2016).

Os solventes eutéticos profundos (SEPs) já são conhecidos por serem solventes amigáveis ao meio ambiente, baixa volatilidade, baixa toxicidade, não inflamabilidade e baixa pressão de vapor. Portanto, os SEPs são promissores para substituir os

agentes tradicionais de extração e já vem sendo usados na extração e separação de vários compostos como lignina, pesticidas, flavonoides, proteínas de animais e de plantas, enzimas microbianas e aminoácidos (ZHOU et al., 2022). Além disso, já demonstraram aumentar a atividade biocatalítica de proteínas e serem usados com sucesso na separação de biomoléculas (AZIZI; BATEBI, 2012; MARCHEL; COROADINHA; MARRUCHO, 2020; XU et al., 2019). Entretanto, a baixa atividade de L-ASNase dos extratos em SEPs comparados aos de tampão Tris-HCl (Figura 15) pode ser explicada pelo baixo pH, por serem formados por ácidos orgânicos. O uso de tampões de fase orgânica podem ser uma solução para contornar este problema (TAHA; COUTINHO, 2016).

A partir destes resultados, verifica-se que ainda assim os extratos com tampão Tris-HCl apresentaram uma maior atividade específica considerável. Entretanto, devido as vantagens associadas à extração de proteínas com solventes orgânicos e SEPs, a investigação a respeito das condições ótimas pode ser interessante, pois através do gel de SDS-PAGE foi possível verificar a presença de L-ASNase em todos os extratos (Figura 16).

5.3 EXTRAÇÃO

A etapa de extração e rompimento celular é crítica para um maior rendimento enzimático (GOMES; ZANETTE; SPIER, 2020; SOUZA et al., 2017). Para comparar os métodos de extração, foram selecionados os solventes de extração: tampão Tris, EtOH 66%, EtOH 33%, [Ch]Cl:Lac 1:1, [Ch]Cl:Lac 1:2, [Ch]Cl:But 1:1 e [Ch]Cl:But 1:2. O método mais comumente utilizado para biomassas de até 20 g é a sonicação, entretanto, este método pode causar perdas na atividade enzimática devido ao aumento de temperatura, além de um maior gasto energético e maiores custos (DOPP; REUEL, 2018; WANG; YUAN; HALE, 2016).

Outros métodos utilizados são prensa francesa, homogeneizador de alta pressão e pérolas de vidro. Assim como a sonicação, estes métodos são físicos e severos, e sendo otimizados podem atingir altos rendimentos (YAO et al., 2018; ZHANG et al., 2019). Entretanto, estes métodos possuem algumas desvantagens como falta de seletividade através da liberação simultânea de outros componentes do citoplasma. Isto pode acarretar um maior número de etapas *downstream*, formar pequenos detritos

celulares. Estes métodos envolvem operações de alto consumo energético e são adequados apenas para processos de batelada (MUSSAGY et al., 2020).

Neste cenário, é importante considerar os custos, especificidade, rendimento e impacto ambiental do método de rompimento celular a ser utilizado. MUSSAGY et al., (2020, 2022b, 2022a) utilizaram a agitação com barra magnética para a extração de biomoléculas de levedura com sucesso. Nesta metodologia não há aumento de temperatura, possui baixos custos operacionais, facilidade de escalonamento e um maior rendimento que nas extrações das células com ultrassom.

O mesmo comportamento foi observado neste trabalho, com a concentração de proteínas. A partir da Figura 17, observa-se que em todos os solventes testados a concentração de proteína foi maior no método por agitação, exceto [Ch]Cl:Lac 1:1, que não apresentou diferença estatística. A extração com tampão por agitação se destacou, com 1520,0 $\mu\text{g/mL}$ contra 676,0 $\mu\text{g/mL}$ por ultrassom. Também foi observado que os SEPs de ácido butírico apresentaram menores concentrações de proteína do que os de ácido láctico, corroborando com a maior atividade específica dos SEPs de ácido butírico (Figura 15).

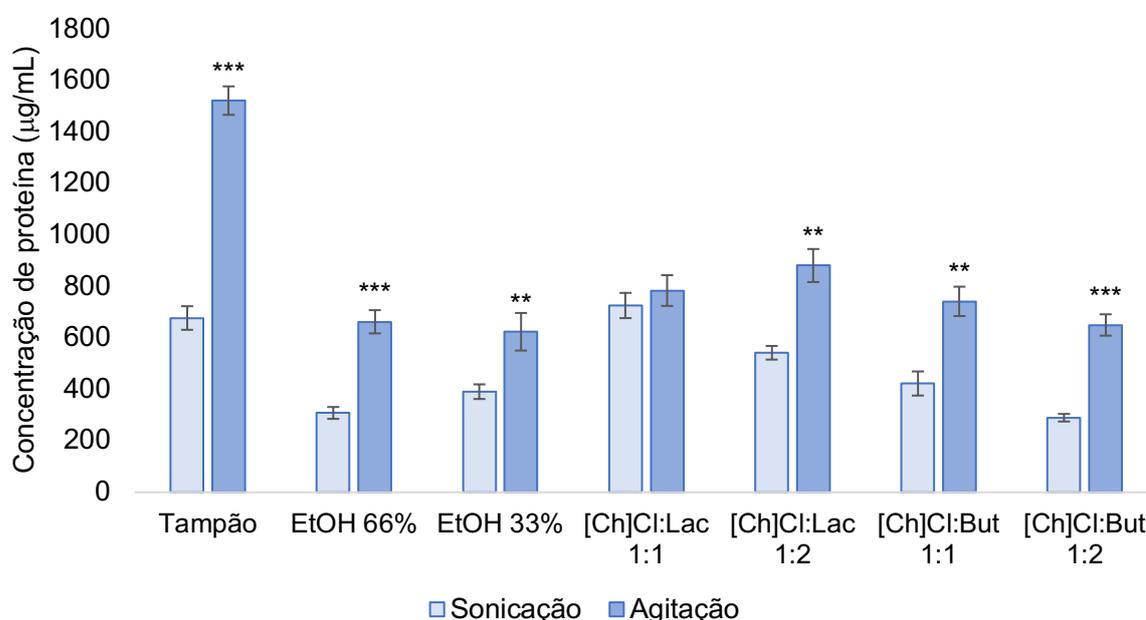


Figura 17. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos métodos de rompimento celular em extratos (0,2 g/mL) obtidos a partir da extração de Tampão Tris, EtOH 66%, EtOH 33%, [Ch]Cl:Lac 1:1, [Ch]Cl:Lac 1:2, [Ch]Cl:But 1:1 e [Ch]Cl:But 1:2.

Extratos obtidos a partir de sonicação e agitação diferem entre si pelo teste-t (níveis de significância: *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$. Tampão: Tris-HCl 50 mM pH 8.6; EtOH 66%: etanol 66%; EtOH 33%: etanol 33%; [Ch]Cl:Lac 1:1: [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:1; [Ch]Cl:Lac 1:2: [Ch]Cl:Ácido Láctico 1:2; [Ch]Cl:But 1:1: [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:1; [Ch]Cl: But 1:2: [Ch]Cl:Ácido Butírico 1:2.

O comportamento das extrações das células fúngicas ser no geral mais eficientes pelo método de agitação é explicado provavelmente pelo aquecimento da amostra, e a L-ASNase é uma enzima termosensível, sendo que o controle de temperatura é fundamental durante o rompimento celular (LI et al., 2018). Com base nestes resultados, o método de extração utilizado foi o de agitação com barra magnética e o solvente foi o tampão Tris nos próximos ensaios.

5.3.1 Concentração dos extratos

Outro parâmetro da extração avaliado neste trabalho foi a concentração de células úmidas na extração, com tampão Tris. As concentrações testadas foram de 0,2 g/mL, 0,3 g/mL e 0,4 g/mL e a atividade específica de L-ASNase de cada extrato foi quantificada. Com base na Figura 18, é possível verificar que os extratos a 0,4 g/mL apresentaram mais que o dobro de atividade específica que as outras extrações, sendo 2,4 U/mg_{proteína} em extratos a 0,4 g/mL. Os maiores resultados de atividade específica da L-ASNase, extraída por maceração, de *P. sizovae* por FREITAS et al. (2021) foi de 0,87 U/mg_{proteína}, 0,81 U/mg_{proteína} e 1,03 U/mg_{proteína}, após planejamento experimental Placket-Burman. Vale ressaltar que o resultado de 1,03 U/mg_{proteína} foi obtido a partir de células cultivadas com as mesmas condições deste trabalho, com 1 disco micelial de inóculo, a 32 °C, durante 5 dias com o meio Czapek-Dox modificado usado no presente trabalho, o MC 2. O método de rompimento celular foi a única diferença, sendo a maceração na concentração de 0,5 g/mL de células em tampão Tris. No presente trabalho obteve-se mais que o dobro de atividade específica com o uso de 0,4 g/mL de células. Estes resultados demonstram vantagens da extração de células em relação também à maceração, com maior atividade específica e menor concentração de células.

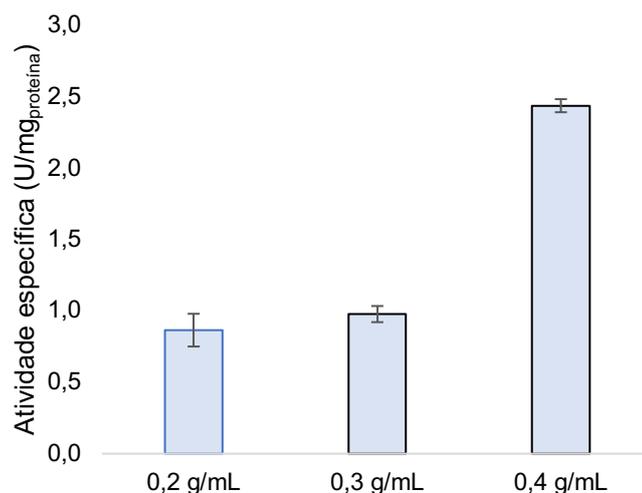


Figura 18. Atividade específica em U/mg_{proteína} de extratos obtidos com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,6 nas concentrações de 0,2 g/mL, 0,3 g/mL e 0,4 g/mL.

Em resumo, a partir dos resultados obtidos em 4.2 e 4.3, o processo *downstream* da obtenção de L-ASNase de *P. sizovae* foi definida como: MC 2 (C/N 2,82), 5 dias de cultivo a 32 °C, extração por agitação com barra magnética com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 na concentração de 0,4 g/mL de células úmidas.

5.4 SEPARAÇÃO POR SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS POLÍMERO-SAL

No *downstream* foram utilizados sistemas aquosos bifásicos (SABs) polímero-sal para a partição dos extratos de *P. sizovae*. Para uma melhor compreensão acerca dos padrões de migração e mecanismo de partição da L-ASNasePS nestes SABs, propriedades físico-químicas e a eficiência de extração foram determinadas. Além disso, foram utilizados PEG de diferentes pesos moleculares (400, 1500, 2000 e 4000) com tampão fosfato (pH 7,4) para averiguar como o peso molecular do PEG afeta a separação da L-ASNasePS. Além disso, o sistema PPG-400/[Ch]Cl também foi testado. Já foi reportado que o [Ch]Cl é capaz de manter a estabilidade de proteínas e aumentar sua atividade catalítica, portanto este sal foi utilizado para comparar os resultados com o tampão fosfato, que é amplamente usado em SABs, e conhecido como um ambiente favorável a proteínas (MAGRI et al., 2019; TAHA; COUTINHO, 2016). MAGRI et al. (2019) demonstraram que líquidos iônicos de [Ch] são aditivos biocatalíticos que aumentam a atividade da L-ASNase de *E. coli* em água. A estrutura

não foi afetada com a adição de [Ch]Cl e a atividade relativa da L-ASNase aumento 250%.

Todos os SABs do presente trabalho foram avaliados em termos de parâmetros de partição, eficiência de extração (EE%), K_a e K_b , atividade enzimática relativa (%), pH densidade (g/cm^3) e umidade (%) (Tabela 7).

Pela análise da EE% dos sistemas (Figura 19) é possível confirmar que todos os SABs de PEG-fosfato foram capazes de atingir 100% da separação da L-ASNase em uma fase, a fase rica em PEG, indicando a preferência da L-ASNasePS nas fases ricas em polímero nestes sistemas. Este mesmo comportamento foi observado em SABs polímero/sal utilizados na purificação de outras proteínas, como L-ASNase de *E. coli*, proteínas do ovo, proteínas de algas, dentre outras, com EE% de pelo menos 70% para a fase rica em PEG (BELCHIOR; FREIRE, 2021; MAGRI et al., 2020; RAJAKUMAR; MUTHUKUMAR, 2018; SAHA; SARKAR; SEN, 2022).

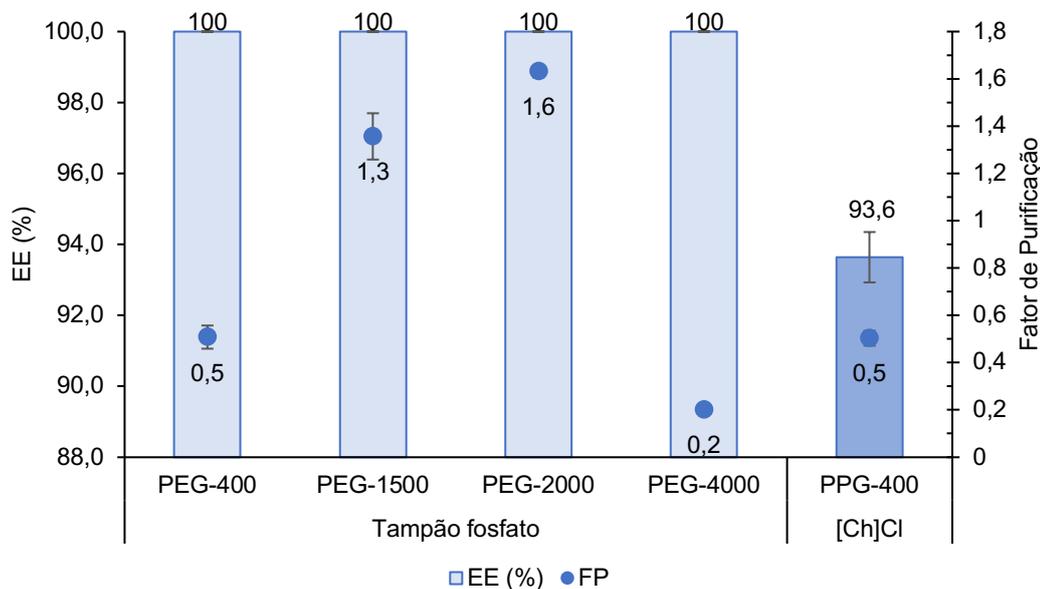


Figura 19. Eficiência de extração (%) e fator de purificação (FP) das fases ricas em L-ASNase dos SABs polímero-sal.

O efeito do peso molecular do polímero interfere na partição pois quanto maior o peso molecular, maior a hidrofobicidade da fase rica em polímero. O aumento do peso molecular do PEG nos sistemas PEG-fosfato correspondeu a um aumento no fator de purificação, dos pesos 400, 1500 e 2000. A partir de 4000, entretanto, há uma baixa

no fator de purificação (0,2), além de baixo Kb, atividade relativa (5,4%), atividade de L-ASNase, concentração de proteína, além de perdas de massa (34,54%) (Tabela 7 e Tabela 8). Dois fatores determinam estes efeitos: exclusão estérica da proteína e a maior hidrofobicidade, desta forma, reduzindo a área da razão entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos (FERREIRA; UVERSKY; ZASLAVSKY, 2018; MAGRI et al., 2020; SUAREZ RUIZ et al., 2018; ZASLAVSKY; UVERSKY; CHAIT, 2016). Como a L-ASNase possui caráter moderadamente hidrofílico, sua partição foi desfavorável em SAB com PEG-4000, devido a sua diferença na força da interação entre proteína-polímero. Conforme a cadeia do polímero aumenta, há um aumento no efeito de exclusão estérica, fazendo com que interações intramoleculares e aumento da tensão interfacial entre as fases, resultando nessa interação fraca entre proteína-polímero (CHOW et al., 2015; JOHANSSON et al., 1998).

Tabela 7. Composição, pH, densidade, umidade de sistemas polímero sal PEG + tampão fosfato e PPG + [Ch]Cl.

Sistema	Composição (%)			pH		Densidade (g/cm ³)		Umidade (%)	
	Polímero	Sal	Água	Topo	Fundo	Topo	Fundo	Topo	Fundo
PEG + Tampão fosfato									
PEG-400	15	20	65	7,6	7,2	0,96	1,09	59,6	67,3
PEG-1500	15	20	65	8,4	7,4	1,02	1,27	54,9	71,7
PEG-2000	15	20	65	8,1	7,4	1,02	1,25	56,0	73,3
PEG-4000	15	20	65	8,6	7,1	1,13	1,3	53,3	69,7
PPG + [Ch]Cl									
PPG-400	30	16	54	5,9	6,5	0,96	1,09	26	75,7

O sistema PPG-400/[Ch]Cl apresentou algumas diferenças dos SABs com PEG. A primeira foi a fase rica em L-ASNase, neste sistema foi na fase fundo, a fase rica em sal, com uma eficiência de extração de 93,6% para esta fase. A partição da L-ASNase para a fase rica em [Ch]Cl, resultando num $K_a > 0$, pode ser explicada devido à baixa hidrofobicidade da fase rica em polímero, que pode ser comprovada pela sua baixa umidade (12,6%) (Tabela 7). Neste sistema, ambas as fases apresentaram pH

menor que dos SABs contendo PEG, mas ainda maior que o pI (ponto isoelétrico) da L-ASNasePS, 4,84, maior Ka e menor Kb. Entretanto, foi observada a segunda maior atividade relativa entre todos os sistemas, de 21,8% (Tabela 8 e Figura 20). Esta alta atividade relativa pode ser atribuída pelo fato de que [Ch]Cl é capaz de preservar a estabilidade da proteína e sua atividade catalítica (MAGRI et al., 2019). Apesar da atividade relativa considerável, a fase rica em PPG-400 apresentou uma alta concentração de proteína (0,68 mg/mL), reduzindo assim seu fator de purificação para menor que 1, pois o fator de purificação é calculado com base na atividade específica da enzima ($U/mg_{proteína}$) (Tabela 8). Este resultado demonstra que outras proteínas também tiveram afinidade por essa fase, particionando para ela, e reduzindo a atividade específica da L-ASNase.

Através da análise do fator de purificação das fases ricas em L-ASNase, apenas os sistemas PEG-1500 e PEG-2000/tampão fosfato purificaram a enzima ($PF \geq 1$) (Tabela 8 e Figura 20). Considerando a hidrofobicidade, era esperado que a L-ASNase particionasse preferencialmente pela fase rica em sal dos sistemas PEG/fosfato, pois estas fases apresentaram maior umidade que a fase topo, rica em polímero (Tabela 7). Entretanto, a partição de proteínas em SABs envolve vários outros fatores, é um balanço complexo que envolve solubilização, pH, e entropia e entalpia de ligação. Todas as fases ricas em PEG apresentaram alto pH (> 8), portanto L-ASNase estava negativamente carregada, o que adiciona afinidade da enzima pelo polímero (CHOW et al., 2015).

Tabela 8. Parâmetros de partição (K e EE[%]), atividade relativa (%) Atividade de L-ASNase (U/mL , $U/mg_{proteína}$ e $U/g_{cél.}$), concentração de proteína (mg/mL), fator de purificação e balanço de massa (%) dos SABs polímero-sal.

Sal	Polímero	Fase rica							FP	BM (%)
		Parâmetros de partição			L-ASNase			Proteína		
		K	EE (%)	Atividade relativa (%)	U/mL	$U/mg_{proteína}$	$U/g_{cél.}$	mg/mL		
	PEG-400	∞	100	16,9	0,176	0,337	0,352	0,522	0,51	95,94
Tampão fosfato	PEG-1500	∞	100	17,2	0,136	0,584	0,382	0,233	1,36	99,41
	PEG-2000	∞	100	28,7	0,227	0,656	0,566	0,346	1,63	103,1
	PEG-4000	∞	100	5,4	0,1	0,21	0,201	0,479	0,2	65,46

[Ch]Cl	PPG-400	-0,6	93,6	21,8	0,153	0,225	0,306	0,681	0,5	94,97
--------	---------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-----	-------

FP: fator de purificação; BM: balanço de massa.

Estes resultados sugerem que uma alta EE% não garante a manutenção da atividade de L-ASNase na fase rica, nem um fator de purificação alto (Figura 19). As maiores atividades relativas obtidas foram dos sistemas PEG-2000/fosfato (28,7%) e PPG-400/[Ch]Cl, demonstrando que apesar de haver perdas na atividade catalítica da L-ASNase, são sistemas promissores para a partição desta enzima (Figura 20). Entretanto, o sistema PPG-400/[Ch]Cl não foi capaz de purificar a enzima, devido seu FP menor que 1. O maior FP obtido foi do sistema PEG-2000/fosfato (FP = 1,63) (Tabela 8). Além disso, este sistema não apresentou perdas de massa as maiores atividades específica entre todos os sistemas (0,66 U/mg_{proteína} e 0,57 U/g_{cél.}).

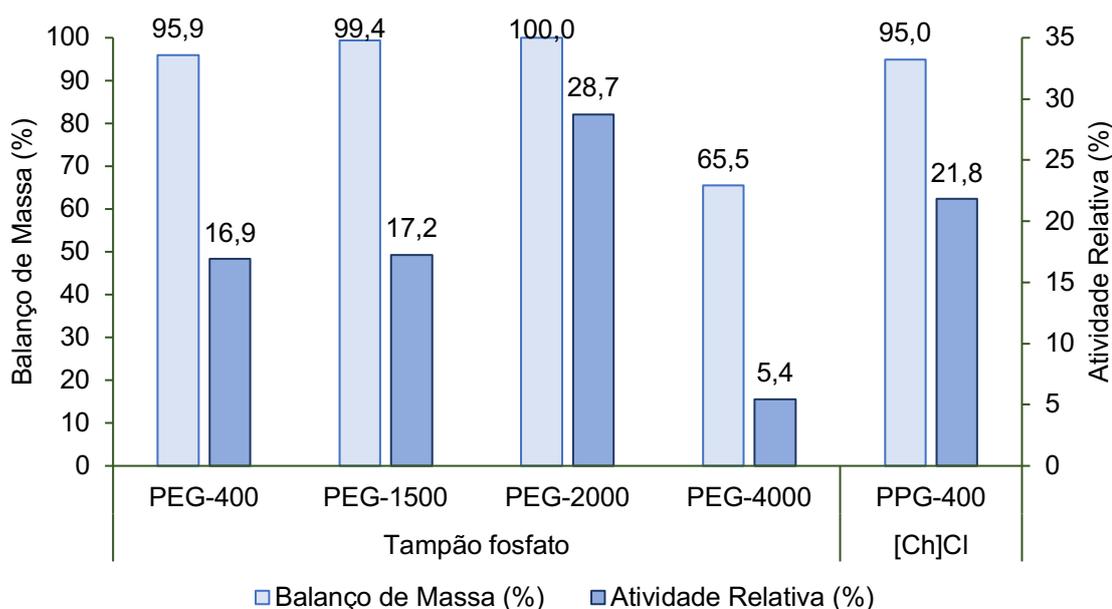


Figura 20. Balanço de Massa (%) e atividade relativa (%) das fases ricas em L-ASNase dos sistemas aquosos polímero-sal.

O sistema PEG-2000/fosfato foi considerado o sistema de partição da L-ASNase mais vantajoso e sua fase rica em enzima foi concentrada por ultrafiltração (membrana de 30 kDa *cut-off*) com a finalidade de remover o PEG e o sal presente na amostra, para seguir com a cromatografia de troca iônica. É possível verificar a presença de muitas bandas na amostra concentrada no gel de eletroforese, o que é esperado pois

SABs são plataformas de purificação de baixa resolução. Portanto, pelo menos mais uma etapa de purificação é necessária (Figura 21).

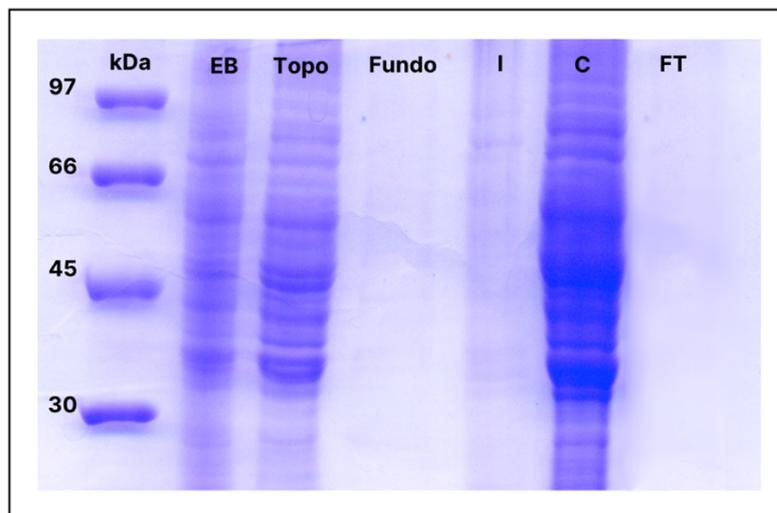


Figura 21. Gel desnaturante de poliacrilamida (12%) corado com azul de Coomassie contendo as amostras: extrato bruto (EB), fase topo, fase fundo, interface (I), concentrado após ultrafiltração (C), e filtrado (FT) de um sistema aquoso bifásico PEG-2000/fosfato.

EB: extrato enzimático de Tris-HCl 50 mM pH 8,6; C: *cut-off* de 30 kDa.

5.5 PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A fase topo do sistema PEG-2000/fosfato concentrada em 10 vezes por ultrafiltração com membrana de 30 kDa de *cut-off* foi submetida a purificação por cromatografia de troca iônica (Figura 22). Pela análise do cromatograma (Figura 22A), é possível observar um grande pico se iniciando na fração 2 e terminando na fração 10. Pela análise do gel de SDS-PAGE (Figura 22B) foi possível observar a presença de bandas apenas nas frações 6, 7 e 8. Diferente do gel da fase topo concentrada (Figura 21), há a presença de poucas bandas nas frações (aproximadamente 8), sendo perceptível a presença da banda próxima ao marcador molecular de 45 kDa, sugerindo ser a L-ASNasePS. As frações foram liofilizadas e suspendidas em água ultrapura, 10 vezes concentrada.

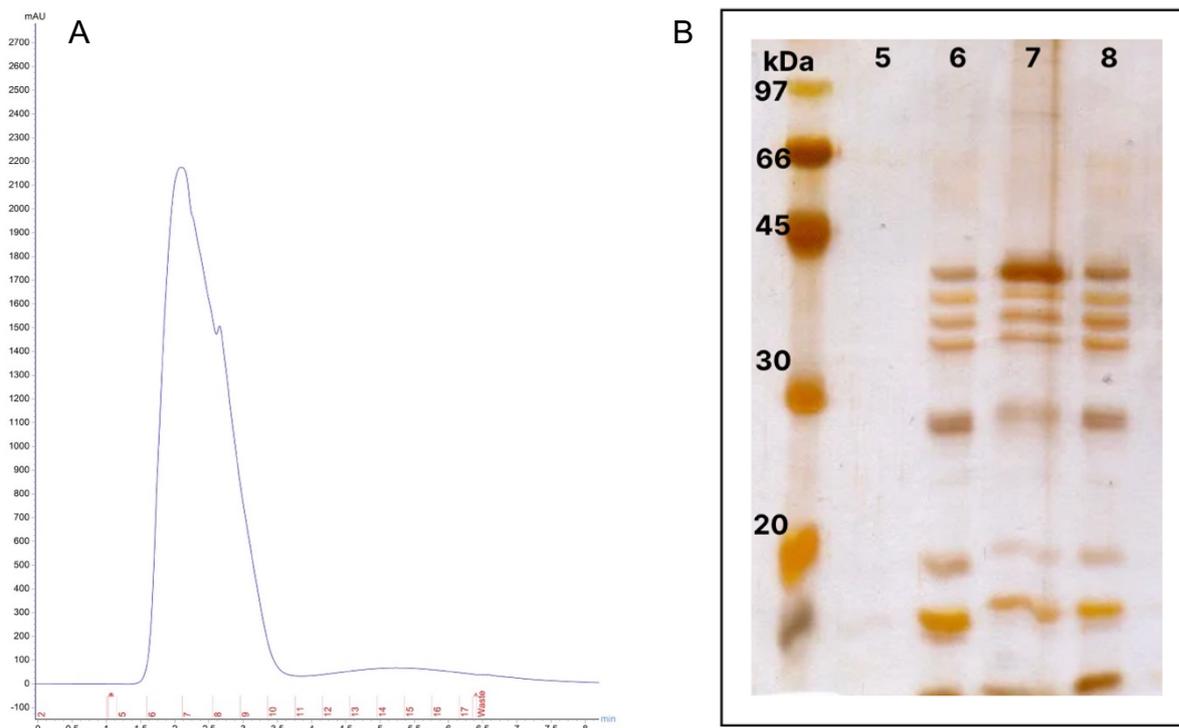


Figura 22. Cromatograma da eluição com Tris-HCl 50 mM pH 8,6, de 5 mL da fase topo concentrada (30 kDa) no Akta Pure, com uma coluna HiTrap DEAE FF, fluxo 0,5 mL/min, e tampão de eluição Tris-HCl 50 mM NaCl 500 mM pH 8,6 (A). SDS-PAGE (12%) corado com nitrato de prata. Frações 5 a 8 obtidas a partir da corrida cromatográfica descrita em A.

Todas as frações (6, 7 e 8) foram concentradas 10x e após liofilização apresentaram atividade de L-ASNase, respectivamente de 2,89, 2,83 e 4,41 U/mg_{proteína} (Tabela 9). Estas frações apresentaram fatores de purificação de 7,19, 7,04 e 8,49, respectivamente. O rendimento das frações foi acima de 15%, e as frações 7 e 8 apresentaram maior rendimento do que apenas o uso do SAB de PEG-2000/fosfato, como pode-se observar na Tabela 9. A amostra concentrada após ultrafiltração apresentou um baixo fator de purificação devido a possíveis perdas durante o processo, que provavelmente promoveu a desnaturação da L-ASNase, pois a concentração de proteínas se manteve alta (1,65 mg/mL). Além disso, o rendimento acima de 100% é indicativo da concentração da amostra.

Tabela 9. Atividade total de L-ASNase (U/mL), concentração de proteína (mg/mL), atividade específica (U/mg_{proteína}), fator de purificação e recuperação das etapas de purificação da L-ASNasePS.

Etapa de purificação	V (mL)	[L-ASNase] (U/mL)	CP (mg/mL)	AE (U/mg _{proteína})	FP	η (%)
Extrato bruto	10	0,65	1,62	0,40	1,00	100,0
Fase rica em PEG	60	0,23	0,34	0,66	1,64	26,8
Concentrado	6	0,44	1,65	0,08	0,21	746,1
Fração 6 (10x)	2	0,20	0,07	2,89	7,19	15,28
Fração 7 (10x)	2	0,37	0,13	2,83	7,04	27,93
Fração 8 (10x)	2	0,45	0,09	3,41	8,49	33,66

V: volume; [L-ASNase]: atividade enzimática; CP: concentração de proteína; AE: atividade específica; FP: fator de purificação; η: rendimento. Fase rica em PEG: obtida a partir do SAB de PEG-2000/fosfato; concentrado: fase rica do SAB ultrafiltrada com membrana de 30 kDa.

Estes resultados se assemelham com estudos encontrados na literatura na purificação de enzimas com o uso de SABs PEG/sal. TADDIA et al., (2021) reportaram rendimentos entre 7,1 – 79,9% e fator de purificação entre 1,9 – 11,1 após 4 etapas de purificação de xilanases de *A. niger*, incluindo SAB PEG/citrato e cromatografia de troca iônica. CARDOSO et al. (2023) obtiveram um rendimento de 2,95% e fator de purificação de 1,18 de uma L-ASNase expressa em heterologamente. Foram realizadas duas etapas de purificação, uma delas sendo CTI. Valores similares foram encontrados por ARUMUGAM; THANGAVELU (2022) na purificação de L-ASNase de *Chaetomium sp.*, com fator de purificação de 2,45 após duas etapas de purificação, incluindo CTI. Estes resultados demonstram que rendimento e fator de purificação podem variar e não são proporcionais ao número de etapas de purificação.

No presente trabalho, após 3 etapas de purificação o FP variou entre 7,04 – 8,49 e o rendimento entre 15,28 – 33,66%, das frações que apresentaram atividade enzimática de L-ASNase, apesar da presença de outras proteínas como é possível observar pelo SDS-PAGE (Figura 22A) das frações coletadas pós CTI. Apesar de mais de uma etapa de purificação ser adicionada, o FP das frações aumentou ao menos 4 vezes em comparação com as fases ricas em L-ASNase do sistema PEG-2000/fosfato. A combinação dessas duas técnicas inclui a falta de necessidade de pré-tratamento de materiais e reagentes, baixo custo, rapidez, baixo impacto ambiental e a possibilidade de tratar grandes volumes, facilitando o escalonamento. Além

disso, normalmente quando se usa cromatografia para purificar proteínas é necessária uma etapa prévia de precipitação com sulfato de amônio e dessalinização, que podem reduzir o rendimento. O uso de SAB na purificação de L-ASNase proporcionou um pré-tratamento de um extrato rico em diversas proteínas biocompatível, não-tóxico, de possuir baixos custos, ser não desnaturante, possuir facilidade no escalonamento e curtos tempos de processamento (220).

6 CONCLUSÃO

Neste capítulo, as condições do *downstream* e *upstream* da L-ASNase de *P. sizovae* foram avaliadas. A partir de um cultivo em meio Czapek-Dox modificado (razão C/N de 2,82) com ureia, L-prolina e L-asparagina como principais fontes de nitrogênio obteve-se a atividade específica de L-ASNase de 0,75 U/g_{cél.}. Sistemas ternários contendo diferentes proporções de etanol, água e acetato de etila, além de solventes eutéticos profundos e tampão Tris foram testados na extração da L-ASNase a partir das células do fungo, sendo o tampão Tris o solvente com maior atividade específica.

Após o estudo de sistemas aquosos bifásicos polímero-sal, o sistema PEG-2000/fosfato demonstrou uma partição total para a fase topo (fase rica em polímero), fator de purificação de 1,64, atividade relativa de 28,7% e rendimento de 26,8%. Com a combinação de ultrafiltração e cromatografia de troca iônica, o fator de purificação aumentou 4 vezes, com o rendimento máximo de 33,7%. Sistemas aquosos bifásicos polímero-sal seguido de cromatografia de troca iônica é um processo interessante para a purificação de produtos biológicos, devido aos baixos custos, baixo impacto ambiental, não necessitar da etapa de precipitação, além da possibilidade de purificar grandes volumes e tempo reduzido, em comparação com outros processos de purificação. Entretanto, ainda é necessário estudos para aumentar o fator de purificação e melhorar o grau de pureza da L-ASNase expressa pelo fungo *P. sizovae* de forma nativa.

CAPÍTULO III

Expressão heteróloga da L-asparaginase de *P. sizovae* em *E. coli* BL21(De3)

1 INTRODUÇÃO

Um bioprocesso robusto é fundamental para a garantia de que a qualidade do produto final cumpra suas especificações, representando um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de biofármacos. A partir de pequenas alterações no processo como parâmetros de operação, linhagem celular, métodos de produção e etapas de purificação, os atributos de uma proteína podem ser afetados, como a estrutura, atividade e a presença de contaminantes (SASSI; NAGARKAR; HAMBLIN, 2015).

Em relação à L-ASNase, a maior parte da literatura científica disponível está focada nos processos de otimização, rendimento e maximização do rendimento, sem considerar os aspectos a respeito da qualidade do produto final. O estudo sobre o desenvolvimento e produção visando viabilidade econômica, eficácia e segurança são fundamentais para uma L-ASNase viável e segura (BRUMANO et al., 2019).

Nos últimos anos uma série de fontes de L-ASNase e estratégias de bioengenharia foram testadas, considerando redução de imunogenicidade e reações alérgicas, alta atividade catalítica e baixo custo nos processos *upstream* e *downstream* (PATEL et al., 2022). A L-ASNase tipo II de eucariotos, como fungos e leveduras, vem demonstrado menos efeitos adversos, porém possuem baixo rendimento (CACHUMBA et al., 2016). Técnicas de expressão heteróloga são empregadas a fim de aumentar a recuperação enzimática, além da produção de enzimas recombinantes com características desejáveis. Uma série de estratégias moleculares e modificações químicas são empregadas para a redução da imunogenicidade, estabilidade contra degradação de proteases, baixa L-glutaminase, maior especificidade, maior tempo de meia-vida, além de um maior rendimento em relação à enzima nativa (LEFIN et al., 2023).

Devido à necessidade de uma L-ASNase para uso terapêutico com maior afinidade com substrato, menor tempo de meia vida, baixa atividade de glutaminase, estabilidade para às condições fisiológicas do corpo humano, além da redução de efeitos imunogênicos, e que seja economicamente viável, o desenvolvimento e estudo de técnicas de bioengenharia visando uma otimização da produção enzimática possui importância clínica, devido seu impacto tanto econômico quanto social (BRUMANO et al., 2019; LEFIN et al., 2023; WANG et al., 2021).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Em processos de larga escala, a produção de biofármacos a partir de linhagens selvagens normalmente é evitada, principalmente devido aos baixos rendimentos e altos custos de processamento. Para resolver estes problemas, uma abordagem pode ser o uso de tecnologia de DNA recombinante para transferir genes que codificam a enzima de um microrganismo a outro. Este processo se chama expressão heteróloga (LI et al., 2019).

A expressão heteróloga consiste na expressão de um gene ou fragmento de um gene de um microrganismo em um organismo hospedeiro. Esta técnica surgiu a partir da inovação das tecnologias de DNA recombinante nos anos de 1970. Desta forma, é possível determinar estabilidade, atividade e especificidade da enzima desejada, realizando múltiplas cópias de genes, utilizando fortes promotores e peptídeos sinais eficientes, além da adição de marcadores para auxiliar a purificação. O uso da expressão heteróloga em organismos de fácil cultivo, como bactérias, aumenta a produtividade e reduz os custos de produção (ALESSANDRA et al., 2010; PASSAGLIA; ZAHA, 2014).

Para a produção de biofármacos, células de mamíferos são os sistemas mais utilizados atualmente (WALSH, 2018). Proteínas recombinantes expressas em levedura apresentam um alto perfil de N-glicosilação tipo manose, além da redução do seu tempo de meia vida, o que pode comprometer a eficácia de glicoproteínas farmacêuticas (BAGHBAN et al., 2018; WILDT; GERNGROSS, 2005). Uma série de estratégias são utilizadas para a produção de sistemas de levedura utilizando glicoengenharia, o que aumenta os custos de produção (HAMILTON et al., 2006). Já na expressão em plantas, o principal obstáculo presente é a ausência de glicosilação humana, sendo necessárias estratégias de glicoengenharia para a retenção de proteínas no retículo endoplasmático (HAMORSKY et al., 2015; MUNRO; PELHAM, 1987).

Devido os desafios apresentados na produção heteróloga em sistemas de levedura e plantas, sistemas de *E. coli* tornam-se atrativos devido seu baixo custo de cultivo, rápido crescimento, alto rendimento, fácil seleção de mutantes e manipulação genética, além de uma maior eficiência na incorporação do DNA exógeno (GOPAL; KUMAR, 2013).

2.2 L-ASNASE GENETICAMENTE MODIFICADA

O uso de modificações moleculares ou químicas de um produto original com a finalidade de melhoramento das características do fármaco são chamados de *bio-betters*. Este termo se refere ao aprimoramento de características de biofármacos formados por peptídeos ou proteínas (BECK, 2011; SAUNA et al., 2017). Algumas dessas estratégias moleculares incluem análise por bioinformática, *docking*, dinâmica molecular e mutagênese sítio dirigida (MAHAVIDYALAYA; MUNDAGANUR; KANNARATH, 2014; MUNHOZ COSTA et al., 2022). Através de estratégias moleculares é possível reduzir a imunogenicidade da L-ASNase (ANDRADE et al., 2024; MUNHOZ COSTA et al., 2022). Já as modificações químicas incluem ligação C-terminal com uma proteína de fusão de cadeia única (scFv) (aumenta a resistência da L-ASNase à tripsina), fusão do domínio TRAIL (induz células tumorais à apoptose), PEGuilação, PASilação e bioconjugação (promovem o aumento do tempo de meia-vida) (BRUMANO et al., 2019; GUO et al., 2000). Neste cenário, proteínas *bio-better* tem ganhado considerável atenção industrial, devido suas inovações e altos valor no mercado devido suas vantagens clínicas.

A primeira L-ASNase produzida por bioengenharia aprovada para uso clínico foi a pergaspargase (L-ASNase peguilada), modificada a partir da Elspar®, em 1994 (HOLLE, 1997). Desde então, várias formulações entraram no mercado com tecnologias recombinantes, além de novas patentes (ALVES et al., 2016; TRIEU, 2015). As outras formulações aprovadas com tecnologia recombinante incluem mutagênese dirigida Spectrila® (L-ASNase de *E. coli*) e Rylaze® (L-ASNase de *D. dadantii*); e Asparlas® e Hamsyl® (ambas de *E. coli*) com PEGuilação.

Em relação à expressão, a L-ASNase industrial é produzida heterologicamente, sendo em sua maioria por *E. coli*. Na indústria de alimentos a Acrylaway® e PreventASe™ são obtidas de *Aspergillus niger* e *A. oryzae*, respectivamente, e expressadas em *A. oryzae* (MUNEER et al., 2020). No sistema de expressão com *E. coli*, a L-ASNase endógena do hospedeiro pode afetar a estabilidade do genoma da bactéria e a taxa de retenção do plasmídeo. Desta forma, variantes de *E. coli* são utilizadas para aprimorar os hospedeiros. A variantes BL21 (DE3) é a mais utilizada para a produção de proteínas, devido a depleção das proteases Lon e OmpT (RATELADE et al., 2009). Além disso, esta variante é frequentemente aplicada com

sistemas de expressão baseados no promotor T7, que é caracterizado por alta taxa de transcrição (HAUSJELL et al., 2018; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Novos sistemas de expressão vêm sendo utilizados na literatura como plantas, mamíferos e leveduras, na expressão de L-ASNase bacteriana e de levedura (DANTAS et al., 2019; DE ALMEIDA PARIZOTTO et al., 2021; EFFER et al., 2019; MOHAMMADI et al., [s.d.]; RODRIGUES et al., 2019; SAJITHA et al., 2015).

Os níveis de secreção de L-ASNase em sistemas heterólogos também estão relacionados ao peptídeo sinal. AGHAEPOOR et al. (2011) substituíram o peptídeo sinal nativo numa sequência de L-ASNase II pela sequência líder pelB, o que aumentou o rendimento da L-ASNase. Em consequência de altos níveis de produção, a L-ASNase em *E. coli* também pode ser expressa em forma de agregados insolúveis parcialmente enovelados, que são chamados de corpos de inclusão (CIs) (HANNIG; MAKRIDES, 1998; KELLEY; WINKLER, 1990).

As principais condições que interferem nos níveis enzimáticos da L-ASNase recombinante incluem parâmetros de fermentação, meio de cultivo, temperatura, concentração de indutor e tempo pós-indução. Além da construção do vetor e da expressão da proteína de forma correta e ativa (WANG et al., 2021).

Apesar da expressão heteróloga de L-ASNase bacteriana ser amplamente estudada e aplicada na indústria, há pouco reportado sobre a expressão heteróloga de L-ASNase com origem de fungos filamentosos (RODRIGUES ANDRADE et al., 2023). Os sistemas de expressão utilizados encontrados atualmente utilizam *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Komagataella phaffii* (WANG et al., 2021). Os sistemas de expressão heteróloga com genes de origem fúngica encontrados na literatura atual estão reportados na Tabela 10.

Tabela 10. Sistemas de expressão heteróloga de L-ASNase com genes de origem fungos filamentosos.

Fungo	Hospedeiro	Vetor	[L-ASNase]	Referência
<i>Sclerotinia borealis</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a	0,6 U/mL	DUMINA et al. (2021)
<i>Flammulina velutipes</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pCTP2	16 U/mL	EISELE et al (2011)
<i>Penicillium sizovae</i>	<i>K. phaffii</i> X-33	pPICZαA	3,05 U/g _{célula}	FREITAS et al. (2022)
<i>Rhizomucor miehei</i> CAU432	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a	1.984,8 U/mg _{proteína}	HUANG et al. (2014)
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a	69,1 U/mg _{proteína}	JEBUR et al. (2019)

<i>Aspergillus terreus</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pET-28a	42,46 U/mg _{proteína}	SAEED et al. (2018)
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	pET-28a	4,1 U/mL	ZHANG et al. (2021)
<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>B. subtilis</i> 168	pMA5	521,9 U/mL	ZHANG et al. (2021)
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>K. phaffii</i> X-33	pPICZαA	2,84 U/g _{célula}	CARDOSO et al. (2023)

[L-ASNase] = atividade enzimática de L-ASNase.

Uma revisão sistemática realizada em 2023 a partir de 4172 artigos encontrados nas bases de dados Scopus, Science Direct, PubMed e Web of Science encontrou apenas 8 trabalhos com sobre a expressão heteróloga de L-ASNase tipo II de fungos filamentoso (todos os citados na Tabela 10, exceto o *F. proliferatum* expresso em *K. phaffii* X-33, que foi publicado após a revisão sistemática) (RODRIGUES ANDRADE et al., 2023).

Cinco dos nove sistemas de expressão heteróloga utilizaram *E. coli* BL21(DE3) como hospedeiro, e dentre estes, cinco utilizaram o vetor pET-28a. Este vetor contém o promotor T7, um dos promotores mais fortes, ocasionando uma expressão considerável de proteína (BACIU et al., 2023). A escolha da *E. coli* se dá por ser uma bactéria amplamente utilizada na produção de proteínas farmacêuticas, devido seus baixos custos operacionais e alto rendimento (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). A preferência pela cepa BL21(DE3) se dá pela presença do gene que codifica a T7 RNA polimerase, pelo controle do forte promotor *lacUV5*, deleção dos genes *OMPT* e *LON* que codificam proteases, reduzindo assim a degradação das proteínas recombinantes (ROSANO; MORALES; CECCARELLI, 2019). A cepa BL21(DE3) pLysS utilizada por SAEED et al.(2018a), do gene que codifica a T7 RNA polimerase e da deleção dos genes que codificam proteases, possui também o gene T7 lisozima, que modula a atividade da T7 RNA polimerase, reduzindo o nível basal de expressão do gene de interesse, e conseqüentemente aumentando a tolerância das células de *E. coli* contra toxicidade (PAN; MALCOLM, 2000). Todos os sistemas expressos em bactéria foram induzidos com IPTG, exceto DUMINA et al. (2021), que induziram com lactose.

ZHANG et al. (2021) realizaram a expressão heteróloga de *R. miehei* em *B. subtilis*, uma cepa segura para alimentação. Foram adotadas modificações na região 5' para aumentar o nível de expressão da L-ASNase. Outros dois trabalhos expressaram L-ASNase de *P. sizovae* e *F. proliferatum* em *K. phaffii* X-33, os quais

usaram o vetor pPICZ α A, contendo o promotor AOX1 que permite a expressão em alto nível induzível por metanol (CARDOSO et al., 2023; FREITAS et al., 2022).

SAEED et al. (2018) reportaram que mais de 60% da expressão de L-ASNase foi em corpos de inclusão. Os outros autores não reportaram o mesmo, apesar de três dos estudos terem realizado a indução a baixas temperaturas, estratégia utilizada comumente para minimizar a formação de corpos de inclusão (DUMINA et al., 2021; EISELE et al., 2011; ZHANG et al., 2021). Os resultados de atividade enzimática foram expressos de variadas formas (U/mL, U/mg_{proteína}, U/g_{célula}) e por diferentes métodos (vermelho de fenol, β -hidroxamato aspártico, nessler e quantificação de L-ácido aspártico por HPLC), portanto, não há como comparar os resultados. Entretanto, vale destacar os resultados de HUANG et al. (2014) e ZHANG et al. (2021), com valores de 1.984,8 U/mg_{proteína} e 521,9 U/mL, respectivamente.

Ensaio *in vitro* foram realizadas por HUANG et al. (2014) e CARDOSO et al. (2023). No primeiro estudo a L-ASNase de *R. miehei* (RmASNase) expressa em *E. coli* BL21(DE3) combinada com uma lectina de *Astragalus membranaceus* foi testada contra células K562, U937 e Jukart. As células apoptóticas foram quantificadas e os resultados sugerem que a RmASNase induziu as células tumorais à apoptose, com ou sem lectina. Já no segundo estudo, a L-ASNase de *F. proliferatum* expressa em *K. phaffii* X-33 foi testada em células Jukart, em comparação com uma L-ASNase comercial. Os resultados indicaram que enquanto a L-ASNase comercial não interferiu na viabilidade celular nas doses investigadas, a L-ASNase de *F. proliferatum* foi capaz de induzir as células Jukart à apoptose em concentração a partir de 0,005 UI/mL. HUANG et al. (2014) também analisaram a redução de acrilamida em alimentos cozidos feitos com farinha contendo RmASNase. Com a adição de 10 U/g de farinha houve redução de até 80% de acrilamida.

A partir da análise destes resultados, é possível concluir o potencial do uso de L-ASNase de origem de fungos filamentosos em sistemas de expressão heteróloga tanto na indústria alimentar quanto na farmacêutica, considerando os hospedeiros de origem bacteriana com maior rendimento.

2.3 CORPOS DE INCLUSÃO

Apesar das vantagens na produção enzimática por expressão heteróloga, alguns problemas são frequentemente encontrados, como envelhecimento inadequado, alto

peso molecular, a presença de vários domínios de membrana na proteína, *metabolic burden*, uso de códons diferentes e sequencias repetitivas após a translação (LEFIN et al., 2023). Alguns destes problemas encontrados na expressão heteróloga de L-ASNase incluem baixa expressão de proteína e atividade enzimática devido à regulação transcricional e translacional, de *R. miehei* expressa em *K. phaffii* (ZHANG et al., 2021). EFFER et al. (2019) expressaram a L-ASNase de *D. dadantii* em *K. phaffii* e reportaram que cauda de histidina pode afetar negativamente a conformação tetraédrica da enzima, causando enovelamento inadequado. NADERI et al. (2022) reportaram o efeito da hidrofobicidade no peptídeo sinal da L-ASNase e a formação de CI (*E. coli*). Em relação à expressão de genes eucariotos em sistemas procariotos, a formação de CI e o correto enovelamento da proteína são frequentemente observados (KELLEY; WINKLER, 1990).

Corpos de inclusão são agregados insolúveis de proteínas gerados pelo excesso de expressão que pode ocorrer após a indução (VALLEJO; RINAS, 2004). Os CIs são considerados o maior obstáculo na produção de proteínas recombinantes ativas e solúveis. Apesar do emprego de estratégias moleculares e bioquímicas para evitar sua formação, cerca de 80% de proteínas recombinantes são superexpressadas em *E. coli*, formando CIs. Entretanto, cerca de 30% dos biofármacos produzidos industrialmente utilizam sistemas de *E. coli* (JÜRGEN et al., 2010; SLOUKA et al., 2018; WALSH, 2018).

Na expressão de L-ASNase, a formação de CIs e enovelamento incorreto são cruciais porque a L-ASNase II só é ativa na sua conformação tetraédrica. Portanto, é necessário o enovelamento à sua forma nativa para a presença das suas propriedades bioativas (MIHOOLIYA et al., 2023). Esforços consideráveis vem sendo realizados no *downstream* envolvendo isolamento, solubilização, renaturação (enovelamento) e purificação para a obtenção da proteína bioativa (KANTE et al., 2018). Algumas das estratégias utilizadas são o uso de fortes agentes caotrópicos, método de diluição pulsativa, congelamento e descongelamento, cromatografia periódica em contracorrente, dentre outros (KANTE et al., 2018; RAJENDRAN; PUSHPAVANAM; JAYARAMAN, 2022; SINGHVI et al., 2021; UPADHYAY et al., 2014). Esses processos são cansativos e exigem um grande número de etapas, especialmente para proteínas multiméricas, pois exige inicialmente a solubilização e renaturação dos monômeros, e em sequencia o redobramento até a obtenção da sua estrutura tetraédrica (no caso

da L-ASNase) em condições fisiológicas (MIHOOLIYA et al., 2023; UPADHYAY et al., 2014).

Em escala laboratorial, diálise e diluição são os métodos mais utilizados, entretanto, possuem limitações no escalonamento, pois é necessário grandes volumes de tampões de redobrimento, além dos custos adicionados pela diálise. Para reduzir os custos destas técnicas, ultrafiltração tangencial vem sendo utilizada para a recuperação da proteína em alta escala (RYŚ et al., 2015). Além disso, a diálise tem demonstrado um alto rendimento no redobrimento, comparado com o método de diluição (CHUA; TAN; LIEW, 2018). O redobrimento em coluna é um método que não apenas separa os agregados, como também purifica a proteína, reduzindo a necessidade de mais etapas. Diferente da diálise e diluição, o redobrimento em coluna é um processo custo efetivo para escala industrial, porém é um processo mais efetivo para monômeros. Recentemente, métodos em coluna vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo a redobrimento em coluna de matriz monolítica. O método apresenta alta pureza, alta taxa de redobrimento e alto rendimento, além de possuir fácil escalabilidade e baixo tempo de processamento (SUSHMA et al., 2012).

Embora os CIs apresentam desafios em seu enovelamento à conformação original, vantagens associadas aos CIs também são atrativas, como resistência a proteases, menos toxicidade ao hospedeiro e facilidade na sua purificação. O processo de isolamento de CIs é facilitado pelas diferenças no tamanho e densidade dos CIs em comparação a proteínas nativas, especificidade, estabilidade mecânica, alta expressão, e alguns CIs apresentam atividade biológica (DE MARCO et al., 2019; RAMÓN; SEÑORALE-POSE; MARÍN, 2014; SINGHVI et al., 2020). Existem vários relatos na literatura a respeito da presença de estruturas secundárias em corpos de inclusão (OBERG et al., 1994; PRZYBYCIEN et al., 1994; UMETSU et al., 2004). Além da presença de atividade enzimática e estrutura terciária em CIs (FLORES et al., 2019). Os CIs com atividade biológica significativa são conhecidos como corpos de inclusão não-clássicos, e são caracterizados por proteínas que podem ser solubilizadas a baixas concentrações de desnaturantes (GARCÍA-FRUITÓS et al., 2012; UPADHYAY et al., 2012).

Originalmente considerados indesejáveis e um problema na produção de proteínas recombinantes, a partir dos estudos dos últimos 40 anos essa visão já não é mais considerada (RAMÓN; SEÑORALE-POSE; MARÍN, 2014; SINGHVI et al.,

2020). CIs fornecem, praticamente, uma fonte pura de proteínas, e possuem um potencial uso de “proteínas prontas para uso”. Neste sentido, o design de estratégias e um conhecimento profundo sobre a estrutura e formação dos CI são capazes de identificar alvos moleculares que podem aumentar seu rendimento (RAMÓN; SEÑORALE-POSE; MARÍN, 2014).

3 OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivo principal expressar uma L-ASNase de um fungo isolado do cerrado (*Penicillium sizovae*) em sistema heterólogo procaríoto de *Escherichia coli*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonagem e expressão do gene da L-ASNase do fungo *P. sizovae* em *E. coli* BL21(DE3)
- Otimização condições de expressão (temperatura de cultivo, concentração de indutor e tempo pós-indução);
- Avaliação da presença de corpos de inclusão nas frações insolúveis, bem como técnicas para solubilização, redobramento da enzima e purificação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM E ISOLAMENTO DA L-ASPARAGINASE FÚNGICA

O isolamento do gene da L-ASNase do fungo *P. sizovae* (L-ASNasePS) foi descrito por FREITAS et al. (2022).

Em placas de petri contendo meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) o fungo foi cultivado por 6 dias a 32 °C. O micélio foi raspado com cuidado e transferido para um microtubo de 2 mL com tampas de cerâmica e agitado vigorosamente em sistema disruptor celular. O DNA genômico foi purificado com um Kit de isolamento de planta/fungo (Norgen Biotek, Canadá). Dois *primers* foram utilizados na PCR que amplificam regiões do Espaçador Interno Transcrito (EIT), das regiões EIT1 e EIT4, respectivamente. A pureza dos produtos da PCR foi verificada por gel de agarose a 1,2% (m/v). As amostras de gDNA foram armazenadas a -20 °C.

4.2 CLONAGEM

4.2.1 Preparo de células competentes

As linhagens de células competentes de *E. coli* DH10 β e BL21(DE3) utilizadas para a transformação foram preparadas conforme o protocolo descrito por GREEN; ROGERS 2013), com adaptações.

A partir de um pré-inóculo de 10 mL crescido *overnight* a 37°C em meio LB, proveniente de culturas puras estocadas à -80 °C, 1 mL deste pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de LB, incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm até as culturas atingirem uma DO_{600nm} de 0,3. Posteriormente, 50 mL de cada uma das culturas foram transferidos para tubos cônicos, que foram mantidos em banho de gelo por 10 minutos, centrifugados por 10 minutos a 4 °C a 4000 g. O sobrenadante foi descartado e as células suspendidas com 30 mL de Tampão A (80 mM de MgCl₂ e 20 mM de CaCl₂), e então incubadas em gelo por mais 15 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em 2 mL de Tampão B (100 mM de CaCl₂) e acrescidas de glicerol na concentração final de 20%. As suspensões de células foram transferidas para criotubos em alíquotas de 200 μ L e armazenadas à -80 °C até sua utilização.

37 °C por 1 h sob agitação a 200 rpm. Numa placa de meio LB + canamicina (50 µg/mL), 100 µL do cultivo foi adicionado e a placa foi incubada em estufa a 37 °C por 16 – 18 h. Uma colônia foi aleatoriamente e cultivada em caldo LB + canamicina (50 µg/mL) a 37 °C por 16 – 18 h, para posterior extração do DNA plasmidial e confirmação da clonagem por meio de restrição com as enzimas NdeI (New England Biolabs, MA EUA) e XhoI (Promega, WI, EUA). A reação de digestão foi analisada em gel de agarose 0,8% (p/v).

Em seguida, o DNA plasmidial do clone foi transformado pelo mesmo método descrito acima em células competentes de *E. coli* BL21(DE3) para a expressão da proteína heteróloga. Após o cultivo em placa contendo meio LB + canamicina (50 µg/mL), 10 colônias foram selecionadas aleatoriamente e cultivadas em caldo LB contendo canamicina a 50 µg/mL, a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 – 18 h. Alíquotas foram coletadas em criotubos e adicionadas de glicerol a uma concentração final de 20% e armazenados em freezer a -80 °C.

4.3 CONFIRMAÇÃO DA INSERÇÃO DO PLASMÍDEO

A partir de um cultivo de cada um dos 10 clones em 5 mL de meio LB + 50 µg/mL de Canamicina *overnight*, a 37 °C e 200 rpm, foi realizada a extração do plasmídeo com PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific, MA, EUA). Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (0,8%) com os plasmídeos e corado com SYBR™ Green (Invitrogen, Thermo-Fisher Scientific). O padrão utilizado foi GeneRuler 1 kb DNA Ladder® (Thermo-Fisher Scientific).

Para a confirmação da inserção do gene no plasmídeo, foi realizada PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (PCR Master Mix (2X), Thermo-Fisher Scientific) utilizando os primers *forward* e *reverse* do gene da L-ASNasePS. A PCR foi conduzida com a temperatura de anelamento de 56 °C, e os produtos de PCR foram identificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), descrito conforme o parágrafo anterior. O padrão utilizado foi GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder® (Thermo-Fisher Scientific).

4.3.1 Desenho dos *primers*

A sequência da L-ASNase foi inserida no Primer3Plus® (UNTERGASSER et al., 2012), em seguida, a sequência foi avaliada quanto à possibilidade de formação de homodímeros, heterodímeros e estrutura secundária no OligoAnalyzer Tool (IDT, 2022). E por fim, a sequência foi confrontada no BLAST (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2022) a fim de verificar a especificidade do *primer*. As sequências dos *primers forward* (5'-TATCTTCGCCACTGGTGGTA-3') e o *reverse* (5'-GTACCGTGCGTAACAACACTGC-3').

4.4 TRIAGEM ENTRE 10 CLONES SELECIONADOS ALEATORIAMENTE

Os 10 clones selecionados foram cultivados em 20 mL de meio LB + 50 µg/mL de Canamicina, a 37 °C e 200 rpm. Após 4h de cultivo, foram induzidos com 0,5 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e cultivados por mais 19 h, a 37 °C e 200 rpm, conforme descrito no pET System Manual (Novagen, Merck Group, Alemanha), com modificações. Após, foram centrifugados a 13 000 g por 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular suspenso em 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6. Em banho de gelo, as células foram sonicadas por 7 minutos, 30 segundos de *pulse on* e 45 segundos de *pulse off*, com amplitude de 30% (SONICS Vibra Cell™ VCX 750, Sonics & Materials, Inc.) (COSTA-SILVA et al., 2018). As frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 10000 g por 25 minutos a 4 °C.

4.4.1 Concentração de proteína

A proteína foi quantificada conforme BCA Protein Assay Kit (Pierce®, Thermo-Fisher Scientific), método descrito na sessão 4.4 do capítulo 2 deste trabalho.

4.4.2 Quantificação enzimática de L-asparaginase

A quantificação de atividade enzimática de L-ASNase foi executada pelo método L-aspartil-β-hidroxamato, descrito na sessão 4.5 do capítulo 2 deste trabalho.

4.4.3 Precipitação de proteínas

A precipitação de proteínas foi realizada com TCA seguindo a proporção de 0,133 μ L de TCA 75% (v/v) para cada 1 mL de amostra. Após a adição do TCA, as amostras foram incubadas por pelo menos 1 h, e então centrifugadas a 10.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e em seguida foi adicionado 1 mL de acetona gelado a -20 °C. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições anteriores, e esta etapa foi repetida mais uma vez, totalizando duas lavagens com acetona. Após a evaporação completa de acetona, as amostras foram suspendidas em 20 μ L de tampão de amostra (contendo Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 2% de docecil sulfato de sódio, 25% glicerol e 0,01% de azul de bromofenol 0,01%) com 5% β -mercaptoetanol. Após, as amostras foram fervidas por 5 minutos a 95°C em banho seco para garantir a total desnaturação das proteínas.

4.4.4 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE)

O gel de separação foi preparado com Tris-HCl 1 M pH 8,8, 12% de acrilamida/bis-acrilamida (29,2/0,8%), 1% de SDS, 0,1% de persulfato de amônio (PSA), 0,2% de tetrametiletilenodiamina (TEMED). O gel empacotador foi preparado com Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, 4% de acrilamida/bis-acrilamida (29,2/0,8%), 1% de SDS, 0,15% de PSA, 0,3% de TEMED.

As amostras foram suspendidas em 20 μ L de tampão LAEMMLI (1970) (Tris-HCl 0,125 M; SDS 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,004%; 2-mercaptoetanol 10%), fervidas a 100 °C por 5 – 10 minutos, e em seguida aplicadas em gel desnaturante de acrilamida/bisacrilamida a 12% (195). O marcador de massa molecular utilizado foi de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, MI, EUA), contendo as proteínas fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovo albumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa). As corridas de eletroforese ocorreram a 150 V e 30 mA para o gel concentrador e 250 V e 50 mA para o gel separador.

Foi utilizado azul de Coomassie (PhastGel™ Blue R, GE Healthcare) para corar os géis. A solução descolorante foi composta de metanol 45%, ácido acético glacial 10% em água.

Para o cálculo do tamanho das bandas foi utilizado o software ImageJ® (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.4.5 Western-Blot

Para a confirmação da L-asparaginase, foi realizado o ensaio de Western-Blot que detecta proteínas específicas pela reação com um anticorpo. Como a L-asparaginase deste estudo possui cauda de histidina, foi utilizado um anticorpo 6x-His Tag Polyclonal Antibody, HRP (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific).

Inicialmente, 40 µg de amostra preparada conforme descrito no tópico acima, foram inseridas em gel de SDS-PAGE 12%. O padrão molecular utilizado foi iBright® Prestained Protein Ladder (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific), com pesos moleculares variando de 250 a 11 kDa. A eletroforese ocorreu nas mesmas condições descritas no tópico anterior. As proteínas contidas no gel de poliacrilamida foram transferidas para uma membrana de PVDF de 0,45 µm (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) em um sistema semi-seco Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, EUA).

Para a transferência semi-seca, a membrana de PVDF foi umedecida em água destilada e em seguida em metanol. Papéis filtro grossos para western-blot e papéis filtro comum foram umedecidos em tampão de transferência (20 mL de metanol, 60 mL de água destilada e 20 mL de tampão Tris-Glicina 5x). Foi montado um “sanduíche” contendo (de cima para baixo): papel filtro grosso, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de PVDF, papel filtro e, por último, papel filtro grosso. O sistema foi fechado e a transferência foi realizada durante 1h e 30 minutos, com potencial elétrico de 24 V e a amperagem de 400 mA.

Após, foi realizado o bloqueio da membrana com solução de leite em pó desnatado 5% em TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, 0,1% de Tween 20, pH 7,4) durante 2 h, em temperatura ambiente, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo his tag durante 1 h, sob agitação, na própria solução de bloqueio. Após, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos da membrana, com TBS-T.

Para a revelação, foi utilizado o kit SuperSignal® West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific). A identificação

das bandas por quimiluminescência foi realizada em foto documentador (Amersham Biosciences, Amersham, Reino Unido).

4.5 TRIAGEM DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para avaliar as condições de cultivo, foram consideradas as variáveis concentração de IPTG, tempo pós-indução e temperatura pós-indução. A DO_{600nm} (densidade óptica) da indução foi determinada a partir de curva de crescimento. Os métodos de lise e as condições de cultivo foram avaliadas por intensidade das bandas em gel de eletroforese (SDS-Page) uma vez que a enzima foi expressa em forma de corpos de inclusão, não sendo capaz de ser quantificada.

4.5.1 Medidas de crescimento

4.5.1.1 Curva de crescimento

Com a finalidade de verificar as DO_{600nm} das fases mid-log, log e lag, foi realizada uma curva de crescimento a 37 °C do clone que apresentou maior sinal no Western Blot. Em triplicata, 100 mL de meio LB + 50 µg/mL de canamicina em Erlenmeyer de 500 mL. A absorbância (600 nm) de 0,1 foi considerada o tempo 0. A cada 2 h foram retiradas assepticamente alíquotas de 0,8 mL e realizadas leituras em espectrofotômetro a cada 2 h, em cubetas de 1 x 1 cm, com o tempo total de 10 h. O volume utilizado para as leituras foi menor que 5% do volume do cultivo total.

4.5.1.2 Curva $DO \times$ Peso Seco

Para o cálculo da atividade específica de L-ASNase por grama de biomassa, expressando o valor em $U/g_{cél.}$, foi realizada uma curva correlacionando o peso em gramas versus a densidade óptica a 600 nm.

A partir de um cultivo de 100 mL em meio LB + 50 µg/mL de canamicina por 16 h a 37 °C a 200 rpm, as células foram centrifugadas a 10000 g por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspendidas em 10 mL de solução de NaCl 0,85%. Em balões de 10 mL, foram feitas diluições na faixa de 0,1 a 1,5 de absorbância a 600 nm, em triplicata. As diluições foram secas em cadinhos de porcelana previamente secos e pesados a 70 °C por 48 h, e subsequentemente

pesados. A partir dos resultados foi obtida uma curva de calibração, conforme Figura 24.

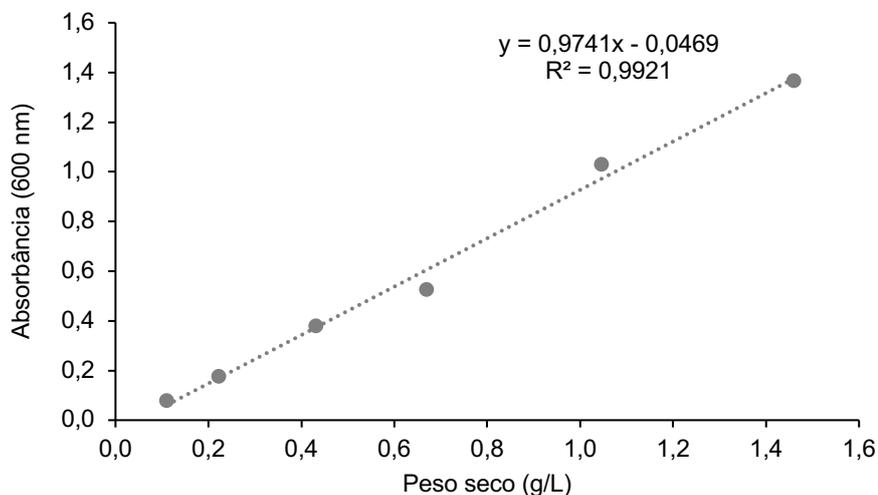


Figura 24. Curva de calibração da densidade óptica (600 nm) versus peso seco.

O cálculo para a atividade enzimática específica foi:

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

4.5.2 Métodos de lise celular

Cinco métodos de lise celular foram testados e avaliados por intensidade da banda em SDS-Page. Os cinco métodos foram conduzidos por sonicação em banho de gelo, em Sonicador Vibra Cell® VC 750, com ponteira 1/4" (6 mm). Os métodos testados estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Métodos de sonicação testados para lise celular.

Ciclos	<i>Pulse on</i>	<i>Pulse off</i>	Amplitude (%)	Referência
7	30 segundos	45 segundos	30	COSTA-SILVA et al. (2018)
10	1 minuto	1 minuto	30	UPADHYAY et al. (2014)
20	1 minuto	1 minuto	30	UPADHYAY et al. *2014)

10 (com 1 minuto de espera entre os ciclos)	1 segundo	1 segundo	30	SINGHVI et al. (2021)
15	1 segundo	1 segundo	30	LIMA (2019)

Os testes foram realizados em tubos de fundo cônico, usando 20 mL de meio LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina. Os cultivos foram iniciados com uma OD₆₀₀ equivalente a 0,1. Os tubos foram incubados em *shaker* a 37 °C, 200 rpm, durante 4 h. Decorrido este período, foram induzidos com 0,5 mM de IPTG e incubados novamente por 19 h. Ao final da expressão, foram centrifugados a 8000 g, por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 nas mesmas condições de centrifugação. O tampão foi descartado e foi adicionado 10 mL de lise. O tampão de lise consistiu em tampão Tris-HCl 50 mM, 1 mM de PMSF e 5 mM de EDTA, pH 8,6. Os tubos foram agitados em vortex até completa homogeneização e sonicados em banho de gelo. Após a sonicação, os tubos foram centrifugados a 10.000 g, por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante coletado foi nomeado como a fração solúvel. O pellet insolúvel foi lavado 3 vezes com 20 mL de água ultrapura e suspenso com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6.

Foram realizados testes de concentração de proteína, quantificação enzimática e a avaliação da eficiência da lise celular foi através da intensidade da banda, com 50 µg de proteína em SDS-Page corada com azul de Coomassie. As bandas foram analisadas conforme sua área, pelo software ImageJ® (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

4.5.2 Otimização das condições de cultivo

As variáveis consideradas para a realização de uma otimização do cultivo foram temperatura pós-indução (37 °C e 20 °C), tempo pós-indução (2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 20 h e 24 h, sendo o tempo zero o controle negativo) e concentração de IPTG (0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM). A DO_{600nm} para a indução foi de 0,9, totalizando 21 tubos por temperatura.

Em tubos cônicos de 50 mL, 10 mL de cultivo com absorvância de 0,1 (DO_{600nm}) foram cultivados em *shaker* a 200 rpm, a 37 °C. Ao atingir a DO_{600nm} de 0,9 (2 horas e meia de cultivo), os tubos foram induzidos com as diferentes concentrações. Para as amostras com temperatura de pós-indução de 20 °C, estas foram mantidas em *shaker* até o mesmo atingir 20 °C, e assim induzidas. Os tubos foram retirados após os tempos determinados, sendo centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 nas mesmas condições de centrifugação. O tampão foi descartado e em seguida foi realizada a lise celular, conforme descrito no tópico anterior, pelo método escolhido.

A resposta da melhor condição de cultivo foi analisada por análise da intensidade da banda de 50 µg de proteína SDS-Page corado com azul de Coomassie, através do software ImageJ® (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012), conforme método descrito por OHGANE; YOSHIOKA (2019).

4.6 ISOLAMENTO DOS CORPOS DE INCLUSÃO

Após a obtenção das frações insolúveis descritas em 4.5.2, as mesmas foram submetidas a lavagens para o isolamento dos corpos de inclusão. As frações insolúveis foram centrifugadas a 10.000 g, 10 minutos, 4 °C, e o sobrenadante descartado. Foram feitas 3 lavagens com tampão de isolamento de corpos de inclusão composto de Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 2%, NaCl 500 mM com pH ajustado a 8,6, em tubo previamente pesado. Após o descarte da última lavagem, os tubos contendo os CIs isolados foram pesados e subtraída a massa inicial dos tubos, obtendo-se assim a massa dos corpos de inclusão isolados.

4.7 TRIAGEM DA SOLUBILIZAÇÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO

O hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) foi utilizado como agente desnaturante em diferentes molaridades (de 1 molar a 4 molar) nos corpos de inclusão isolados descritos em 4.6 (UPADHYAY et al., 2014). O GdnHCl foi adicionado nas diferentes concentrações em tubos cônicos contendo 0,4 mL de fração insolúvel. O controle positivo foi com SDS a 2% e o controle negativo os corpos de inclusão purificados, em tampão de lise.

Os CIs isolados com GdnHCl foram agitados por 1 hora em *shaker* a 200 rpm a 25 °C, e agitados por 20 segundos em vórtex a cada 15 minutos. Após, foram centrifugados a 16.000 g por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi coletado para os seguintes ensaios. Adicionalmente, os pellets restantes das solubilizações com ureia foram submetidos à lavagem com tampão água destilada e solubilização com SDS 0,4%. Tanto os sobrenadantes quanto os pellets solubilizados com SDS 0,4% foram submetidos à ensaio de quantificação de proteína através do BCA Protein Assay Kit (Pierce®, Thermo-Fisher Scientific) e gel desnaturante.

Devido à incompatibilidade de GdnHCl no gel com SDS, para a eletroforese foi realizada uma precipitação com Metanol/Clorofórmio descrito por WESSEL; FLÜGGE (1984), para a remoção de GdnHCl. Quatro partes de metanol foram adicionados a uma parte do volume da fração solubilizada com GdnHCl, mais uma parte de clorofórmio e três partes de água destilada. Após centrifugação a 14.000 g, 4 °C e 3 minutos, houve o surgimento de duas fases. Os sobrenadantes foram coletados cuidadosamente e descartados, pois, a proteína se encontrava na interface. Após, foram adicionados novamente 4 volumes de metanol, centrifugado novamente, os sobrenadantes foram descartados e o resíduo de metanol foi seco ao ar. Ao final foi adicionado tampão de amostra contendo β -mercaptoetanol (5%) e as amostras aquecidas a 65 °C durante 10 minutos.

O efeito do GdnHCl na solubilização, tanto nos pellets quanto nos sobrenadantes, foi avaliado por intensidade das bandas em SDS-Page corado com azul de Coomassie e concentração de proteína.

4.8 REDOBRAMENTO

O redobramento da enzima foi realizado conforme Pierce™ Protein Refolding Kit (Pierce®, Thermo-Fisher Scientific).

Após a seleção da molaridade de GdnHCl, a fração insolúvel foi solubilizada com agitação a 200 rpm, a 4 °C, por 24 h. A fração solubilizada foi concentrada por ultrafiltração (10 kDa de *cut-off*). A partir daí, foi realizada uma matriz experimental primária para a seleção dos tampões que não promoveram agregação e que tiveram alta recuperação de proteína. Conforme as instruções do kit, a amostra solubilizada é diluída vinte vezes, resultando em concentrações finais entre 50 – 200 $\mu\text{g/mL}$ de

proteína por teste. A amostra foi adicionada de 10 μ L em 10 μ L até atingir a quantidade necessária para cada ensaio.

Tabela 12. Matrix primária para seleção de tampão de redobramento, bem como ambiente redox.

Tampão base de redobramento*	GdnHCl (M) Fator 1	L-Arginina (M) Fator 2	Fator 3**
1	0,2	0	1
2	0,2	0,44	2
3	0,2	0,88	3
4	0,7	0	1
5	0,7	0,44	2
6	0,7	0,88	3
7	1,3	0	1
8	1,3	0,44	2
9	1,3	0,88	3

* Cada tampão de redobramento contém, além da Guanidina e da L-Arginina, Tris 55 mM, NaCl 21 mM, KCl 0,88 mM, e EDTA 10 mM, com o pH ajustado em 8,2.

** A ser definido dentre os aditivos de redobramento.

Sendo que, os aditivos de redobramento incluem: ambiente redox (DTT e GSH:GSSG), cátions divalentes (CaCl_2 e MgCl_2) e PEG em diferentes concentrações.

4.8.1 Quantificação de proteína pelo método de Bradford

Devido a interação de alguns dos aditivos das matrizes interferirem no método de BCA, a quantificação de proteína nos ensaios de redobramento foi realizada por método de BRADFORD (1976).

O reagente de Bradford é composto por Coomassie Brilliant Blue G-250, etanol e ácido fosfórico. O ensaio se baseia na ligação do Coomassie Brilliant Blue G-250 às proteínas. Em condições ácidas, o corante é avermelhado, e está na sua forma catiônica duplamente protonado. Quando se liga à proteína, é convertido em uma forma estável azul, não protonada. O azul é formado do complexo proteína-corante, que é detectado no ensaio e a leitura é realizada com o comprimento de onda a 595 nm.

Como nos testes de redobrimento foram envolvidas a diluição dos CIs, este ensaio foi realizado a partir de uma curva de calibração com BSA com baixas concentrações: 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 25). Em triplicata, 150 μL de amostra ou branco e 150 μL de reagente foram adicionados à uma placa de 96 poços, conforme instruções do Pierce™ Bradford Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida foi realizada a leitura em leitora de microplaca a 595 nm (Perkin Elmer EnSpire 2300 MultiMode Microplate Reader, PerkinElmer, Inc., CT, EUA).

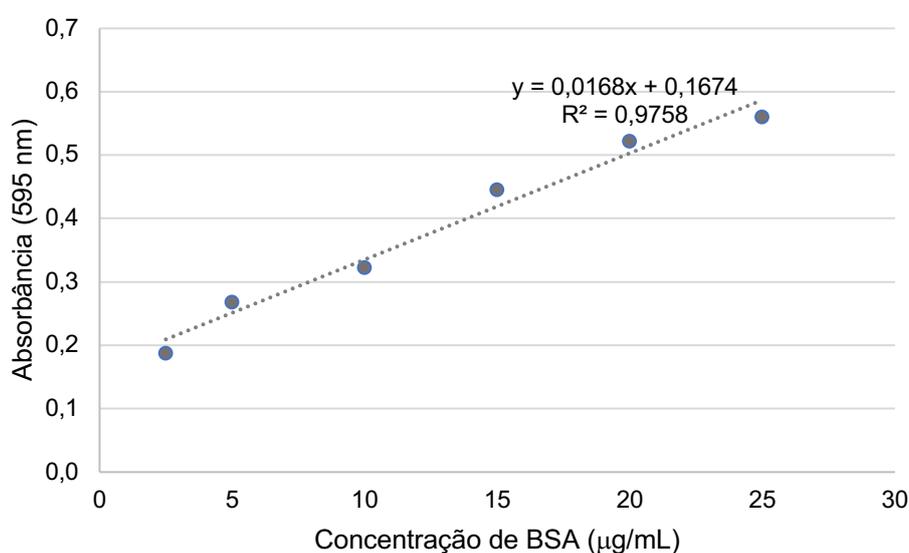


Figura 25. Curva padrão de albumina versus absorvância de (595 nm).

4.8.1 Eletroforese em gel nativo de poliácridamida (8%)

Para a avaliação do redobrimento da L-ASNase, foi realizada eletroforese de gel de poliácridamida nativo, sem a presença de SDS, em todas as etapas do redobrimento.

O gel de separação foi preparado com Tris-HCl 1 M pH 8,8, 8% de acrilamida/bis-acrilamida (29,2/0,8%), 0,1% de PSA, 0,2% de TEMED. O gel empacotador foi preparado com Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, 3% de acrilamida/bis-acrilamida (29,2/0,8%), 0,15% de PSA, 0,3% de TEMED. As amostras foram suspensas em 20 μL de tampão Laemmli sem SDS (Tris-HCl 0,125 M; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,004%; 2-mercaptoetanol 10%) e aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970).

Como marcador, foi utilizada albumina (Sigma-Aldrich®), com massa molecular de aproximadamente 132 kDa. O gel foi corado com nitrato de prata, conforme descrito por BLUM; BEIER; GROSS (1987) com o corante PlusOne Silver Staining Kit™ (GE Healthcare, IL, EUA).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios realizados em triplicata tiveram suas médias submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, e as médias apresentaram distribuição normal. Para a comparação entre médias foi realizada análise de variância (ANOVA). Em caso de $p < 0,05$, os dados foram submetidos a pós-teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com software RStudio (RSTUDIO TEAM, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene da L-ASNasePS foi sequenciado por FREITAS et al. (2022). A partir dos genomas completos das espécies *Penicillium citrinum* DSM1997, *Penicillium citrinum* JCM22607 e *Penicillium steckii* MLKD01000003 (espécies genealogicamente próximas à espécie *P. sizovae*), a sequência do gene da L-ASNase destas estirpes foi identificada na base de dados GenBank por homologia a outras sequências do gene da L-ASNase já descritas em outras espécies de fungos.

A sequência predita de nucleotídeos da L-ASNase de *P. sizovae* nativa construída e traduzida em sequências de aminoácidos foi identificada conforme Figura 26.

MVSIKSFLVALATFACQSSASPLLYGRGTNGTGFVFTNANGLNFTQMNHTLPNITIFA
 TGGTIAGSDSSSTATTTGYTSGAVGVRLIDAVPSMLDIANVAGVQTANVGSEDTSDI
 LISLSKQINKFVCDDPTMAGAVVTHGTDLEETAFFLDATINCGKPVIIVGAMRPSTAI
 SADGPFNLLESVTVAASPKAKNRGAMIVMNDRIASAYTTTKTNANTMDTFKAMEMG
 YLGEMISNTPFFFYPPVQPTGKKDFNIANVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNAIESGA
 KGIVIAGAGAGGVTTTSFNAYAIEDAINRLGIPIIQSMRTVNGEVPLSDVESTSATHIASG
 YLNPQKSRILLGLLLAKSSNITEIASTFSLNTNA

Figura 26. Sequência predita de aminoácidos do gene da L-asparaginase nativa de *P. sizovae*.

Para a clonagem em *E. coli* BL21(DE3), foi retirado o peptídeo sinal (sublinhado na Figura 26) e acrescentado códon de parada da tradução (Figura 26). Os sítios de restrição foram NdeI/XhoI. A computação do *pI* teórico da L-asparaginase nativa de *P. sizovae* é de 4,93, sua massa molecular teórica de um monômero é de 40073,46 Da, 362 aminoácidos, não possui pontes dissulfeto e triptofano (SIB, 2022). Já o peso molecular do monômero da enzima heteróloga é de 41134,36 Da, tendo o peso molecular total de 164537,44 Da e *pI* teórico de 5,98.

5.1 CONFIRMAÇÃO DA CLONAGEM E TRIAGEM DOS CLONES

A partir de cultivos realizados conforme manual do vetor pET, foi possível observar nos resultados da PCR a inserção do gene da L-ASNasePS em todos os 10

clones, exceto no clone 7, devido a presença da banda na região de 6 Kpb, o tamanho do plasmídeo contendo a L-ASNasePS (Figura 27).

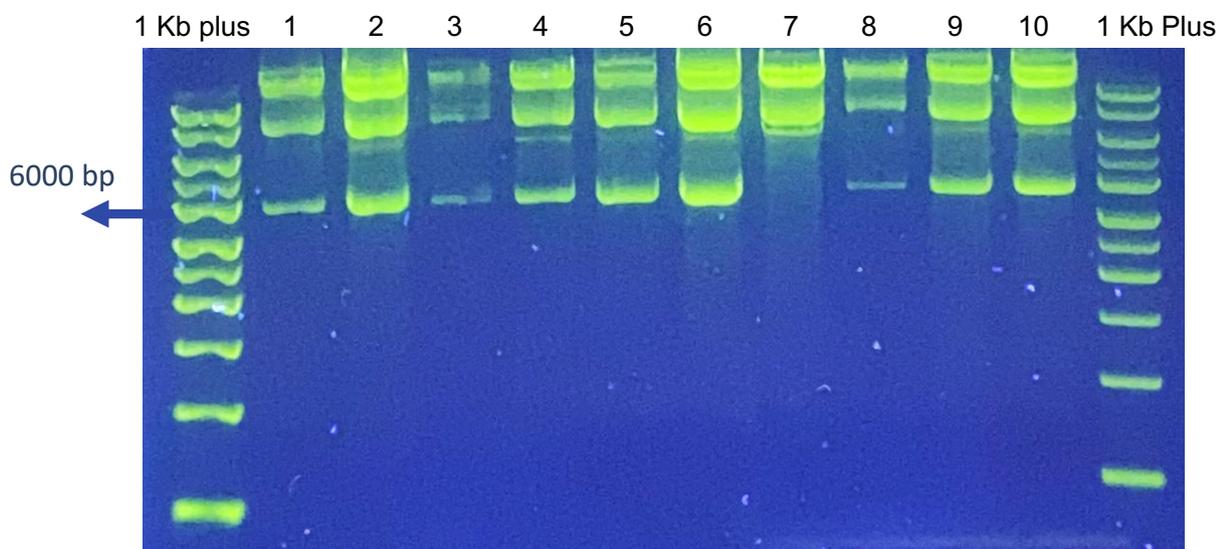


Figura 27. Gel de agarose 0,8% (m/v) da amplificação dos genes dos 10 clones selecionados aleatoriamente.

A partir da confirmação da inserção do plasmídeo, foi realizado SDS-PAGE das frações solúveis e insolúveis dos 10 clones, bem como do controle negativo (construção de *E. coli* BL21(DE3) contendo vetor pET28a vazio). Foram observadas bandas de alta intensidade de aproximadamente 40 – 44 kDa nas frações insolúveis de todos os clones (Figura 28). Apenas na fração solúvel do clone 10 foi observada a presença de uma banda com média intensidade próximo a 45 kDa, indicando a expressão solúvel da proteína (Figura 28C).

Também foram realizados ensaios de AHA e não se obteve atividade enzimática em nenhuma fração, tanto solúvel quanto insolúvel. Estes resultados são indicativos da presença de corpos de inclusão clássicos, que não possuem atividade enzimática (HANNIG; MAKRIDES, 1998).

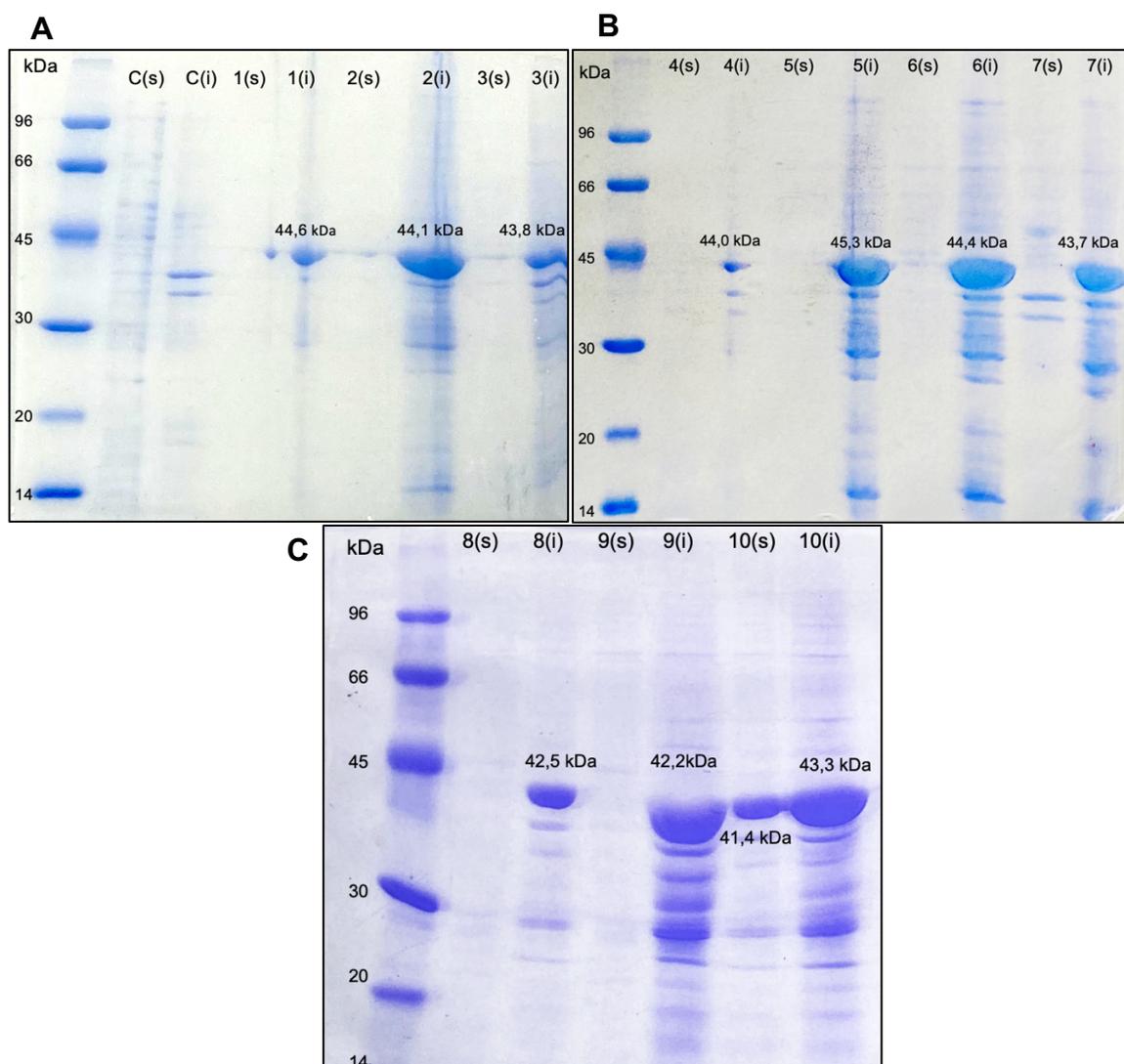


Figura 28. Análise da expressão do gene L-ASNasePS em *E. coli* BL21(DE3) com 0,5 mM de IPTG e 19 h de expressão em gel desnaturante de poliacrilamida a 12% (m/v) com corante azul de Coomassie. C: controle negativo (*E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pet28a vazio); (s): fração solúvel; (i) fração insolúvel; 1-10: clones.

Devido a presença da cauda de histidina (6xHis-tag), e para a confirmação de que a enzima foi expressa, foi realizado Western Blot com anticorpo anti His-tag. Foram selecionados três clones com as bandas de maior intensidade para este ensaio (clones 2, 6 e 9). As bandas identificadas estão presentes nas regiões que correspondem a aproximadamente 45 kDa e novamente nas frações insolúveis (Figura 29).

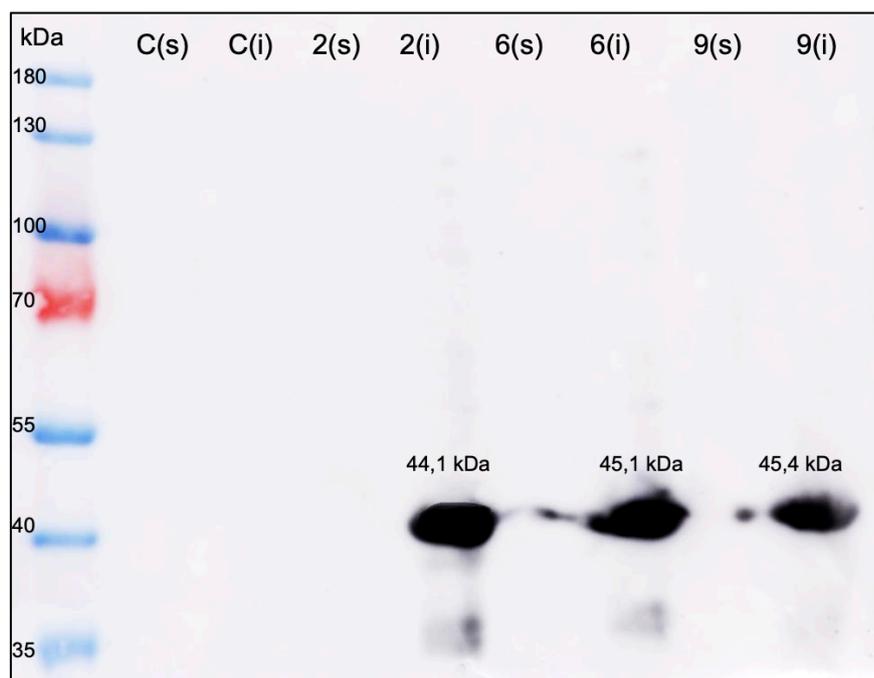


Figura 29. Análise da expressão do gene L-ASNasePS em *E. coli* BL21(DE3) por Western-Blot com o uso de anticorpo anti His-tag. (s): fração solúvel; (i): fração insolúvel; C: controle negativo; 2, 6 e 9: clones 2, 6 e 9, respectivamente.

Através dos resultados de cálculo da área das bandas (Figura 30) foi possível observar que a banda de maior intensidade estava presente no clone 2, indicando maior concentração de L-ASNase. Neste sentido, o clone escolhido para dar seguimento aos experimentos foi o clone 2.

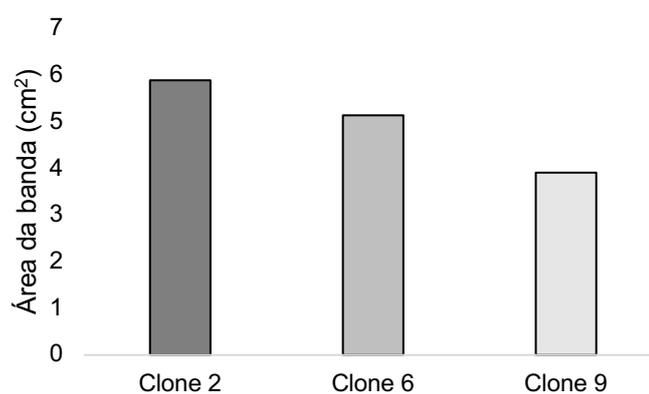


Figura 30. Área das bandas detectadas pelo anticorpo anti-his tag por Western Blot calculadas pelo software ImageJ®.

5.2 MEDIDAS DE CRESCIMENTO E PARÂMETROS PARA A TRIAGEM DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Microrganismos apresentam quatro fases durante seu crescimento celular: 1) fase lag (ou fase de adaptação); 2) fase exponencial ou logarítmica (log), quando ocorre a divisão celular em velocidade constante devido às concentrações não limitantes de carbono; 3) fase estacionária, quando as velocidade de divisão e de morte celular são semelhantes, devido o esgotamento do condições para crescimento; e 4) fase de morte, quando ocorre o total esgotamento de nutrientes e níveis tóxicos de detritos celulares (MOULTON, 2014).

A curva de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) contendo L-ASNasePS demonstrou que a partir de 6 h de cultivo, a DO_{600nm} já se encontra acima de 1,5, indicando alta densidade celular (Figura 31). Resultados com tempos e absorbâncias semelhantes foram obtidos por MARINESCU et al. (2018).

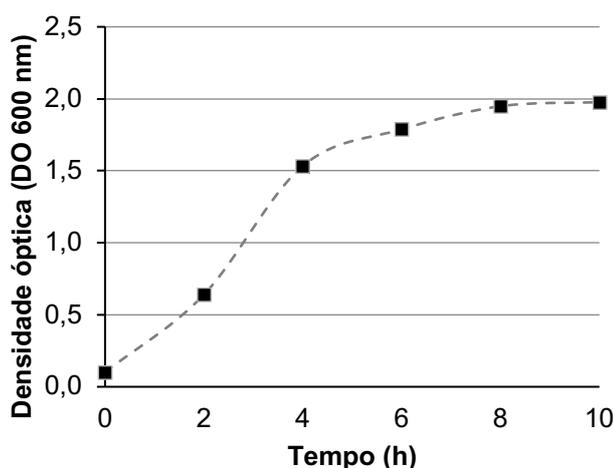


Figura 31. Curva de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) com o gene L-ASNasePS a 37 ° em tempo (h) versus densidade óptica (600 nm).

Um parâmetro pouco discutido em sistemas de expressão heteróloga é a densidade óptica para a indução (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Usualmente, a indução de proteínas ocorre em DO de 0,6 – 0,8 (301). Quando o crescimento celular estiver no seu máximo, a alta densidade celular pode afetar a expressão de proteínas. Além disso, uma expressão em uma alta densidade celular pode aumentar o estresse celular, a filamentação celular e até interromper o crescimento microbiano (CHOI; KEUM; LEE, 2006). O mid-log é considerado um bom momento para a indução porque

a translação de proteínas e o crescimento celular estão em seu máximo (HAYAT et al., 2018; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Entretanto, algumas evidências apontam para o final da fase log/início da fase estacionária como melhores momentos para indução. OU et al., (2004) demonstraram que na indução durante a privação de carbono, as células de *E. coli* BL21 (DE3) possuem alta capacidade de adaptação e alta expressão celular nesta fase, além de aumentar a expressão de proteínas solúveis (OU et al., 2004). A maior expressão de proteína na fração solúvel pode ser explicada devido a um crescimento celular reduzido, com uma redução na síntese proteica, gerando assim menor formação de CIs (GALLOWAY; SOWDEN; SMITH, 2018).

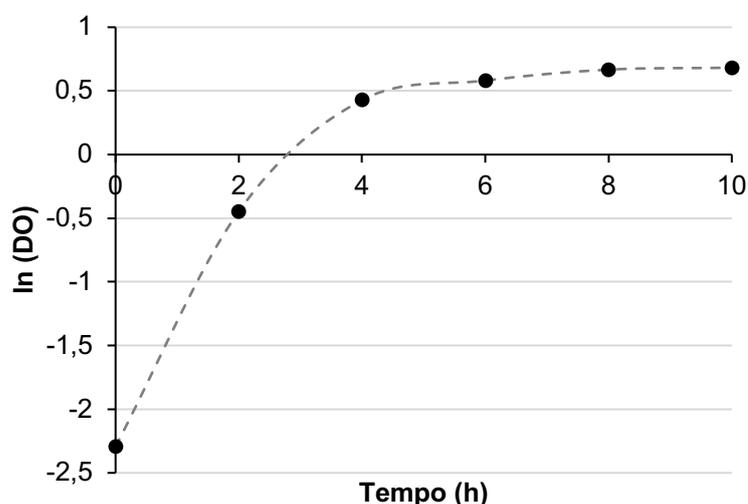


Figura 32. Curva logarítmica em $\ln(\text{DO})$ do crescimento de *E. coli* BL21(DE3) com o gene L-ASNasePS a 37 ° versus tempo (h).

A partir do gráfico em escala logarítmica (Figura 32), é possível verificar que a fase lag/log ocorreu do tempo 0 h ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,1$) ao tempo de 4 h ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,5$), e a fase estacionária a partir de 4 h. A partir destes dados, estipulou-se que $\text{DO}_{600\text{nm}}$ da fase mid-log foi de 0,4 de absorbância, o que corresponde a 0,45 g/L de células, através do cálculo de peso seco x DO. Considerando que esta ainda é uma concentração celular baixa, foi então utilizada uma densidade óptica correspondente a 80% da fase exponencial, equivalente a uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,9, tempo de 2 h 30 min e uma concentração celular de aproximadamente 1 g/L.

Outros parâmetros cruciais para a expressão proteica são concentração de indutor, tempo pós-indução e temperatura de indução (HANNIG; MAKRIDES, 1998;

HAYAT et al., 2018; ROSANO; CECCARELLI, 2014). A concentração de indutor é um fator crucial para a expressão de proteínas em sistemas heterólogos. Baixas concentrações de indutor podem ser insuficientes para a expressão de proteínas, e por outro lado, altas concentrações podem gerar altos custos de produção além de causar toxicidade nas células, impedindo a expressão. Baixas concentrações de indutor também estão relacionadas a uma maior expressão de proteínas na forma solúvel (HAYAT et al., 2018). As concentrações usuais de IPTG em expressão heteróloga de L-ASNase variam entre 0,1 – 1 mM (EISELE et al., 2011; HUANG et al., 2014; SAEED et al., 2018; ZHANG et al., 2021). Neste sentido, foram consideradas as concentrações de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM para a triagem (Tabela 13).

Tabela 13. Planejamento experimental da triagem, considerando diferentes concentrações de indutor (IPTG) e tempos pós-indução na densidade óptica (DO) de 600 nm.

DO _{600nm}	Concentração final de IPTG (mM)	Tempo pós-indução (h)
0,9	0,1	0
		2
		4
		8
		12
		20
		24
		0,5
	2	
	4	
	8	
	12	
	20	
	24	
	1	
		2
		4
		8
		12
		20
		24

O tempo pós-indução é um dos fatores mais importantes para a expressão e solubilidade da proteína. Menores tempos de indução reduzem a síntese proteica, consequentemente prevenindo a formação de CIs (HAYAT et al., 2018). Na literatura encontram-se uma variedade de tempos pós-indução em sistemas de expressão de L-ASNase em *E. coli*, variando de 3 h a 24 h, em escala laboratorial (DUMINA et al., 2021; EISELE et al., 2011; HUANG et al., 2014; SAEED et al., 2018; SINGH et al., 2020; UPADHYAY et al., 2014). É sabido que maiores tempos pós-indução aumentam a expressão proteica, mas também aumentam as chances de formação de CIs, além de afetar a estabilidade proteica e induzir proteólise, reduzindo assim o rendimento da proteína recombinante (TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006). Além disso, cada enzima possui seu próprio padrão de expressão, portanto, para este estudo foram considerados os tempos 0 h (controle negativo), 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 20 h e 24 h pós-indução (Tabela 13).

A temperatura pós-indução é outro fator importante para a expressão de proteínas em sistemas heterólogos. Altas temperaturas tendem a promover uma maior agregação das proteínas, formando corpos de inclusão. Por outro lado, baixas temperaturas podem resultar em um baixo rendimento de expressão (HAYAT et al., 2018). Singh e colaboradores testaram diferentes temperaturas pós-indução de uma L-ASNase II expressa em sistema de *E. coli* BL21(DE3) e observaram que mesmo em baixas temperaturas (20 °C) há uma maior expressão de proteínas na forma de corpos de inclusão do que na fração solúvel, indicando um possível padrão de agregação da proteína (SINGH et al., 2020). SAEED et al. (2018) também observaram uma maior presença de corpos de inclusão (cerca de 60%) na expressão de uma L-ASNase fúngica em *E. coli* BL21(DE3) mesmo com uma temperatura de 22 °C. Desta forma, o planejamento experimental (Tabela 13) foi executado para as temperaturas pós-indução de 20 °C e 37 °C, com a finalidade de verificar qual das duas promove uma maior expressão de L-ASNasePS.

5.2.1 Métodos de sonicação

Antes da execução do experimento testando diferentes condições de expressão da L-ASNasePS em *E. coli*, alguns métodos de sonicação foram testados, uma vez que a L-ASNase II se encontra no espaço periplasmático.

A sonicação é um método custo-efetivo e conveniente para lisar pequenas quantidades de biomassa celular (até 20g) (DOPP; REUEL, 2018; SHRESTHA; HOLLAND; BUNDY, 2012). Este método utiliza a oscilação de ondas ultrassônicas para lisar a membrana celular por cavitação. Um transdutor (ponteira) é inserido num recipiente contendo a biomassa celular, levando a ondas de pressão que criam bolhas. As ondas resultantes do colapso das bolhas são suficientes para romper a membrana celular (ISLAM; ARYASOMAYAJULA; SELVAGANAPATHY, 2017). Além disso, o colapso das bolhas promove um aumento local de temperatura e pressão, o que pode causar danos às enzimas que ali estão sendo liberadas (FERDOUS; DOPP; REUEL, 2021; WANG; YUAN; HALE, 2016). Desta forma, cinco métodos de sonicação foram testados para verificar possíveis diferenças de expressão enzimática por intensidade de bandas de SDS-PAGE a partir de um cultivo a 37 °C de *E. coli* BL21(DE3) com o gene L-ASNasePS induzido com uma DO de 1, 0,5 mM de IPTG e tempo pós-indução de 18 h e agitação de 200 rpm (Figura 33).

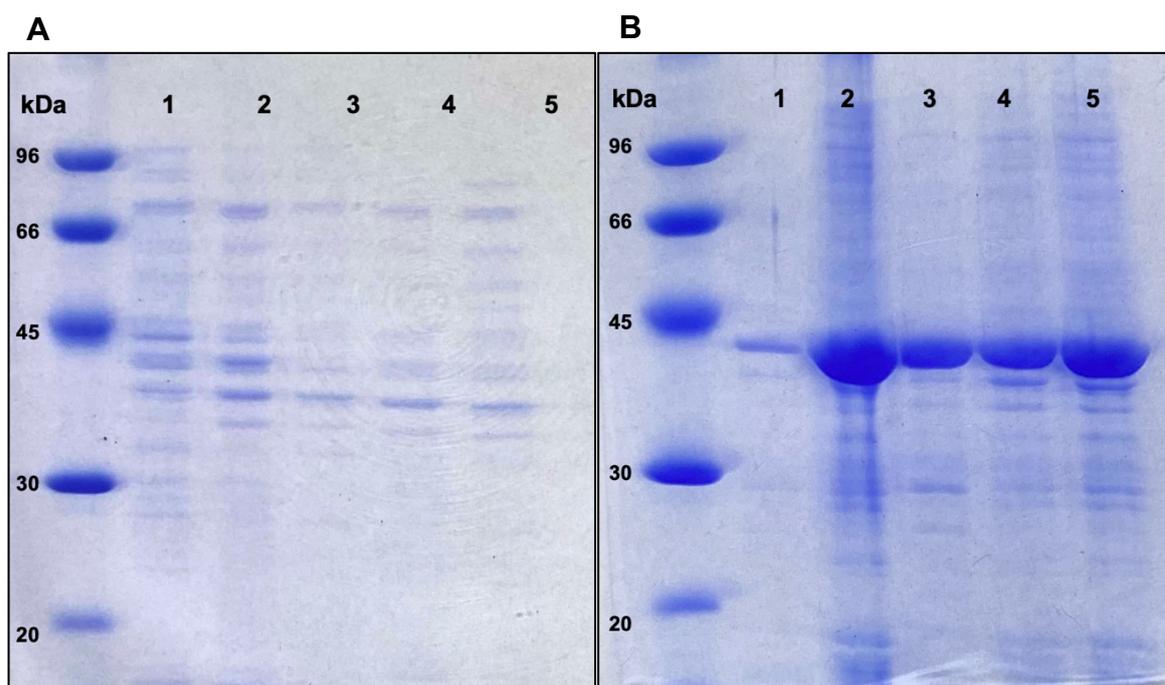


Figura 33. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie referente aos diferentes métodos de sonicação testados. **A:** fração solúvel; **B:** fração insolúvel. 1: 7 ciclos, 30 seg ON e 45 seg OFF, amp 30%; 2: 10 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 3: 20 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 4: 10 ciclos. 1 ciclo: 1 segundo ON e 1 segundo OFF, seguido de 1 minuto de espera, amp 30%; 5: 15 ciclos, 1 seg ON e 1 seg OFF, amp 30%.

A partir da observação dos géis de poliacrilamida, é possível observar que não houve expressão na fração solúvel, ou expressões baixas em comparação às frações insolúveis (Figura 33A e B). Nas frações insolúveis (Figura 33B), é evidente a presença de bandas nas regiões próximas a 45 kDa. Os métodos de sonicação que apresentaram maior expressão foram 2, e 5, o que pode ser confirmado pelo cálculo da área das bandas expresso na Figura 34. O método 2 inclui 10 ciclos de 1 minuto ON e 1 minuto OFF, o que pode favorecer ao não aquecimento da ponteira do sonicador, reduzindo degradação da proteína. Quando este tempo é aumentado para 20 ciclos (método 3), ocorre uma redução na presença de proteínas, indicando uma perda durante o processo de sonicação, possivelmente devido ao tempo ser mais prolongado. O método 1 apesar de ser curto, apresenta a menor banda, podendo ser um indicativo de que 7 ciclos não sejam suficientes para o rompimento celular.

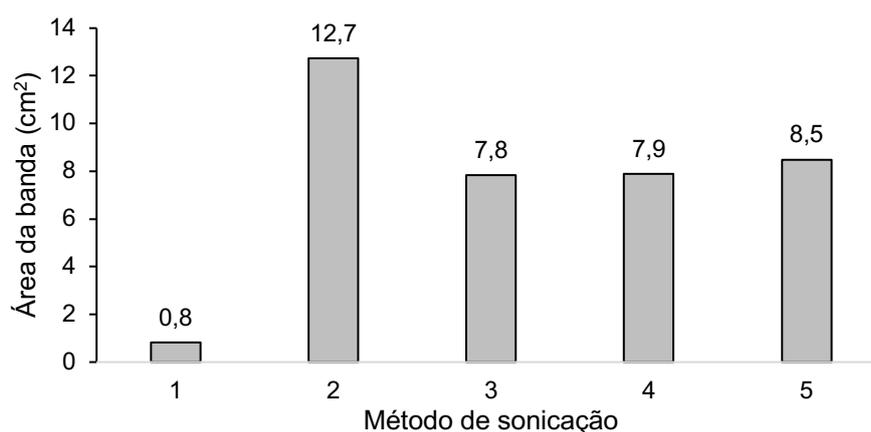


Figura 34. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações insolúveis dos testes de sonicação. 1: ciclos, 30 seg ON e 45 seg OFF, amp 30%; 2: 10 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 3: 20 ciclos, 1 min ON e 1 min OFF, amp 30%; 4: 10 ciclos. 1 ciclo: 1 segundo ON e 1 segundo OFF, seguido de 1 minuto de espera, amp 30%; 5: 15 ciclos, 1 seg ON e 1 seg OFF, amp 30%.

5.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

5.3.1 Cultivos a 37 °C

5.3.1.1 Frações solúveis

Em relação aos cultivos a 37 °C, é possível observar pelos géis desnaturantes que não houve expressão nas frações solúveis na maioria das frações, além da

ausência de atividade de L-ASNase pelo ensaio de β -hidroxamato aspártico em todas as frações (Figura 36). É possível observar apenas a banda de L-ASNase endógena, próxima a 45 kDa, presente também no tempo 0 h (Figura 35).

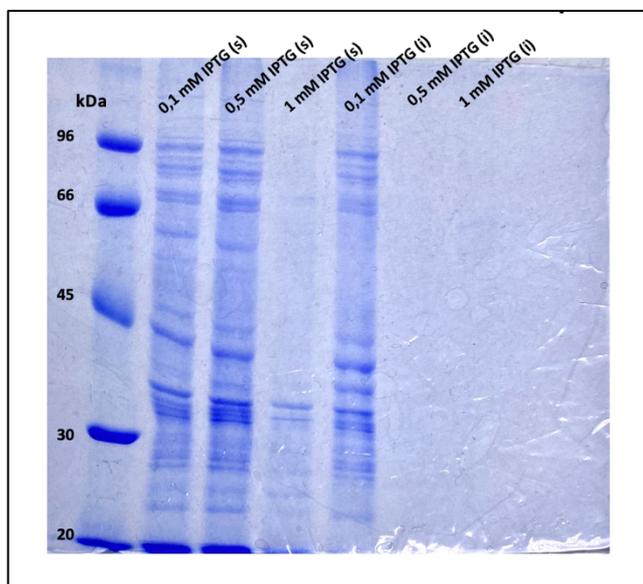


Figura 35. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie do tempo zero da triagem a 37 °C. (s): frações solúveis; (i): frações insolúveis.

5.3.1.2 Frações insolúveis

Já para as frações insolúveis, é possível observar bandas de grande intensidade na região de 45 kDa em todas as condições (Figura 37). As menores intensidades de bandas são observadas em 20 horas pós-indução com 1 mM de IPTG, e 24 h pós-indução com 0,1 e 1 mM de IPTG (Figura 38). Isto pode ser ao fato de que após longos períodos de indução pode ocorrer instabilidade celular e proteólise (TOLIA; JOSHUA-TOR, 2006).

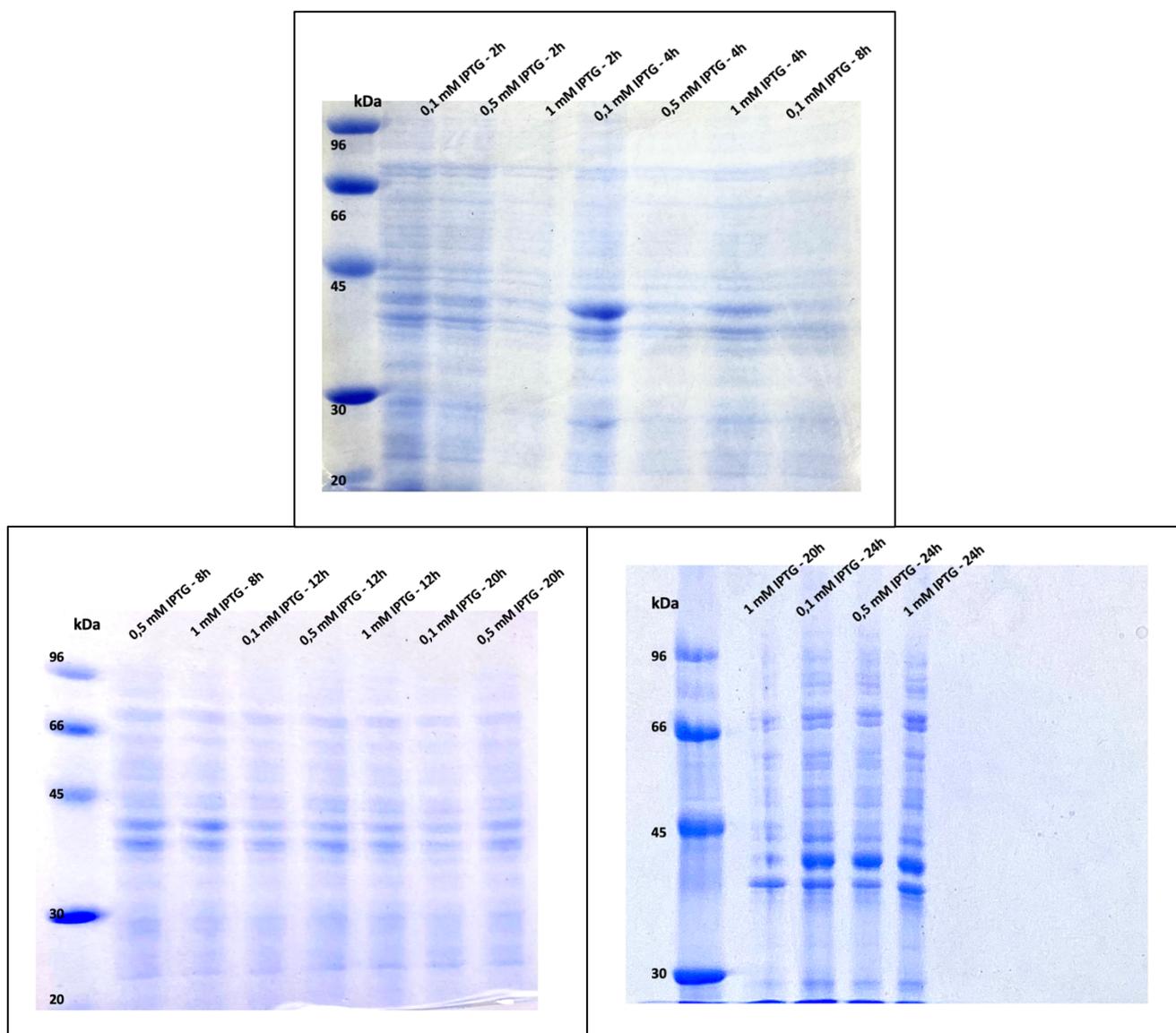


Figura 36. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações solúveis cultivadas a 37 °C.

Para a seleção de três condições de cultivo, foram considerados área da banda, concentração de proteína, concentração de IPTG e tempo pós-indução. Áreas de bandas maiores com concentrações de proteína menores indicam uma maior concentração de L-ASNase por proteína, indicando maior atividade específica estimada (Figura 40). Em contrapartida, longos tempos pós-indução são indesejáveis para a indústria, pois tendem a diminuir o rendimento. Concentrações menores de IPTG são desejáveis pelo fato de reduzir a toxicidade e baixo custo para grandes cultivos.

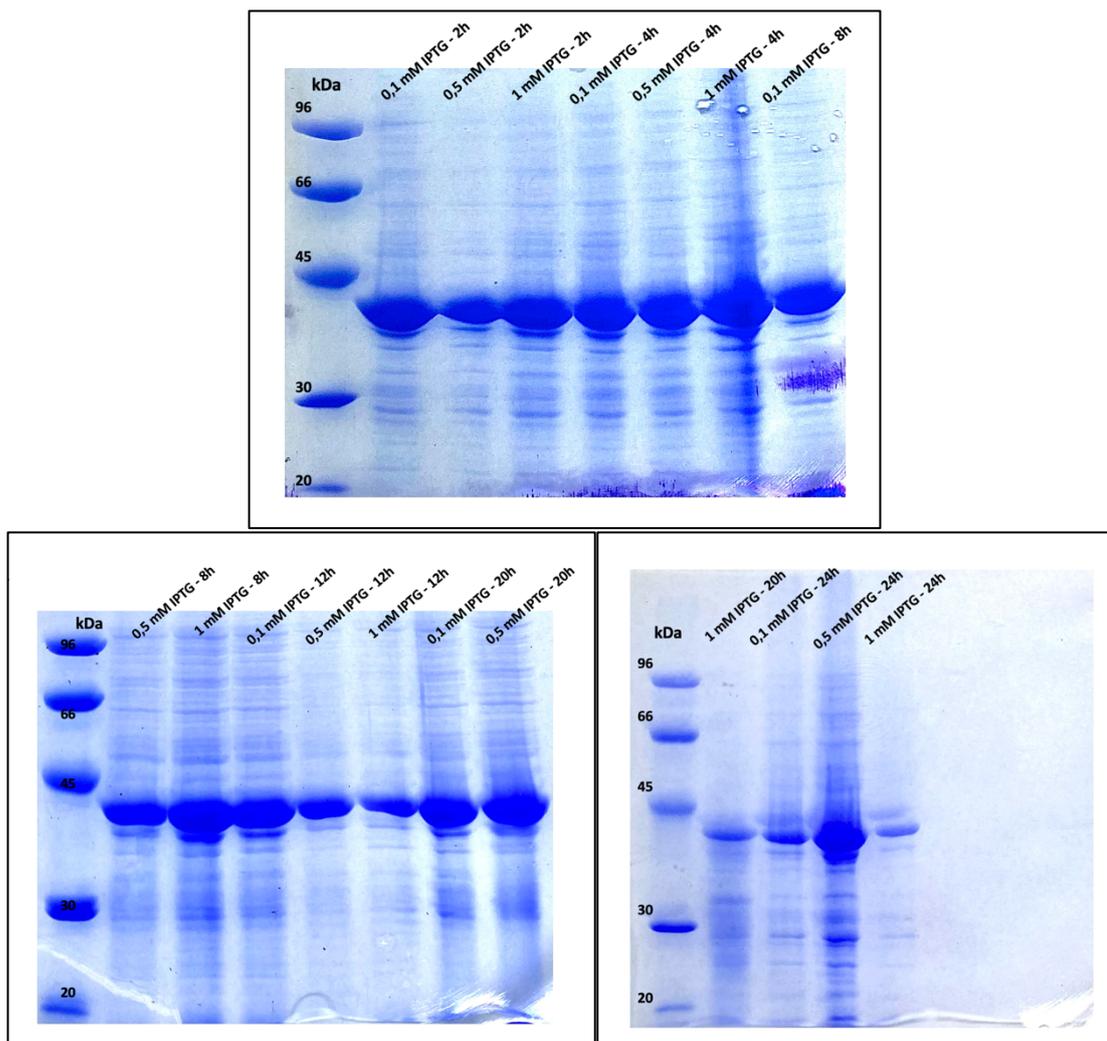


Figura 37. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações insolúveis dos cultivos da triagem a 37 °C.

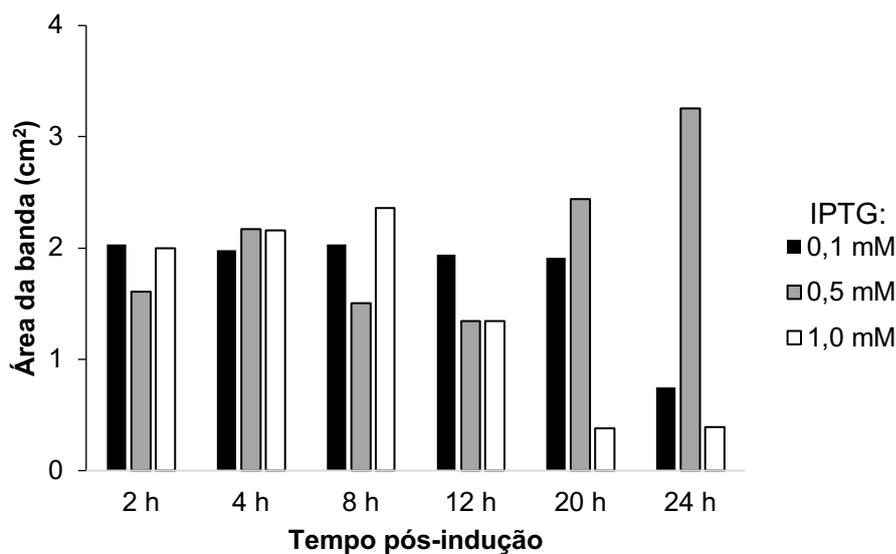


Figura 38. Área das bandas (cm^2) próximas a 45 kDa das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 37 °C calculadas pelo software ImageJ®.

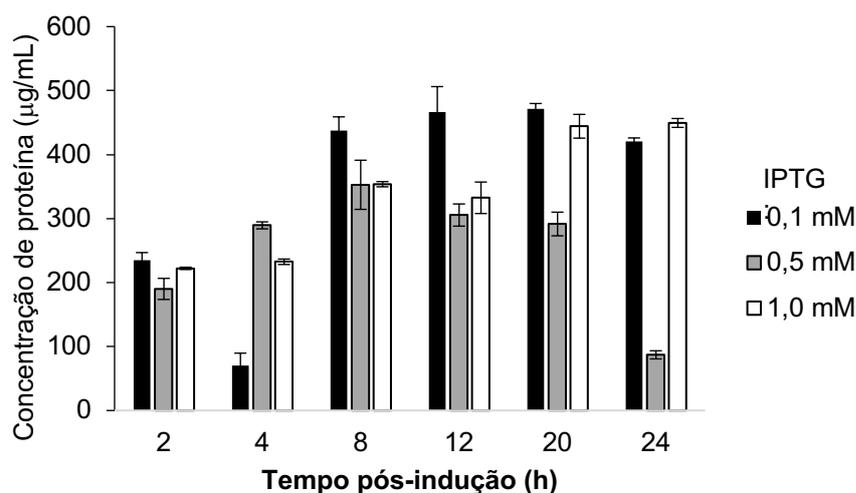


Figura 39. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) das frações insolúveis da triagem a 37 °C.

Considerando intensidade da banda em gel desnaturante (Figura 38), baixa concentração de IPTG e baixo tempo de cultivo, a condição 0,1 mM de IPTG com 2 h de tempo pós-indução foi escolhida, apesar da sua concentração de proteína estar entre os mais baixos (234,9 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 39). A condição 1 mM de IPTG a 4 h pós-indução também foi escolhida por possuir o menor concentração de proteína entre os outros cultivos com 1 mM de IPTG (232,5 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 39), além de apresentar alta intensidade da banda de SDS-PAGE e baixo tempo de cultivo (Figura 38). A condição

0,5 mM de IPTG a 24 h de tempo pós-indução foi escolhida porque apesar de apresentar um longo período de pós-indução, possui uma concentração média de IPTG e apresentou uma das menores concentrações de proteína (87,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 39).

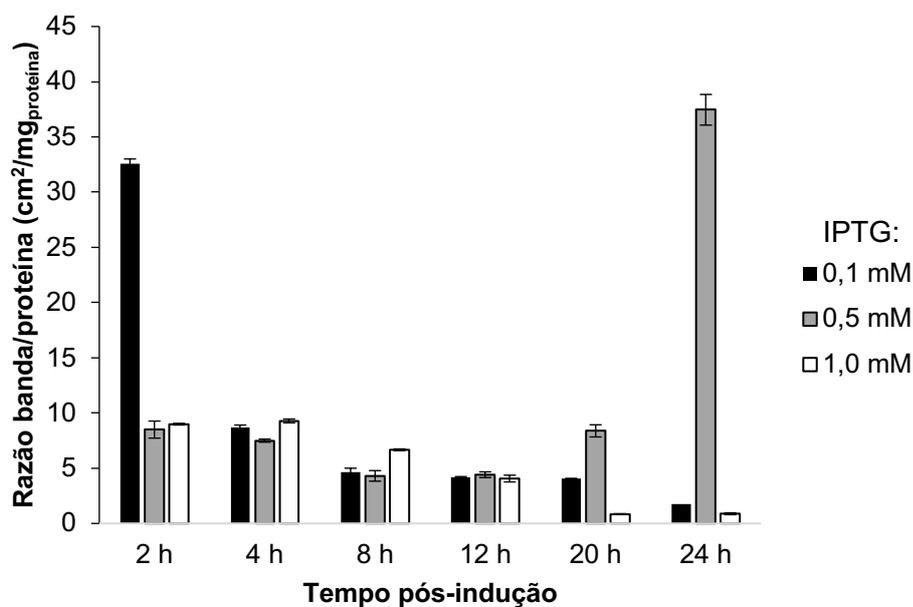


Figura 40. Cálculo da razão entre a área da banda sobre a concentração de proteína das frações insolúveis dos cultivos a 37°C.

As condições escolhidas foram submetidas a ensaio enzimático e teste de solubilização, com resultados descritos no tópico 5.4.

5.3.2 Cultivos a 20 °C

5.3.2.1 Frações solúveis

Ao contrário do ocorrido com os cultivos a 37 °C e como esperado com base na literatura, através da análise da expressão da proteína por SDS-PAGE é possível observar a presença de bandas próximas a 45 kDa nas frações solúveis dos cultivos induzidos a 20 °C (Figura 41).

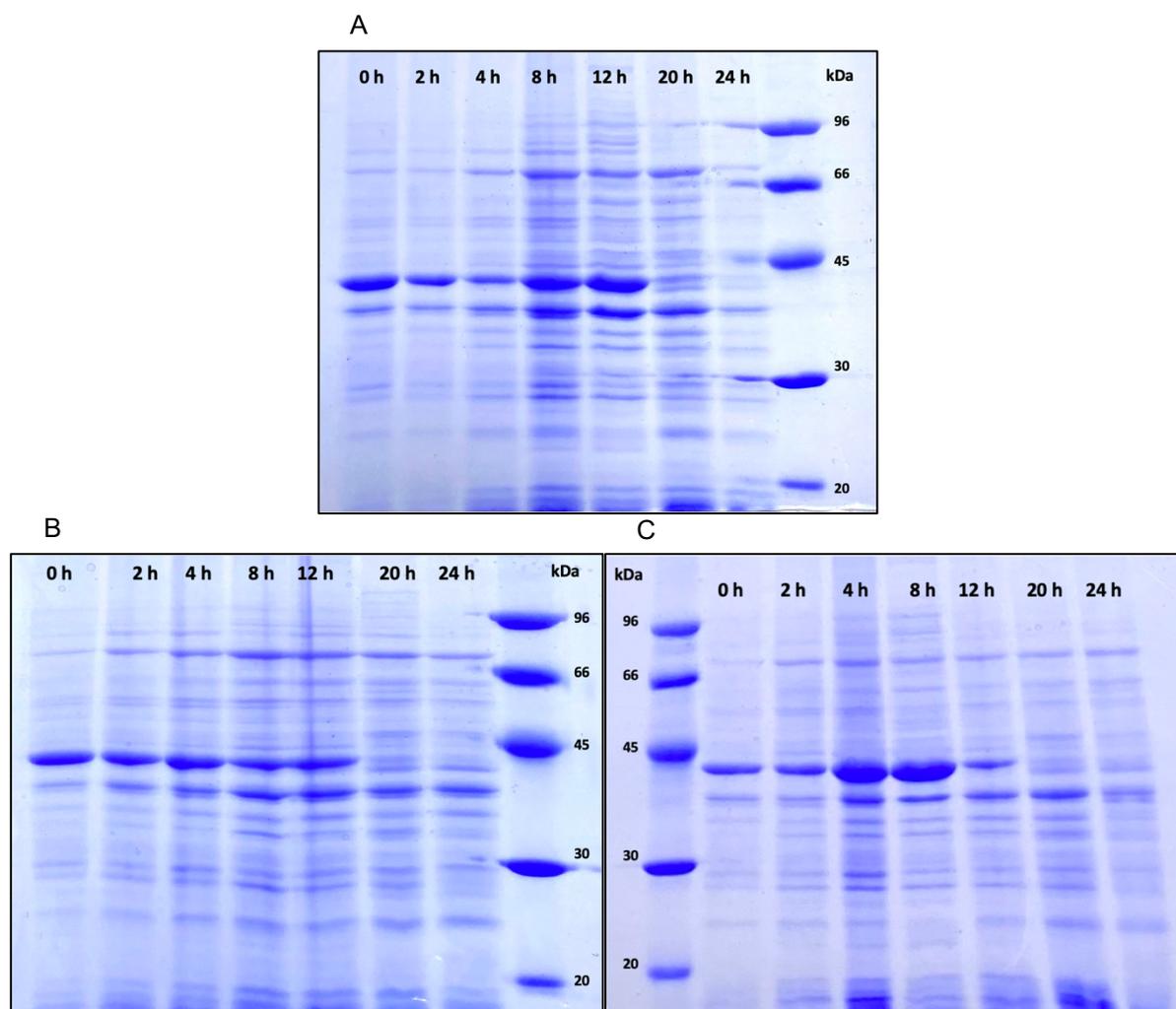


Figura 41. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações solúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C. A: 0,1 mM de IPTG; B: 0,5 mM de IPTG; C: 1 mM de IPTG.

Um fato a ser observado é que nesta temperatura também há um indicativo de produção de L-ASNase endógena da *E. coli* BL21 (DE3), visto que no tempo 0 h as bandas apresentaram áreas semelhantes de outros pontos de pós indução (Figura 41 e Figura 42).

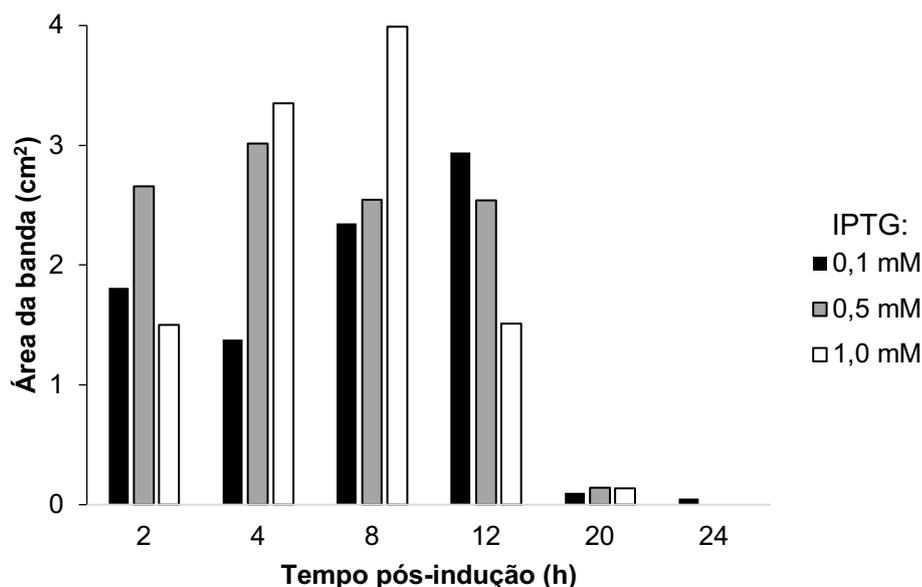


Figura 42. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações solúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C calculadas pelo software ImageJ®.

A partir da análise das áreas, a condição de cultivo com a concentração de 0,1 mM de IPTG com o tempo de indução de 12 h apresentou a maior banda. Os cultivos de 20 h de 0,5 mM e 1 mM e de 24 h não apresentaram bandas, o que possivelmente indica que a expressão foi em forma de CIs (Figura 42). Como o metabolismo celular é mais lento a 20 °C, apenas em tempos mais prolongados houve uma maior expressão enzimática e conseqüentemente agregação para a fração insolúvel.

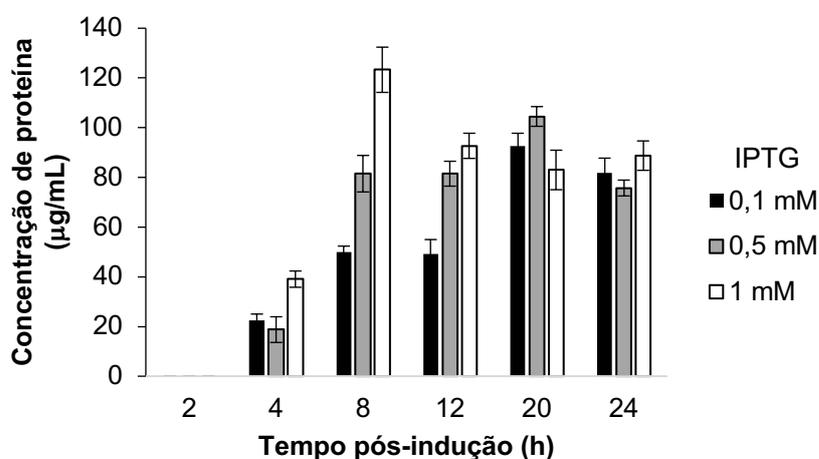


Figura 43. Concentração de proteína (µg/mL) das frações solúveis da triagem a 20 °C.

Analisando a concentração de proteína, é possível identificar que com uma concentração de IPTG de 1 mM há um pico com um tempo de pós-indução de 8 h. Os cultivos dos pontos 20 h e 24 h apresentam concentrações semelhantes entre si, do ponto 2 h não apresentou proteínas e do ponto de 4 h apresentou concentrações baixas.

A condição de 0,1 mM de IPTG com o tempo de pós-indução de 2 h foi escolhida devido a baixa concentração de IPTG, curto tempo pós indução e intensidade da banda (Figura 41A). Também foram escolhidos os cultivos com as concentrações de 0,5 mM e 1 mM de IPTG no ponto de 4 h. Estas condições apresentaram bandas intensas no SDS-PAGE (Figura 41B e Figura 41C, respectivamente) e baixas concentrações de proteína (Figura 43). Estas condições foram escolhidas para serem submetidas a ensaio enzimático.

No entanto, vale ressaltar que somente após 4 horas de indução de 0,1 mM e de 1 mM IPTG pôde ser observado um aumento na intensidade das bandas próximas a 45 kDa (Figura 41A e Figura 41C). Isso pode ser um indicativo da presença da L-ASNase constitutiva da *E. coli*, que pode tanto ser a L-ASNase I quanto a L-ASNase II (IZADPANA QESHMI et al., 2022).

5.3.2.2 Frações insolúveis

Analisando a expressão das frações insolúveis dos cultivos induzidos a 20 °C em gel desnaturante (Figura 44), fica evidente que a expressão de L-ASNase em forma de corpos de inclusão nesta temperatura ocorre a partir de maiores tempos pós-indução. Nas concentrações de 0,1 mM (Figura 44A) e 0,5 mM (Figura 44B) é possível identificar, pela intensidade das bandas, que a partir de 12 h inicia-se a formação de CIs. Na concentração de 1 mM de IPTG, observa-se poucas bandas, sendo a maior no ponto de 20 h (Figura 44C).

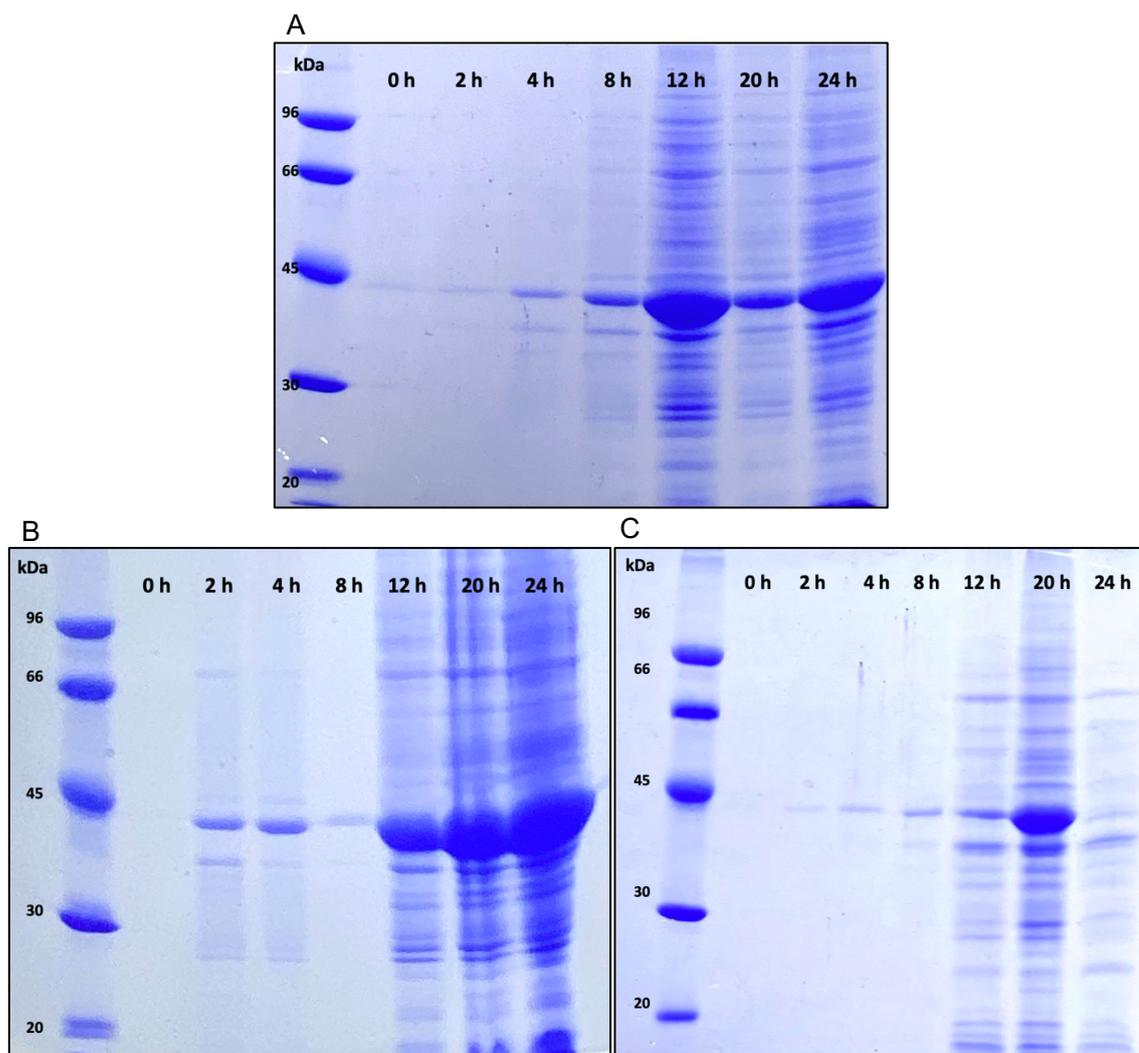


Figura 44. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C. A: 0,1 mM de IPTG; B: 0,5 mM de IPTG; C: 1 mM de IPTG.

A análise do cálculo das áreas das bandas (Figura 45), reforça o aumento da intensidade das bandas ao longo do tempo, indicando que na indução a 20 °C há expressão de L-ASNase em forma de corpos de inclusão após maiores períodos de indução devido o metabolismo celular desacelerado. Isto também foi observado nos géis das frações solúveis, os quais apresentavam maiores bandas nos menores tempos pós-indução (Figura 41). No geral, todos os pontos da concentração de 1 mM apresentaram áreas menores que os outros pontos, sugerindo que a 20 °C, esta concentração possa ser tóxica para a expressão de L-ASNase, visto que também não houve bandas expressivas nas concentrações de 1 mM nas frações solúveis (Figura 42).

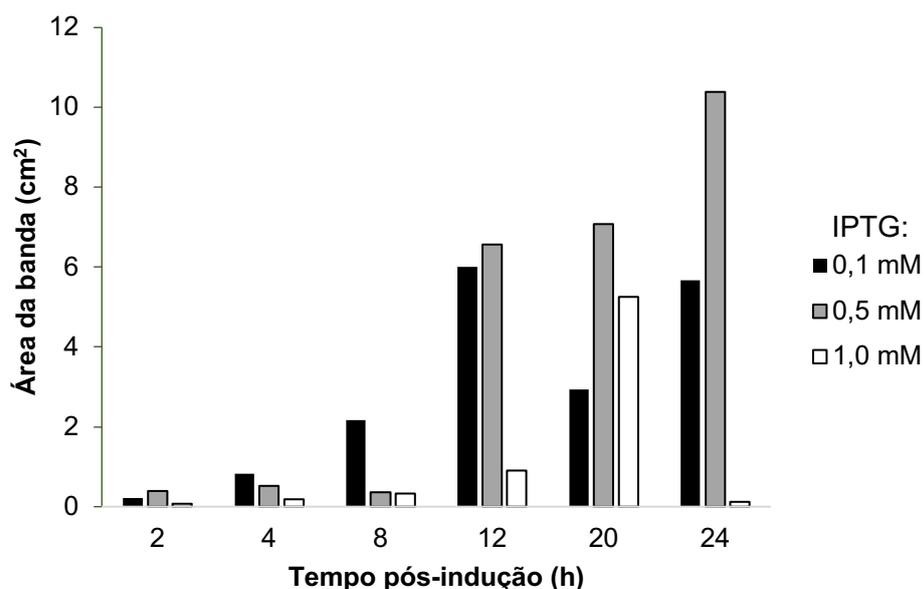


Figura 45. Área das bandas próximas a 45 kDa das frações insolúveis das diferentes condições de cultivo a 20 °C calculadas pelo software ImageJ®.

Em relação à concentração de proteína (Figura 46), o padrão de concentração de proteínas se assemelha com a intensidade das bandas. Isso pode ser explicado pelo fato de que na fração insolúvel de um sistema de expressão existe principalmente corpos de inclusão da enzima de interesse, devido sua superexpressão em agregados insolúveis (SINGH et al., 2020).

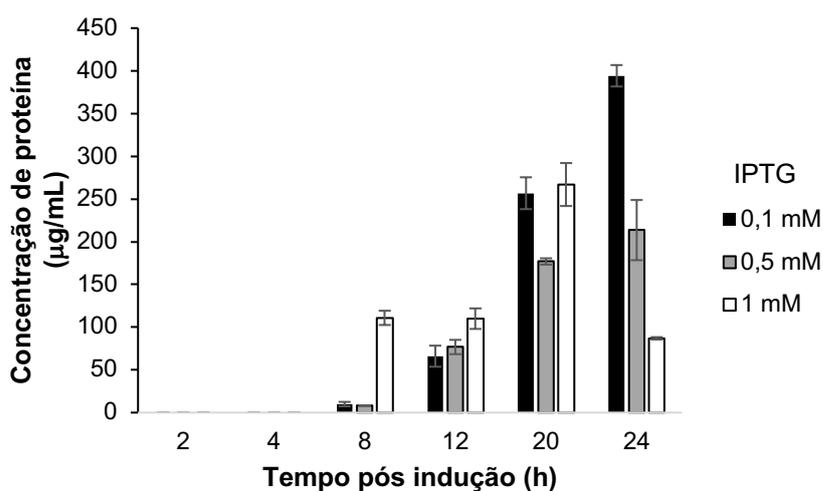


Figura 46. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) das frações insolúveis da triagem a 20 °C.

Uma condição de cultivo foi selecionada para ensaio enzimático e teste de solubilização. Neste caso, o ponto de 24 h na concentração de 0,5 mM foi escolhido devido a presença de uma banda de maior intensidade e uma concentração de proteína médio, resultando em uma razão área da banda/proteína alta, em comparação às outras condições (Figura 47).

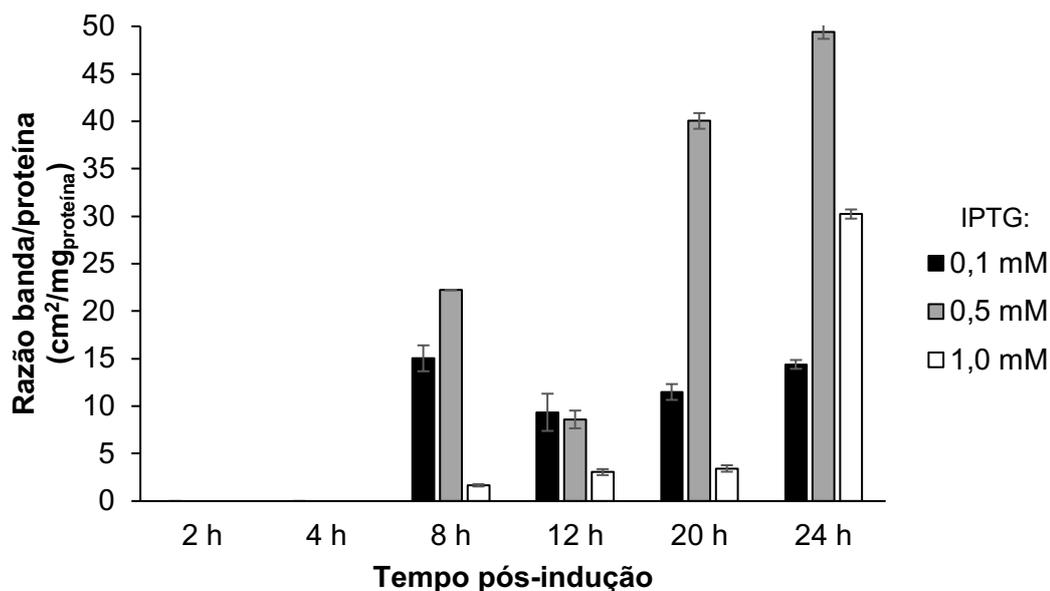


Figura 47. Cálculo da área da banda sobre a concentração de proteína das frações insolúveis dos cultivos a 20 °C.

5.4 PARÂMETROS SELECIONADOS

Os parâmetros selecionados foram utilizados em novos cultivos, desta vez em 50 mL de meio LB + canamicina (50 µg/mL) a 200 rpm.

5.4.1 Atividade de L-ASNase pelo método de AHA

Foi realizada atividade enzimática nas frações solúveis e insolúveis dos cultivos pelo método de AHA, expressa em U/mL e U/mg_{proteína} (atividade específica).

A atividade enzimática (U/mL) foi encontrada apenas as frações solúveis dos cultivos a 20 °C (Figura 48). As atividades variaram entre 0,015 U/mL (ponto 4 h, concentração de IPTG 0,5 mM) a 0,020 U/mL (ponto 24 h, concentração de IPTG 0,5

mM). Não houve diferença estatística entre a atividade enzimática das frações solúveis dos diferentes cultivos.

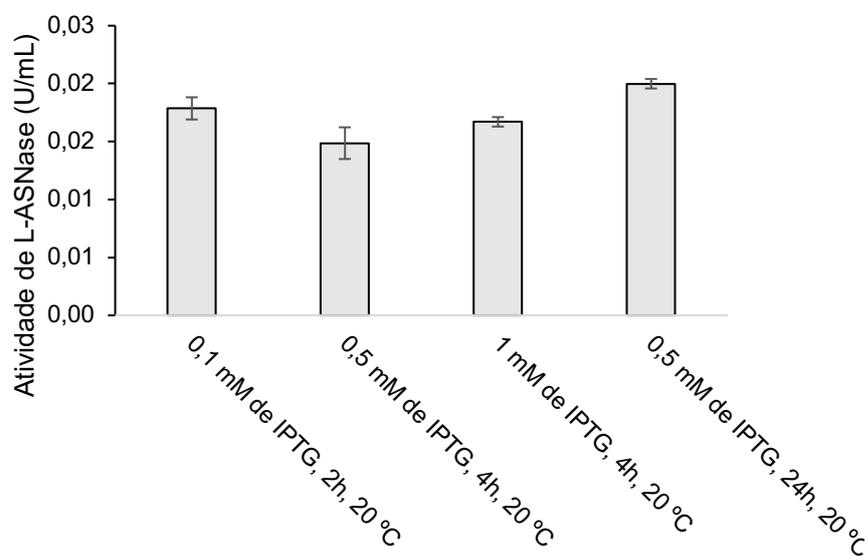


Figura 48. Atividade enzimática de L-ASNase (U/mL) calculada pelo método AHA das frações solúveis dos cultivos selecionados a 20 °C.

Em relação à atividade específica, além das frações insolúveis dos cultivos a 20 °C, no cultivo do ponto 2 h na concentração de 0,1 mM de IPTG a 37 °C também houve atividade, sendo a mais baixa (0,004 U/mg_{proteína}) (Figura 49). A maior atividade específica foi de 0,018 U/mg_{proteína} no ponto de 2 h com a concentração de IPTG de 0,1 mM a 20 °C. Não houve diferença estatística entre as atividades específicas.

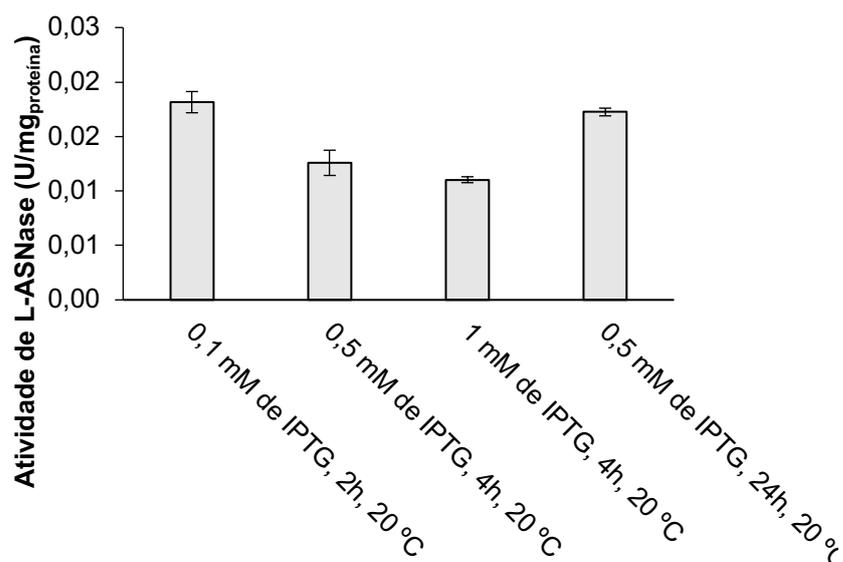


Figura 49. Atividade específica de L-ASNase (U/mg_{proteína}) calculada pelo método AHA das frações solúveis dos cultivos selecionados a 20 °C.

5.4.2 Solubilização de corpos de inclusão purificados

A formação dos corpos de inclusão podem ser ou não um grande desafio na purificação de proteínas recombinantes que usam *E. coli* como hospedeiro (BURGESS, 2009; RUDOLPH' AND; LILIE, 1996). Necessitam do acréscimo de processos envolvendo seu isolamento, solubilização e redobramento para enfim serem purificados e possuírem atividade. Apesar do desenvolvimento da compreensão estrutural de proteínas, a solubilização e redobramento dos CIs geralmente ocorrem de forma empírica, gerando baixo rendimento. Entretanto, após seu redobramento a enzima de interesse encontra-se praticamente pura (SINGH et al., 2015). Métodos se solubilização eficientes para a recuperação de corpos de inclusão reduzem a necessidade de extensivos passos de cromatografia. Além disso, existem corpos de inclusão que já demonstraram possuir a conformação da enzima, possuindo significativa atividade biológica (SINGH et al., 2020).

A solubilização dos CIs ocorre com o uso de altas concentrações de agentes caotrópicos, como ureia e hidrócloro de guanidina, resultando na completa desnaturação das estruturas secundárias da proteína (SINGH et al., 2020). Desta forma, descobrir a molaridade necessária de ureia para cada cultivo torna-se o

primeiro passo para a solubilização dos agregados proteicos e consequente redobramento.

Os ensaios de solubilização foram conduzidos considerando solubilização com SDS 2% o controle positivo, e a fração insolúvel com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,6 como controle negativo. As concentrações de hidrocloreto de guanidina (GdnHCl) utilizadas variaram de 1 – 4 M, com a finalidade de identificar a partir de qual molaridade é possível observar a solubilização da L-ASNase. Tanto os pellets quanto os sobrenadantes da solubilização foram analisados.

A partir da observação dos pellets das solubilizações das frações insolúveis dos cultivos selecionados, é possível observar que em todas as frações há uma queda na concentração de proteínas conforme aumenta-se a molaridade de GdnHCl utilizada na solubilização. Isso se deve ao fato de que as proteínas solubilizadas são transferidas para o sobrenadante.

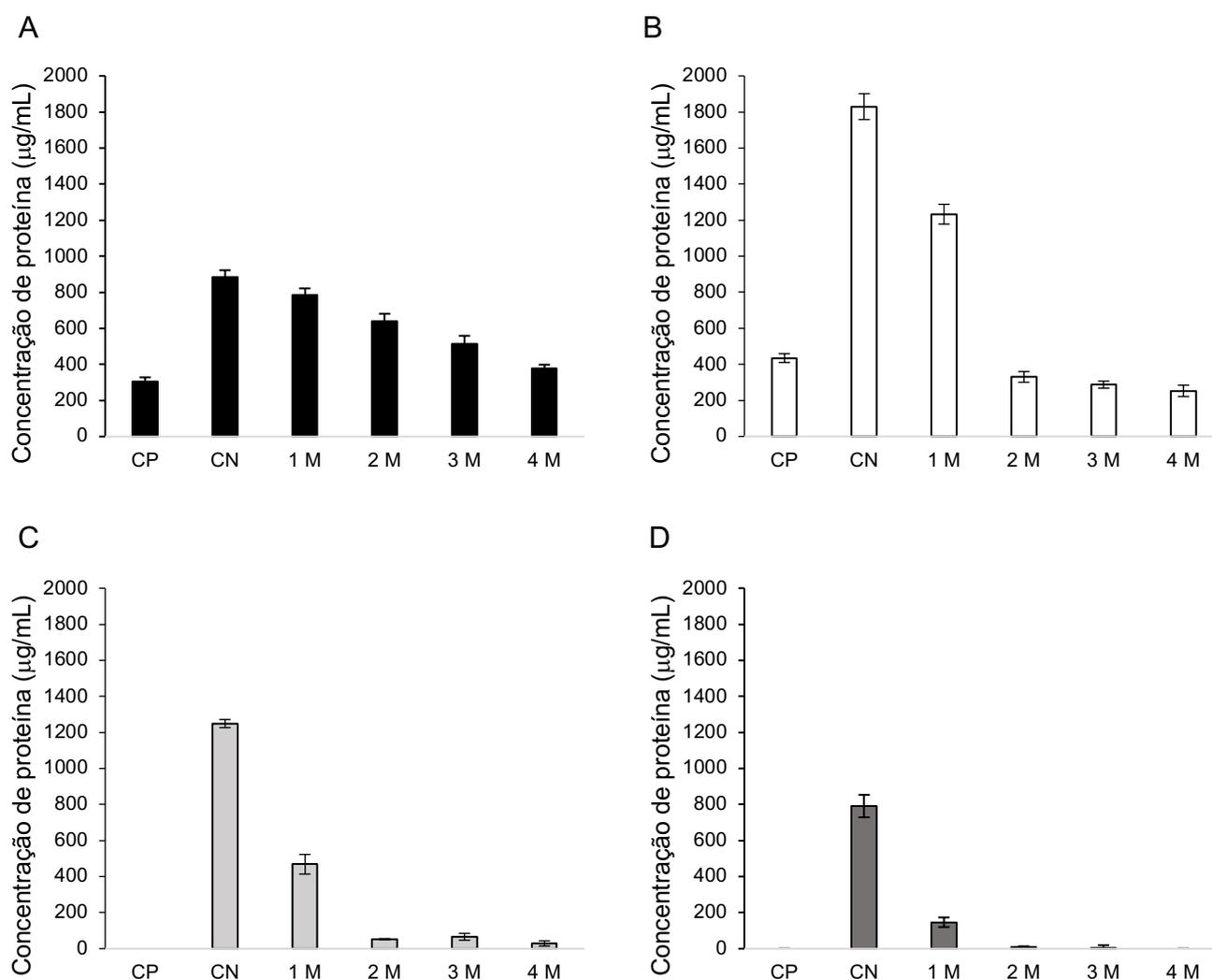


Figura 50. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos pellets resultantes da solubilização com diferentes concentrações de GdnHCl (1 - 4 M). CP: controle positivo (SDS a 2%); CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). **A:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; **B:** 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; **C:** 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; **D:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.

Os géis desnaturantes dos pellets confirmam o que é observado pela análise da concentração de proteínas. As bandas mais intensas próximas a 45 kDa confirmam a presença de L-ASNase principalmente nos controles e nas menores molaridades de GdnHCl (Figura 51).

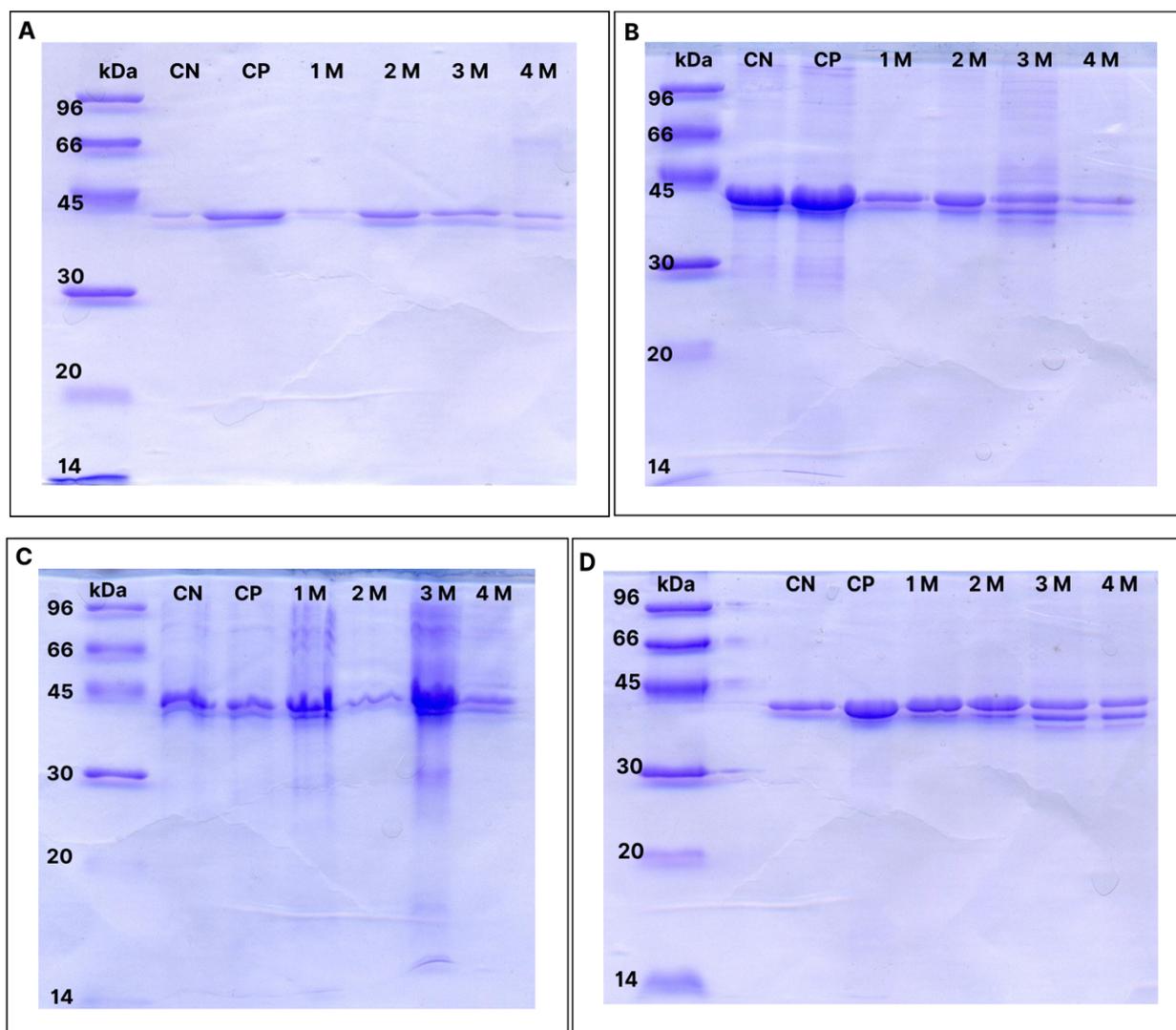


Figura 51. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie dos pellets obtidos a partir da solubilização dos corpos de inclusão com diferentes molaridades de GdnHCl (1 - 4 M). CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). CP: controle positivo (SDS a 2%); **A:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; **B:** 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; **C:** 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; **D:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.

Já nos sobrenadantes, o comportamento dos gráficos é o inverso a dos pellets. Como pode-se ver na Figura 52, há um aumento gradativo na concentração de proteína conforme a molaridade de ureia utilizada para a solubilização aumenta. Pode-se observar que em todos os pontos há um aumento na concentração de proteínas próximo ao controle positivo.

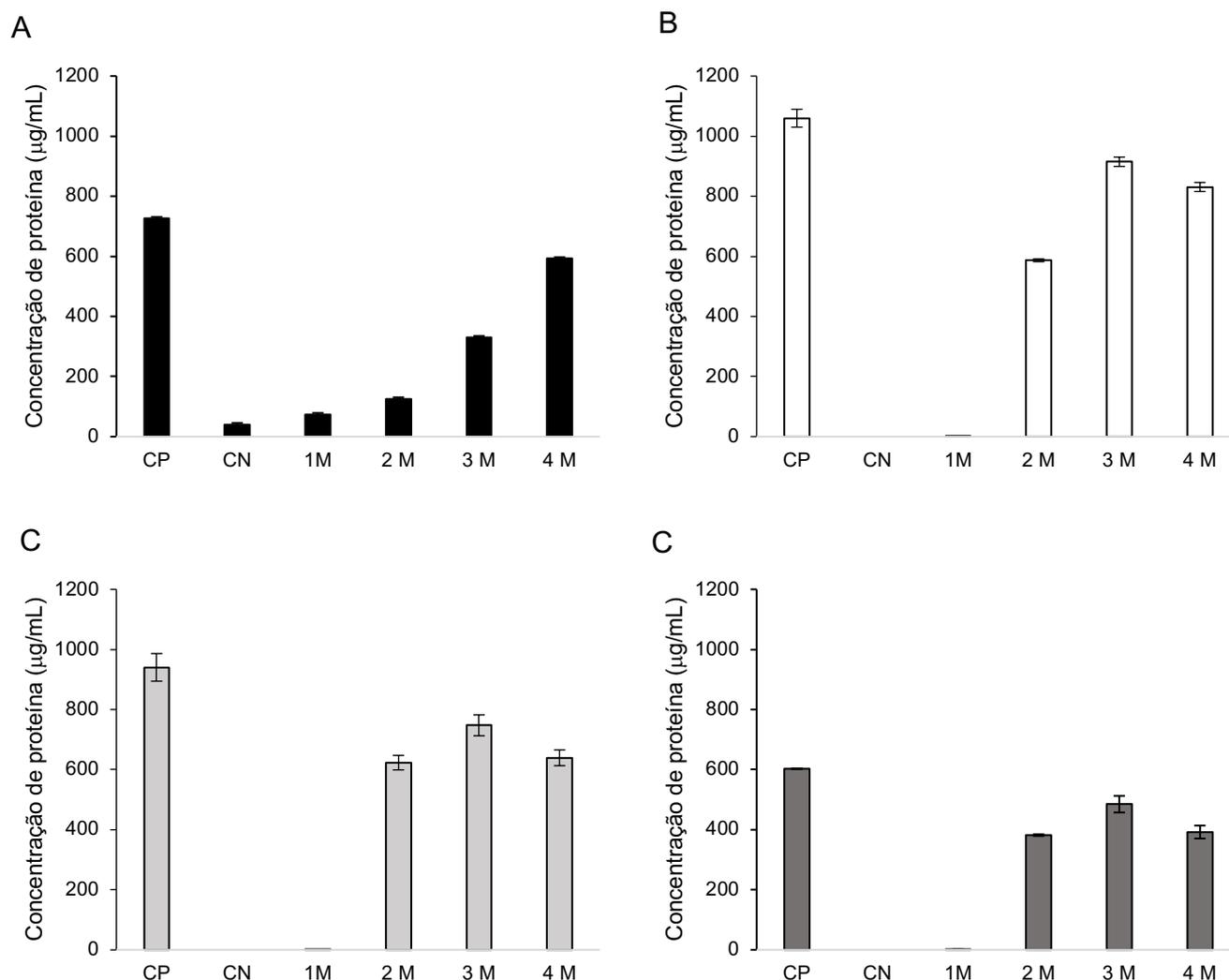


Figura 52. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos sobrenadantes resultantes da solubilização com diferentes concentrações de GdnHCl (1 - 4 M). CP: controle positivo (SDS a 2%); CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). **A:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; **B:** 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; **C:** 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; **D:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.

Para os corpos de inclusão do ponto 2 h, com a concentração de 0,1 mM de IPTG, a 37 °C, a partir de 3 M de GdnHCl pode-se observar sua maior solubilização, e próxima ao controle positivo (Figura 52B). Nos pontos 4 h com a concentração de IPTG a 1 mM e a 37 °C e 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C (Figura 52C e D), os resultados da concentração de proteína indicam que os corpos de inclusão possivelmente são solubilizados também a partir de 3 M de GdnHCl. O ponto 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C, apresentou solubilização em 4 M (Figura 52A). Estes resultados demonstram que a solubilização dos CIs na expressão a 20 °C é menor.

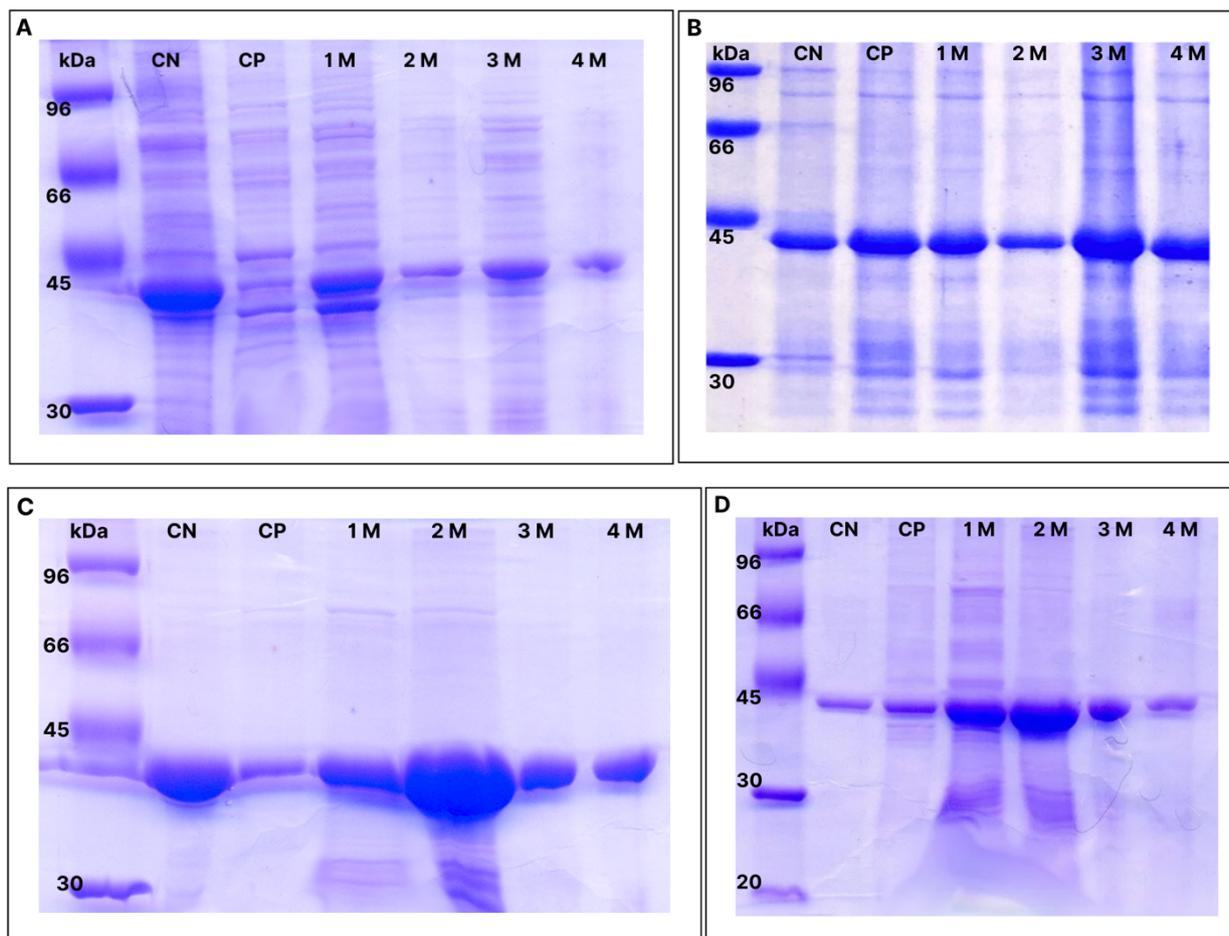


Figura 53. SDS-PAGE 12% (m/v) corado com azul de Coomassie dos sobrenadantes obtidos a partir da solubilização dos corpos de inclusão com diferentes molaridades de GdnHCl (1 - 4 M). CN: controle negativo (corpos de inclusão purificados). CP: controle positivo (SDS a 2%); **A:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 20 °C; **B:** 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C; **C:** 1 mM de IPTG, 4 h, 37 °C; **D:** 0,5 mM de IPTG, 24 h, 37 °C.

Observando os géis de eletroforese dos corpos de inclusão solubilizados, é possível verificar que o comportamento foi semelhante aos resultados de concentração de proteína das amostras de 0,1 mM de IPTG, 2 h, 37 °C e 1 mM de IPTG, 4 h, 37°C (Figura 53B e Figura 53C). A molaridade com maior banda foi a de 3 M, nos dois casos. O mesmo é visto na concentração de proteína destas amostras, que é maior com o uso de 3 M de GdnHCl. No ponto 24 h com a concentração de 0,5 mM de IPTG, a 37 °C a análise pelo gel de eletroforese indicou que com 2 M de GdnHCl é possível obter uma solubilização semelhante ao controle positivo.

Além das observações acerca da molaridade de GdnHCl necessária para a solubilização das frações, é possível observar que o ponto 2 h, 0,1 mM de IPTG, a 37° C apresentou a maior concentração de proteínas, de 1000 µg/mL com 3 M de GdnHCl (Figura 52C).

5.4.3 Redobramento

A partir dos resultados da solubilização com GdnHCl, a fração insolúvel obtida no ponto de 2 h, 0,1mM de IPTG, a 37 °C foi previamente solubilizada com 3 M de GdnHCl e ultrafiltrada com membrana de 3 kDa, para o uso nos próximos ensaios.

O redobramento foi avaliado a partir de uma matriz contendo 9 tampões com diferentes concentrações de GdnHCl (0,2 M, 0,7 M e 1,3 M) e L-arginina (0 M, 0,44 M e 0,88 M), com a diluição da fração solubilizada 20 vezes (Tabela 14). A concentração de proteína foi mantida em menos de 50 µg/mL, com a finalidade de evitar a agregação proteica (NABIEL et al., 2023). A presença de desnaturantes é desejável durante o redobramento pois estes são capazes de desestabilizar as interações que geram agregação, porém em altas concentrações promove desnaturação da enzima. Portanto, a concentração ótima de GdnHCl depende das propriedades físicas da proteína alvo, e deve ser estabelecida testando-a, geralmente com concentrações de até 1,4 M (ALIBOLANDI; MIRZAHOSEINI, 2011).

A L-arginina é responsável por aumentar a solubilidade da proteína, além de prevenir agregação durante o redobramento. Em comparação com GdnHCl, os grupos amino e carboxil da L-arginina formam fracas pontes de hidrogênio com proteínas solúveis e, portanto, atuam como inibidor de agregação. As concentrações efetivas variam entre 0,4 – 1 M (NABIEL et al., 2023; YAMAGUCHI; MIYAZAKI, 2014).

Tabela 14. Matrix primária para seleção de tampão de redobramento, bem como ambiente redox.

Tampão base de redobramento*	GdnHCl (M) Fator 1	L-Arginina (M) Fator 2	Ambiente Redox (mM) Fator 3
1	0,2	0	5 (DTT)
2	0,2	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)
3	0,2	0,88	2:0,4 (GSH:GSSG)
4	0,7	0	5 (DTT)
5	0,7	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)

6	0,7	0,88	2:0,4 (GSH:GSSG)
7	1,3	0	5 (DTT)
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)
9	1,3	0,88	2:0,4 (GSH:GSSG)

* Cada tampão de redobrimento contém, além da Guanidina e da L-Arginina, Tris 55 mM, NaCl 21 mM, KCl 0,88 mM e EDTA 1 mM, com pH ajustado em 8,2.

O primeiro fator da matriz foi o ambiente redox. O rendimento de proteínas com pontes dissulfeto dependem fortemente do redobrimento na presença de um ambiente redox adequado (DE BERNARDEZ CLARK et al., 1998). Foi utilizado nesta matriz glutationa oxidada (GSSG) e reduzida (GSH) com duas proporções de molaridade: 2:0,2 (GSH:GSSG) e 2:0,4 (GSH:GSSG) na concentração final dos ensaios. No caso de proteínas sem pontes de sulfeto, agentes redutores como 2-mercaptoetanol ou DTT são capazes de manter as cisteínas no seu estado reduzido, e prevenir a formação de pontes dissulfeto, e sua presença é recomendada no redobrimento também de proteínas que não contem pontes dissulfeto. Foi utilizada a concentração final de 5 mM de DTT na triagem devido a falta de conhecimento da presença ou ausência de pontes dissulfeto (MALEKI et al., 2020).

Tabela 15. Concentração de proteínas ($\mu\text{g/mL}$) de proteínas e recuperação (%) da matriz primária.

Tampão	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Precipitou?
Controle negativo	47,5 ^a	-	Sim
1	28,0 ^{cd}	59,0	Sim
2	22,3 ^{de}	47,0	Não
3	24,5 ^{cd}	51,6	Não
4	19,1 ^e	40,3	Sim
5	26,2 ^{cd}	55,1	Não
6	25,5 ^{cd}	53,7	Não
7	38,6 ^b	81,2	Não
8	29,5 ^c	62,1	Não
9	18,6 ^e	39,2	Não

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O efeito dos três primeiros fatores (GdnHCl, L-arginina e ambiente redox) foi avaliado pela concentração de proteína, a recuperação, a precipitação (Tabela 15) e

o gel desnaturante de eletroforese (Figura 54). O tampão 7 possui a maior recuperação de proteínas, de 81,2% seguido pelo tampão 8 de 62,2% (Tabela 15). Pela observação do gel de eletroforese (Figura 54), o tampão 7 apresenta de fato uma banda superior às outras. Os tampões 7 e 8 tem em comum a maior molaridade de GdnHCl dos tampões (1,3 M), demonstrando a importância de um agente desnaturante nesta molaridade na para evitar agregação de proteínas. O tampão 7 não possui L-arginina, além de apresentar 5 mM de DTT. O tampão 8 possui 0,44 M de L-arginina e o ambiente redox formado pela proporção 2:0,2 mM de GSH:GSSG. Os tampões 1 e 4 apresentaram precipitados, sugerindo a formação de agregados proteicos, desfavorecendo o redobramento da L-ASNasePS. O tampão 1 possui 0,2 M de GdnHCl e 5 mM de DTT, e o tampão 4 0,7 M de GdnHCl e 5 mM de DTT (Tabela 14). Portanto, é possível observar que baixas concentrações de agentes desnaturantes desfavorecem o enovelamento da enzima. E, apesar do tampão com a maior recuperação possuir o ambiente redox de DTT, na presença de baixas molaridades de desnaturantes ele não interfere no redobramento. Os tampões 7 e 8 foram considerados para uma matriz secundária com PEG.

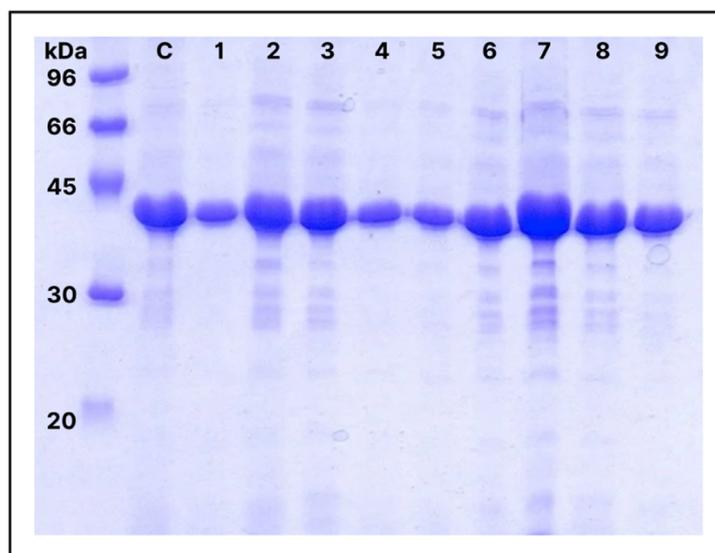


Figura 54. Gel de desnaturante de poliacrilamida (12%) referente aos testes de 1 a 9 da matriz primária.

1: 0,2 M de GdnHCl, 0 M de Arg, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA; **2:** 0,2 M de GdnHCl, 0,4 M de Arg, 2 mM de GSH:0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA; **3:** 0,2 M de GdnHCl, 0,8 M de Arg, 2 mM de GSH:0,4 mM de GSSG, 1 mM de EDTA; **4:** 0,7 M de GdnHCl, 0 M de Arg, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA; **5:** 0,7 M de GdnHCl, 0,4 M de Arg, 2 mM de GSH:0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA; **6:** 0,2 M de GdnHCl,

0,8 M de Arg, 2 mM de GSH:0,4 mM de GSSG, 1 mM de EDTA; **7**: 1,3 M de GdnHCl, 0 M de Arg, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA; **8**: 1,3 M de GdnHCl, 0,4 M de Arg, 2 mM de GSH:0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA; **9**: 1,3 M de GdnHCl, 0,8 M de Arg, 2 mM de GSH:0,4 mM de GSSG, 1 mM de EDTA.

O PEG pode interferir no redobramento da proteína de duas formas: interagindo com as regiões hidrofóbicas de proteínas solúveis, estabilizando seu redobramento, e induzindo à formação da estrutura proteica, inibindo a agregação (NABIEL et al., 2023). Na matriz secundária (Tabela 16), os tampões base de redobramento 7 (1,3 M de GdnHCl e 5 mM de DTT) e 8 (1,3 M de GdnHCl, 0,44 M de L-arginina e 2:0,2 mM de GSH:GSSG) foram testados com diferentes razões da concentração de PEG/proteína de 2:1, 4:1 e 6:1, além da ausência de PEG.

Tabela 16. Matriz secundária realizada com os tampões base de redobramento 7 e 8, e a razão PEG/proteína como quarto fator de redobramento.

Tampão base de redobramento*	GdnHCl (M) Fator 1	L-Arginina (M) Fator 2	Ambiente Redox (mM) Fator 3	Razão PEG/Proteína Fator 4
7	1,3	0	5 (DTT)	0
7	1,3	0	5 (DTT)	2:1
7	1,3	0	5 (DTT)	4:1
7	1,3	0	5 (DTT)	6:1
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	0
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	2:1
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	4:1
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	6:1

* Cada tampão de redobramento contém, além da Guanidina e da L-Arginina, Tris 55 mM, NaCl 21 mM, KCl 0,88 mM e EDTA 1 mM, com pH ajustado em 8,2.

Apesar da presença de bandas em todos os testes (Figura 55), as concentrações de proteína foram baixas, < 10 µg/mL, não havendo rendimento. Desta forma, o PEG foi considerado desfavorável para o redobramento da L-ASNasePS, não sendo utilizado na matriz terciária.

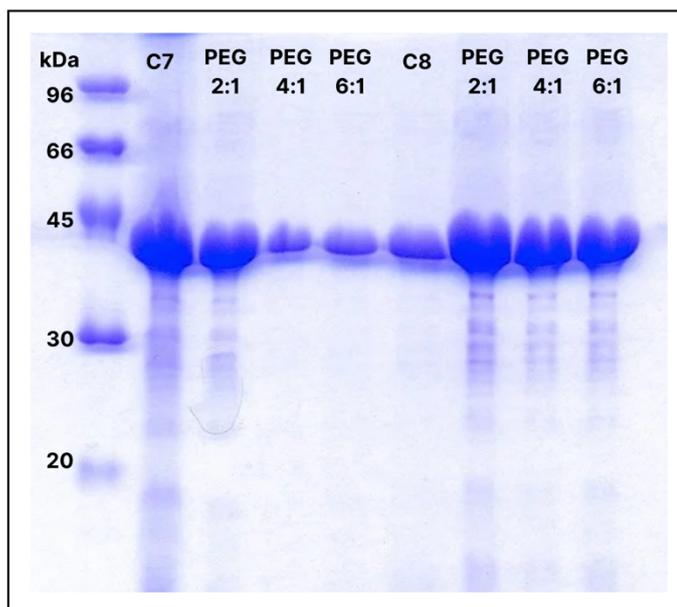


Figura 55. Gel desnaturante de poliacrilamida dos ensaios da matriz secundária.

C7 (controle 7): 1,3 M de GdnHCl, 0 M de Arg, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA. C8 (controle 8): 1,3 M de GdnHCl, 0,4 M de Arg, 2 mM de GSH:0,2 mM de GSSG, 1 mM de EDTA.

O fator 4 incluído na matriz terciária foram cátions divalentes (CaCl_2 e MgCl_2), que podem tanto ser favoráveis ou desfavoráveis ao enovelamento de uma proteína. Foram testadas as concentrações de 1, 2 e 4 mM de CaCl_2 e MgCl_2 , nestas condições não houve presença de EDTA no tampão base, devido sua natureza quelante. Portanto, nos ensaios sem cátions divalentes há EDTA (1 mM) (Tabela 17). Os cátions divalentes podem reduzir a agregação proteica como também causar precipitação nas proteínas, devido seu efeito de *salting-out*. O efeito dos cátions divalentes no redobramento de uma enzima depende da sua concentração e de características bioquímicas da proteína (LÓPEZ-LAGUNA et al., 2020). Altas concentrações de cátions divalentes podem promover agregação (ANTOSOVA et al., 2022).

Apesar de ainda ser pouco esclarecido o efeito de cátions divalentes no redobramento/agregação de proteínas, há estudos que sugerem alguns mecanismos. LIU et al. (2020) investigaram a influência de Mg^{2+} na desnaturação e agregação da albumina de soro bovino, e concluíram que a presença do cátion houve menor agregação. Foi demonstrado que o ion Mg^{2+} foi capaz de prevenir a transformação de α -hélices em estruturas agregadas/enoveladas incorretamente, e o íon foi capaz de se ligar multivalentemente aos grupos carboxilados dos resíduos Asp e Glu da albumina, servindo com “pontes dissulfeto” para estabilizar as estruturas secundárias

e terciárias. ANTOSOVA et al. (2022) destacaram a importância de Mg^{2+} e Ca^{2+} na estabilização das estruturas secundária e terciária da α -lactalbumina, na redução de folhas- β . Uma série de estudos demonstraram o efeito dos cátions divalentes na estabilização e redobramento de proteínas (ARAKAWA; TIMASHEFF, 1984; BUELL et al., 2013; KANG et al., 2020; WANG et al., 2023). Outro mecanismo proposto inclui o fato de que Mg^{2+} e Ca^{2+} são cátions fortemente hidratados e possuem tamanho pequeno, aumentando a solubilidade de proteínas devido interação com cadeias hidrofóbicas (TANFORD, 1963; VON HIPPEL; SCHLEICH, 1969).

Tabela 17. Matriz terciária realizada com os tampões base de redobramento 7 e 8, e a cátions divalentes ($CaCl_2$ e $MgCl_2$) como quarto fator de redobramento.

Tampão base	GdnHCl (M) Fator 1	L-Arginina (M) Fator 2	Ambiente Redox (mM) Fator 3	$CaCl_2$ e $MgCl_2$ (mM) Fator 4
7	1,3	0	5 (DTT)	0
7	1,3	0	5 (DTT)	1
7	1,3	0	5 (DTT)	2
7	1,3	0	5 (DTT)	4
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	0
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	1
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	2
8	1,3	0,44	2:0,2 (GSH:GSSG)	4

* Cada tampão de redobramento contém, além da Guanidina e da L-Arginina, Tris 55 mM, NaCl 21 mM, KCl 0,88 mM, com pH ajustado em 8,2.

Pelos resultados apresentados na Tabela 18, é possível verificar a recuperação total de proteína nas condições: tampão base 7 (GdnHCl 1,3 M, DTT 5 mM) com a adição de 2 mM e 4 mM de $CaCl_2$ e $MgCl_2$; e no tampão base 8 (GdnHCl 1,3 M, L-arginina 0,44 M, 2:0,2 GSH:GSSG) com a adição de 1 mM de cátions divalentes.

O redobramento da L-ASNasePS foi avaliado através de Native-PAGE (Figura 56A), para verificar a formação da estrutura tetraédrica da L-ASNasePS. Sabendo que a L-ASNasePS na sua forma nativa apresenta tamanho molecular de aproximadamente 152 kDa, pode-se verificar a formação de banda em região ligeiramente acima do marcador molecular albumina (132 kDa), sugerindo a formação da estrutura nativa da L-ASNasePS. Entretanto, não houve atividade de L-ASNase pelo método β -hidroxamato aspártico.

Tabela 18. Concentração de proteína ($\mu\text{g/mL}$) e rendimento dos ensaios da matriz terciária.

Tampão	Ensaio	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)
Tampão 7	C7	41,5	-
	1	36,3	87,2
	2	45,9	100,0
	3	46,0	100,0
Tampão 8	C8	24,7	-
	4	25,2	100,0
	5	20,6	83,4
	6	15,6	63,1

C7: Tampão base 7 (GdnHCl 1,3 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM); 1, 2 e 3: Tampão base 7 (sem EDTA) com CaCl_2 e MgCl_2 nas concentrações de 1 mM, 2 mM, 4 mM, respectivamente. C8: Tampão base 8 (GdnHCl 1,3 M, L-arginina 0,44 M, 2:0,2 GSH:GSSG, EDTA 1 mM); 4, 5 e 6: Tampão base 8 (sem EDTA) com CaCl_2 e MgCl_2 nas concentrações de 1 mM, 2 mM, 4 mM, respectivamente.

Considerando a baixa concentração de proteína presente nos testes, foi realizada ultrafiltração com membrana de 30 kDa de *cut-off* (Vivaspin®). Foram escolhidas uma condição de cada tampão base, considerando a recuperação de proteína, que foram os ensaios 3 e 4 (Tabela 18). Foi realizado novamente Native-PAGE das amostras concentradas (Figura 56B) e foi observada as bandas sugestivas de L-ASNasePS em conformação tetraédrica, entretanto ainda sem atividade. A fim de se remover os aditivos dos tampões, que poderiam possivelmente estar interferindo no ensaio de atividade enzimática, foi realizada diálise com tampão Tris-HCl 5 mM pH 8,6, a 4 °C durante 24 h. Mesmo após dialisada, e a presença de bandas sugestivas à L-ASNasePS nativa por Native-PAGE (Figura 57) a enzima não apresentou atividade, que pode ser explicado pela cauda de histidina presente nas porções C-terminal e N-terminal da construção plasmidial.

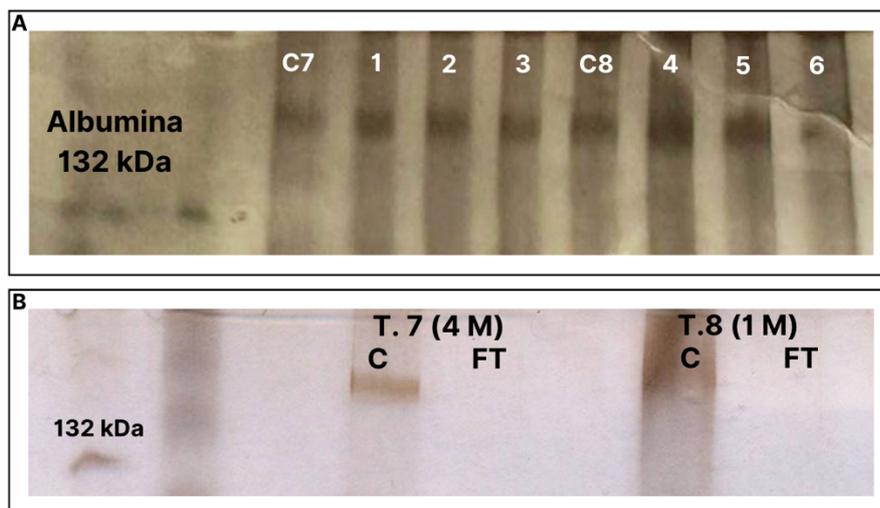


Figura 56. Native-PAGE (corado com nitrato de prata) dos testes da matriz terciária (A) e de amostras ultrafiltradas (30 kDa *cut-off*) da matriz terciária (B). Marcador molecular: albumina (132 kDa).

A: C7: Tampão base 7 (GdnHCl 1,3 M, DTT 5 mM, EDTA 1 mM); 1, 2 e 3: Tampão base 7 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 1 mM, 2 mM, 4 mM, respectivamente. C8: Tampão base 8 (GdnHCl 1,3 M, L-arginina 0,44 M, 2:0,2 GSH:GSSG, EDTA 1 mM); 4, 5 e 6: Tampão base 8 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 1 mM, 2 mM, 4 mM, respectivamente. **B:** T.7 (4M): Tampão base 7 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 4 mM, C: concentrado após ultrafiltração; FT: flow-through; T.8 (1M): Tampão base 8 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 1 mM, C: concentrado após ultrafiltração; FT: flow-through.

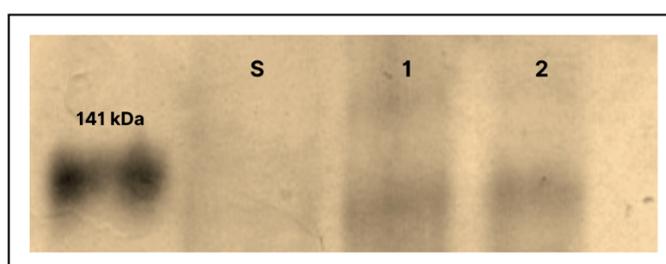


Figura 57. Native-PAGE das amostras dialisadas após triagem por matriz experimental. Marcador: L-asparaginase.

S: Tampão base sem aditivos. **1:** Tampão base 7 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 4 mM, C: concentrado após ultrafiltração; FT: flow-through. **2:** Tampão base 8 (sem EDTA) com CaCl₂ e MgCl₂ nas concentrações de 1 mM, C: concentrado após ultrafiltração; FT: flow-through.

Apesar de mais de 90% das proteínas recombinantes experimentais possuírem cauda de histidina devido seu baixo peso molecular e sua facilidade de purificação por resinas de Ni-NTA, seu uso é controverso (DEREWENDA, 2004; ZHAO; HUANG,

2016). A cauda de histidina presente na construção do plasmídeo do sistema de expressão da L-ASNasePS em *E. coli* e pode explicar a falta de atividade enzimática mesmo em sua conformação nativa. HORCHANI et al. (2009) reportaram que a cauda de histidina presente na porção N-terminal pode afetar negativamente a atividade específica, a seletividade e a termoestabilidade. A redução da atividade catalítica de enzimas recombinantes foi observada em outros estudos, após a incorporação da cauda de histidina, tanto na porção N-terminal, quanto da C-terminal (ARAÚ et al., 2000; BOOTH et al., 2018; EMOND et al., 2008; HORCHANI et al., 2010; MAJOREK et al., 2014). Uma solução seria a retirada da cauda de histidina após a purificação, pela clivagem no sítio de trombina (ARAÚ et al., 2000).

Os sistemas de expressão procarióticos, em especial *E. coli*, produzem há décadas proteínas terapêuticas em escala industrial. A preferência por *E. coli* como hospedeira se dá devido aos baixos custos das fontes de carbono para seu crescimento, rápido crescimento celular, receptividade à fermentação de alta densidade celular e simples processos de escalonamento (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007). Entretanto, a expressão de enzimas eucarióticas em sistemas de *E. coli* apresentam comumente a falta de modificações pós-translacionais da proteína alvo. Processos como glicosilação e fosforilação são fundamentais para a atividade e estabilidade da enzima heteróloga (ECCLES, 1992). Genes heterólogos de eucariotos com códons abundantes, raramente usados na *E. coli*, podem não ser expressados de forma eficiente em *E. coli*, ocasionando erros de translação. O viés de uso de códon (*codon bias*) se torna um problema prevalente quando códons raros na forma transcrita formam dubletos ou tripletos que se acumulam em altas quantidades. Os erros pós-translacionais ocasionados por viés de uso de códon incluem substituições de aminoácidos, recodificação traducional ou terminação translacional prematura (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007).

Outro desafio de proteínas eucarióticas expressas em *E. coli* é a formação de pontes dissulfeto. A formação das pontes dissulfeto ocorrem no espaço periplasmático pelo sistema Dsb onde a tioredoxina e a glutredoxina facilitam a redução de cisteínas. Entretanto, estas duas moléculas são mantidas na forma reduzida, tioredoxina redutase (trxB) e glutathione redutase (gor). A formação de pontes dissulfeto ocorrem quando há degradação dos genes trxB e gor. Portanto, a co-expressão de linhagens com o sistema Dsb com trxB e gor (DsbC) podem aumentar o redobramento e reduzir

a formação das pontes dissulfeto (BESSETTE et al., 1999; LEVY et al., 2001; MAYER et al., 2004). Além do sistema Dsb, a proteína dissulfeto isomerase (PDI) e peptídeos contendo o sítio ativo da PDI são utilizados como catalizadores para a não formação das pontes dissulfeto. A adição de agentes redutores como DTT e 2-mercaptoetanol são utilizados durante a solubilização, juntamente com glutatona reduzida e oxidada para a não formação de pontes dissulfeto durante o redobramento (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007).

Uma série de estratégias são utilizadas para superar esses desafios da expressão de proteínas eucarióticas em *E. coli*, como modificações na linhagem de *E. coli*, otimização do meio e das condições de cultivo, expressão a baixas temperaturas, co-expressão de chaperonas moleculares, dentre outras (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007). Estratégias biotecnológicas estão descritas na Tabela 19.

Tabela 19. Estratégias biotecnológicas para a produção heteróloga de proteínas eucarióticas ativas em sistemas de *E. coli*.

Desafios na expressão em <i>E. coli</i>	Estratégias	Referências
1. Viés de uso de códon	<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RP;	(YU; JIN, 2007)
	Aumento da dosagem do gene do respectivo tRNA;	(CAMBRIDGE et al., 2018)
	Combinações de plasmídeos.	(KIRIENKO et al., 2004; ROSENBERG et al., 1993; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007; SHARP; DEVINE, 1989)
2. Formação de pontes dissulfeto	Co-expressão de linhagens DsbC;	(BESSETTE et al., 1999; MAYER et al., 2004)
	Proteína dissulfeto isomerase.	(LEVY et al., 2001)
3. Fosforilação da proteína	Fosforilação da proteína recombinante por quinases endógenas;	(MIJAKOVIC et al., 2006)
	Expressão da proteína quinase de um ou dois plasmídeos diferentes na mesma <i>E. coli</i> .	(GOSSE et al., 1993)
4. Enovelamento inadequado	Glicosilação não enzimática;	(EL-BATTARI et al., 2003)
	Síntese co-translacional por aminoácidos modificados geneticamente.	(ZHANG et al., 2004)

Os códons preferencialmente usados em genes de *E. coli* revelam um número de códons que são menos representados que em outros organismos. Há baixa expressão de genes de baixo uso [AGA, AGG e GCA (Arg); AUA (Ile) e CUA (Leu)] menos de 8% dos seus códons pares, e nos códons GGA (Gly), CGG (Arg) e CCC (Pro) caem para menos de 2% dos seus respectivos pares (SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007). Neste caso, o uso da linhagem de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP, a qual é geneticamente modificada pela adição de tRNAs que reconhecem os códons de eucariotos (AGA, AGG e CCC) pode ser recomendado (CAMBRIDGE et al., 2018; YU; JIN, 2007) Outra alternativa que já demonstrou aumento no rendimento em sistemas de *E. coli* é a adição dos códons de eucariotos na dosagem genética dos seus respectivos tRNAs (CAMBRIDGE et al., 2018; KIRIENKO et al., 2004). Por fim, para otimizar a expressão genes ricos em AT e GC, várias combinações de plasmídeos (pRIG, pRARE, pACYC, pCT1, entre outros) que encodam genes raros de tRNA sob o controle dos seus promotores nativos (KIRIENKO et al., 2004; ROSENBERG et al., 1993; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007; SHARP; DEVINE, 1989).

A falta de modificações pós-translacionais como a fosforilação em *E. coli*, ocorre devido a ausência da maquinaria de eucariotos, incluindo proteínas serina/treonina/tirosina quinases. Isto pode ser contornado pela expressão endógena de proteínas quinases utilizando adenosina trifosfato como um doador fosforil (MIJAKOVIC et al., 2006). Outra estratégia é a introdução e expressão de proteínas quinases de um ou dois vetores separados na mesma *E. coli* (GOSSE et al., 1993). A ausência de modificações pós-translacionais relacionadas à glicosilação, podem levar à formação de glicanas celulares ligadas a proteínas e lipídeos. A glicosilação é realizada pelas enzimas glicosiltransferases e glicosidases, raros em procariotos e comum em eucariotos, e são capazes de alterar significativamente a dimerização, a digestão proteolítica, secreção e processos de autoglicosilação (EL-BATTARI et al., 2003). A glicosilação não enzimática (glicação) é uma alternativa para solucionar este problema, e ocorre naturalmente em procariotos, com as condições específicas do crescimento celular (MIRONOVA et al., 2005). Além deste processo, a glicosilação pode ser atingida pela co-translação de aminoácido geneticamente modificados (ZHANG et al., 2004).

Neste cenário, vê-se que as possibilidades de resolução dos problemas relacionados à atividade da enzima são variados e necessitam ser explorados, no

caso da L-ASNasePS expressa em *E. coli* BL21(DE3). Devido sua alta expressão e formação de corpos de inclusão, que apesar de desafiante possuem vantagens para a indústria, como a obtenção do produto final em poucas etapas, a investigação sobre a escolha da linhagem de *E. coli*, bem como da construção do plasmídeo, deve ser considerada (RODRIGUES ANDRADE et al., 2023; UPADHYAY et al., 2014).

6 CONCLUSÃO

A clonagem e expressão do gene da L-ASNase do fungo *P. sizovae* em *E. coli* BL21 (DE3) foi confirmada, sendo que a expressão inicial foi observada apenas nas frações insolúveis, indicando a formação de corpos de inclusão. De dez clones, um foi escolhido, sendo avaliado em diferentes condições de cultivo a 20 °C e a 37 °C, diferentes concentrações de indutor e tempos pós-cultivo. Apesar da presença da L-ASNasePS nas frações solúveis em cultivos a 20 °C, as atividades catalíticas foram baixas (até 0,02 U/mL).

A partir dos cultivos que apresentaram maior expressão enzimática nas frações insolúveis, foram-se obtidos os corpos de inclusão isolados, seguida solubilizados com hidrocloreto de guanidina. A condição de cultivo 0,1 mM de IPTG, a 37 °C coletados com 2 h pós-indução e solubilização realizada com 3 M de hidrocloreto de guanidina apresentou as maiores concentrações de proteína.

O redobramento foi efetuado a partir de matrizes experimentais considerando fatores de ambiente redox, relação PEG:proteína e presença de cátions divalentes. Foi observado que tampões com maior concentração de GdnHCl (1,3 M) promoveram menor agregação. Com a adição de cátions divalentes, foi possível obter a conformação tetramérica da L-ASNasePS, entretanto, sem atividade enzimática. Tais resultados demonstram a necessidade de uma compreensão maior acerca da construção do plasmídeo, bem como da linhagem celular. Considerando as vantagens e os desafios relacionados à expressão de proteínas eucarióticas em sistemas procariotos (em especial *E. coli*), já existem técnicas bem estabelecidas para contornar e resolver os problemas relacionados a esse tipo de expressão.

Neste trabalho, foi reportado que a L-ASNase do fungo filamentoso *P. sizovae* foi expressa em sistema heterólogo de *E. coli* com baixas concentrações de IPTG, poucas horas de indução e com um meio de cultivo com fontes de carbono baratas, o que torna o processo mais econômico e rápido. Além disso, a presença de corpos de inclusão indica uma alta expressão, e é considerada uma vantagem na recuperação de proteínas de interesse farmacêutico devido a necessidade de poucas etapas *downstream* para a obtenção do produto final, com maior pureza e rendimento. Desta forma, este estudo pavimentou o caminho para a expressão heteróloga da L-ASNase

de *P. sizovae* em sistema de *E. coli*, indicando a necessidade de ajustes na construção do vetor, e possivelmente da linhagem celular.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Artigos publicados:

Cunha, J.R.B.; Wischral, D.; Peláez, R.D.R.; De Oliveira Magalhães, P.; **Guimarães, M.B.**; de Jesus, M.A.; Sales-Campos, C.; Mendes, T.D.; Dias, E.S.; Mendonça, S.; et al. Aqueous Extracts of Fermented Macrofungi Cultivated in Oilseed Cakes as a Carbon Source for Probiotic Bacteria and Potential Antibacterial Activity. *Metabolites* 2023, 13, 854. <https://doi.org/10.3390/metabo13070854> (Qualis A3)

Rodrigues Andrade, K. C., Cordeiro de Abreu, J. A., **Guimarães, M. B.**, Abrunhosa, L. S., Leôncio Rodrigues, A. L., Fonseca-Bazzo, Y. M., Magalhães, P. O. (2023). Heterologous Expression of Fungal L-Asparaginase: A Systematic Review. *Future Microbiology*, 19(2), 157–171. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0131> (Qualis A2)

Andrade, K.C.R.; Homem-de-Mello, M.; Motta, J.A.; **Guimarães, M.B.**; de Abreu, J.A.C.; de Souza, P.M.; Pessoa, A.; Pappas, G.J., Jr.; de Oliveira Magalhães, P. A Structural In Silico Analysis of the Immunogenicity of L-Asparaginase from *Penicillium cerradense*. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 4788. <https://doi.org/10.3390/ijms25094788> (Qualis A3)

Resumos em congressos:

GUIMARÃES, M. B.; ABREU, J. A. C.; ABRUNHOSA, L. S.; RODRIGUES, A. L. L.; CRUVINEL, K.; CARDOSO, SAMUEL L.; SOUZA, P. M.; PESSOA, A.; NORONHA, E. F.; MAGALHÃES, P. O. Heterologous expression of *Penicillium sizovae* L-asparaginase in *Escherichia coli* BL21(DE3). 2022. 6th Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress, Brasília, Brasil.

ABREU, J. A. C.; ANDRADE, K. C. R.; **GUIMARÃES, M. B.**; ABRUNHOSA, L. S.; RODRIGUES, A. L. L.; CARDOSO, S. L.; SOUZA, P. M.; PESSOA, A.; MAGALHÃES, P. O. Partial in silico evaluation of L-Asparaginase immunogenicity from *Penicillium cerradense*. 2022. 6th Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress, Brasília, Brasil.

RODRIGUES, A. L. L.; ABRUNHOSA, L. S.; ABREU, J. A. C.; **GUIMARÃES, M. B.**; ANDRADE, K. C. R.; MARTINS, D. H. N.; CARDOSO, S. L.; SOUZA, P. M. Heterologous expression of L-asparaginase from *Fusarium proliferatum* in native and mutated *Escherichia coli* BL21 (DE3). 2022. 6th Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress, Brasília, Brasil.

ANDRADE, K. C. R.; SILVA, R. A. F. S.; SOUZA, P. M.; CARDOSO, S. L.; ABREU, J. A. C.; **GUIMARÃES, M. B.**; RODRIGUES, A. L. L.; ABRUNHOSA, L. S.; PESSOA, A.; PINHO, D. B.; HOMEM DE MELLO, M.; MAGALHÃES, P. O. In silico characterization of L-asparaginase of a new *Penicillium* species isolated from cerrado. 2022. 6th Brazilian Association of Pharmaceutical Sciences Congress, Brasília, Brasil.

CARDOSO, S. L.; CRUVINEL, K.; ABRUNHOSA, L. S.; **GUIMARÃES, M. B.**; RODRIGUES, A. L. L.; ABREU, J. A. C. HOMEM-DE-MELLO, M.; MAGALHÃES, P. O.; SOUZA, P. M. In silico structural analysis of L-Asparaginase from *Fusarium proliferatum*. In: Biopartitioning & Purification Conference, 2022, Aveiro. Book of Abstracts, 2022.

DE ALMEIDA R.; ABRANTES, A. F. B.; MARTINS, D. N.; **GUIMARÃES, M. B.**; SILVEIRA, D.; FONSECA-BAZZO, Y. M., MAGALHÃES, P. O. Antibacterial activity of standardized aqueous extract of *Psidium guajava* leaves. 2022. II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas. Foz do Iguaçu, Paraná.

RODRIGUES, A. L. L.; ABRUNHOSA, L. S.; ABREU, J. A. C.; **GUIMARÃES, M. B.**; ANDRADE, K. C. R.; CARDOSO, S. L.; NORONHA, E.; SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Sonication methods for *Fusarium proliferatum* L-asparaginase samples in heterologous expression system. 2022. II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas. Foz do Iguaçu, Paraná.

ABREU, J. A. C.; CRUVINEL, K.; **GUIMARÃES, M. B.**; RODRIGUES, A. L. L. ; ABRUNHOSA, L. S. ; CARDOSO, SAMUEL L. ; Souza, PM ; NORONHA, E. F. ; Pessoa, A ; MAGALHÃES, P. O. Heterologous Expression of *Penicillium cerradense*

L-Asparaginase Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. 2023. 32° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, Paraná.

ABRUNHOSA, L. S.; RODRIGUES, A. L. L.; SANTANA, A. L.; ABREU, J. A. C.; **GUIMARÃES, M. B.**; CARDOSO, SAMUEL L.; SOUZA, P. M.; NORONHA, E. F.; FERREIRA, E.; MAGALHÃES, P. O. Expression of L-asparaginase from *Fusarium proliferatum* in native and mutated *Escherichia coli*. 2023. 32° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, Paraná.

GUIMARÃES, M. B.; PEREIRA, J. F. B.; MAGALHÃES, P. O. Extração de L-asparaginase de fungo filamentoso do cerrado (*Penicillium sizovae*) por solventes orgânicos. 2023. I Simpósio Internacional Multidisciplinar CPBP. Lisboa, Portugal.

CRUVINEL, K.; ABREU, J. A. C.; Souza, PM; CARDOSO, SAMUEL L.; **GUIMARÃES, M. B.**; RODRIGUES, A. L. L.; ABRUNHOSA, L. S.; XIMENES, E.; Pessoa, A ; MAGALHÃES, P. O. Screening of L-asparaginase extraction from *Penicillium cerradense* isolated from Brazilian Savannah. 2023. 32° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, Paraná.

GUIMARÃES, M. B.; ABREU, J. A. C.; SOUZA, P. M.; NORONHA, E. F.; MAGALHÃES, P. O. Growth conditions of *Escherichia coli* BL21(DE3) with an L-ASNase gene from *Penicillium sizovae* aiming for higher enzyme yield. 2023. 32° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, Paraná.

RODRIGUES, A. L. L.; ABREU, J. A. C.; ABRUNHOSA, L. S.; **GUIMARÃES, M. B.**; CARDOSO, S. L.; CRUVINEL, K.; MAGALHÃES, P. O; NORONHA, E. F.; PESSOA, A; SOUZA, P. M. Optimization of Culture Conditions for Recombinant L-Asparaginase Production and Inclusion Body Solubilization. 2023. 32° Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu, Paraná.

GUIMARÃES, M. B.; PEREIRA, J.F.B., MAGALHÃES, P. O; Purification of a fungal L-asparaginase using aqueous biphasic systems. 2024. VII ABCF. Florianópolis, Santa Catarina.

GUIMARÃES, M. B.; ABREU, J. A. C., MAGALHÃES, P. O; Inclusion bodies refolding of a fungal L-asparaginase. XLVI Congreso Chileno de Microbiología. 2024. Coquimbo, Chile.

Doutorado Sanduíche (02/2023 – 08/2023)

Programa CAPES-PrInt – Edital Interno PPGCS nº 003/2022

Supervisor: Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira

Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra – Portugal.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Andrew P.; CAPPER, Glen; DAVIES, David L.; RASHEED, Raymond K.; TAMBYRAJAH, Vasuki. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 0, n. 1, p. 70–71, 2003. DOI: 10.1039/B210714G. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2003/cc/b210714g>. Acesso em: 10 ago. 2024.

ACS. **Chemotherapy for Childhood Leukemia**. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children/treating/chemotherapy.html>. Acesso em: 7 out. 2022.

AGHAEPOOR, Mojtaba; MOZAFARI, Sina; SHAHRAKI, M. K.; TABANDEH, Fatemeh; BAMBAL, Bijan. High level of extracellular fermentation and alternative purification of *Escherichia coli* asparaginase II. **Biharean Biol**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 96–101, 2011.

AGUILAR, Oscar; ALBITER, Verónica; SERRANO-CARREÓN, Leobardo; RITO-PALOMARES, Marco. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 835, n. 1, p. 77–83, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.03.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023206002339>.

ALBERTSEN, Birgitte Klug; SCHRØDER, Henrik; JAKOBSEN, Preben; AVRAMIS, Vassilios I.; MÜLLER, Hans Joachim; SCHMIEGELOW, Kjeld; CARLSEN, Niels T. Antibody formation during intravenous and intramuscular therapy with *Erwinia asparaginase**. **Medical and Pediatric Oncology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 310–316, 2002. DOI: 10.1002/MPO.10096.

ALESSANDRA, Piscitelli; CINZIA, Pezzella; PAOLA, Giardina; VINCENZA, Faraco; SANNIA, Giovanni. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 252, 2010. DOI: 10.4161/BBUG.1.4.11438.

ALIBOLANDI, Mona; MIRZAHOSEINI, Hasan. Chemical Assistance in Refolding of Bacterial Inclusion Bodies. **Biochemistry Research International**, [S. l.], v. 2011, 2011. DOI: 10.1155/2011/631607. Disponível em: /pmc/articles/PMC3148444/. Acesso em: 21 set. 2024.

ALMEIDA, Renata Paula Coppini De. **Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado**. 2015. Dissertação - Universidade de Brasília, [S. l.], 2015.

ALVES, Tito Livio Moitinho,; EINSFELDT, Karen; BAPTISTA, Isis Cavalcanti; ALMEIDA, Rodrigo Volcan; DA COSTA, Elaine Sobral; RIBEIRO, Maria Cecilia Menks; LAND, Marcelo Geraldin; LARENTIS, Ariane Leites. **Recombinant L-asparaginase from zymomonas**, US20160348085A1, 2016.

AMFEP. **Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products**. 2015.

AMRHEIN, Sven; SCHWAB, Marie-Luise; HOFFMANN, Marc; HUBBUCH, Jürgen. Characterization of aqueous two phase systems by combining lab-on-a-chip technology with robotic liquid handling stations. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1367, p. 68–77, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967314014575>.

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues. **Caracterização morfo-molecular de uma nova espécie do gênero Penicillium para a produção de L-asparaginase**. 2019. Dissertação - Universidade de Brasília, [S. l.], 2019.

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues. **L-Asparaginase tipo II de *Penicillium cerradense*: análises in silico e expressão heteróloga**. 2023. Tese - Universidade de Brasília, [S. l.], 2023.

ANDRADE, Kellen Cruvinel Rodrigues; HOMEM-DE-MELLO, Mauricio; MOTTA, Julia Almeida; BORGES, Marina Guimarães; DE ABREU, Joel Antônio Cordeiro; DE SOUZA, Paula Monteiro; PESSOA, Adalberto; PAPPAS, Georgios J.; DE OLIVEIRA MAGALHÃES, Pérola. A Structural In Silico Analysis of the Immunogenicity of L-Asparaginase from *Penicillium cerradense*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 25, n. 9, p. 4788, 2024. DOI: 10.3390/IJMS25094788/S1. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/9/4788/htm>. Acesso em: 20 set. 2024.

ANTOSOVA, Andrea; GANCAR, Miroslav; BEDNARIKOVA, Zuzana; MAREK, Jozef; BYSTRENOVA, Eva; GAZOVA, Zuzana. The influence of cations on α -lactalbumin amyloid aggregation. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 679–689, 2022. DOI: 10.1007/s00775-022-01962-3.

ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010**. Brasília (DF): Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2010.

ANVISA. **Consultas - Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. 2024. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/>. Acesso em: 6 nov. 2024.

ARAKAWA, Tsutomu; TIMASHEFF, Serge N. Mechanism of Protein Salting In and Salting Out by Divalent Cation Salts: Balance between Hydration and Salt Binding. **Biochemistry**, [S. l.], v. 23, n. 25, p. 5912–5923, 1984. DOI: 10.1021/BI00320A004/ASSET/BI00320A004.FP.PNG_V03. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00320a004>. Acesso em: 25 set. 2024.

ARAÚ, A. P. U.; OLIVA, G.; HENRIQUE-SILVA, F.; GARRATT, R. C.; CÁ, O.; BELTRAMINI, L. M. Influence of the Histidine Tail on the Structure and Activity of Recombinant Chlorocatechol 1,2-Dioxygenase. [S. l.], 2000. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2802. Disponível em: <http://www.idealibrary.com>. Acesso em: 25 set. 2024.

ARUMUGAM, Nagarajan; THANGAVELU, Perarasu. Purification and anticancer activity of glutaminase and urease free intracellular L-asparaginase from *Chaetomium* sp. **Protein Expression and Purification**, [S. l.], v. 190, p. 106006, 2022. DOI: 10.1016/J.PEP.2021.106006. Acesso em: 16 set. 2024.

ASSELIN, B. L.; WHITIN, J. C.; COPPOLA, D. J.; RUPP, I. P.; SALLAN, S. E.; COHEN, H. J. Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. <https://doi.org/10.1200/JCO.1993.11.9.1780>, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 1780–1786, 2016. DOI: 10.1200/JCO.1993.11.9.1780.

AVRAMIS, Vassilios I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer research**, [S. l.], v. 32, n. 7, p. 2423–2437, 2012.

AZIZI, Najmadin; BATEBI, Elham. Highly efficient deep eutectic solvent catalyzed ring opening of epoxides. **Catalysis Science & Technology**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. 2445–2448, 2012. DOI: 10.1039/C2CY20456H. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2012/cy/c2cy20456h>. Acesso em: 28 set. 2024.

BABOORAM, Keshwaree. Brief overview of polymer science. *Em*: NARAIN, Ravin (org.). **Polymer Science and Nanotechnology: Fundamentals and Applications**. 1. ed. Amsterdam: Matthew Deans, 2020. p. 3–12.

BACIU, Dora Domnica; DINU, Sorin; PALADE, Bianca; ONU, Adrian; COSTACHE, Adriana. Comparison of truncated human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2) expression in pET28a(+) versus pET-SUMO vector and two

Escherichia coli strains. **Advances in Medical Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 61–70, 2023. DOI: 10.1016/J.ADVMS.2023.01.001. Acesso em: 21 set. 2024.

BAGHBAN, Roghayyeh; FARAJNIA, Safar; GHASEMI, Younes; MORTAZAVI, Mojtaba; ZARGHAMI, Nosratollah; SAMADI, Naser. New Developments in Pichia pastoris Expression System, Review and Update. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [S. l.], v. 19, n. 6, p. 451–467, 2018. DOI: 10.2174/1389201019666180718093037. Acesso em: 28 abr. 2022.

BASKAR, Gurunathan; RENGANATHAN, Sahadevan. 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**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 212–220, 2012. DOI: 10.1002/APJ.520. Acesso em: 15 mar. 2023.

BATTOOL, Tahira; MAKKY, Essam A.; JALAL, Muna; YUSOFF, Mashitah M. A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016. DOI: 10.1007/S12010-015-1917-3/FIGURES/2.

BECK, Alain. Biosimilar, biobetter and next generation therapeutic antibodies. **mAbs**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 107–110, 2011. DOI: 10.4161/MABS.3.2.14785. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/mabs.3.2.14785>. Acesso em: 19 set. 2024.

BELCHIOR, Diana C. V.; FREIRE, Mara G. Simultaneous separation of egg white proteins using aqueous three-phase partitioning systems. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 336, p. 116245, 2021. DOI: 10.1016/j.molliq.2021.116245.

BESSETTE, Paul H.; ÅSLUND, Fredrik; BECKWITH, Jon; GEORGIU, George. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, [S. I.], v. 96, n. 24, p. 13703–13708, 1999. DOI: 10.1073/PNAS.96.24.13703. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10570136/>. Acesso em: 26 set. 2024.

BLUM, Helmut; BEIER, Hildburg; GROSS, Hans J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **ELECTROPHORESIS**, [S. I.], v. 8, n. 2, p. 93–99, 1987. DOI: 10.1002/ELPS.1150080203.

BOOTH, William T. et al. Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability. **ACS Omega**, [S. I.], v. 3, n. 1, p. 760–768, 2018. DOI: 10.1021/acsomega.7b01598.

BOREJDO, Julian; FLYNN, Carroll. Electrophoresis in the presence of Coomassie Brilliant Blue R-250 stains polyacrylamide gels during protein fractionation. **Analytical biochemistry**, [S. I.], v. 140, n. 1, p. 84–86, 1984.

BOREK, Dominika; JASKÓLSKI, Mariusz. Sequence analysis of enzymes with asparaginase activity. **Acta Biochimica Polonica**, [S. I.], v. 48, n. 4, p. 893–902, 2001. DOI: 10.18388/ABP.2001_3855.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [S. I.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1006/ABIO.1976.9999.

BRASIL. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - Rename — Ministério da Saúde**. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/relacao-nacional-de-medicamentos-essenciais>. Acesso em: 28 out. 2023.

BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle; SIEGEL, Rebecca L.; TORRE, Lindsey A.; JEMAL, Ahmedin. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36

cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. DOI: 10.3322/CAAC.21492.

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

BRUMANO, Larissa Pereira et al. Development of L-asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 6, n. JAN, p. 212, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2018.00212/BIBTEX. Acesso em: 5 abr. 2022.

BUELL, Alexander K.; HUNG, Peter; SALVATELLA, Xavier; WELLAND, Mark E.; DOBSON, Christopher M.; KNOWLES, Tuomas P. J. Electrostatic effects in filamentous protein aggregation. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 104, n. 5, p. 1116–1126, 2013. DOI: 10.1016/J.BPJ.2013.01.031/ASSET/92607616-5598-4AEC-8107-61D0DDFB2109/MAIN.ASSETS/GR4.JPG. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0006349513001367/fulltext>. Acesso em: 25 set. 2024.

BURGESS, Richard R. Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 463, n. C, p. 259–282, 2009. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63017-2.

BUTLER, Larry G. Enzymes in non-aqueous solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 253–259, 1979. DOI: 10.1016/0141-0229(79)90044-9. Acesso em: 10 ago. 2024.

CACHUMBA, Jorge Javier Muso; ANTUNES, Felipe Antonio Fernandes; PERES, Guilherme Fernando Dias; BRUMANO, Larissa Pereira; SANTOS, Júlio César Dos; DA SILVA, Silvio Silvério. Current applications and different approaches for microbial L-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 47, p. 77–85, 2016. DOI: 10.1016/J.BJM.2016.10.004.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/DPgVGPcH8sBfRsjhdnSW59y/>. Acesso em: 19 set. 2024.

CAMBRIDGE, Joshua M. et al. Genomics of *Clostridium taeniosporum*, an organism which forms endospores with ribbon-like appendages. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0189673. Disponível em: </pmc/articles/PMC5749712/>. Acesso em: 26 set. 2024.

CAMPBELL, H. A.; MASHBURN, L. T.; BOYSE, E. A.; OLD, L. J. Two L-asparaginases from *Escherichia coli* B. Their separation, purification, and antitumor activity. **Biochemistry**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 721–730, 1967. DOI: 10.1021/BI00855A011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5337885/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

CARDOSO, Samuel Leite. **Avaliação da produção de L-asparaginase por fungo isolado do solo do Cerrado brasileiro em meio contendo resíduo agroindustrial**. 2018. Dissertação - Universidade de Brasília, [S. l.], 2018.

CARDOSO, Samuel Leite. **Produção, purificação e caracterização de L-asparaginase de *Fusarium proliferatum* DCFS10 em sistemas de tecnologia recombinante de *Komagataella phaffii* (syn. *Pichia pastoris*)**. 2023. Tese - Universidade de Brasília, [S. l.], 2023.

CARDOSO, Samuel Leite et al. L-Asparaginase Type II from *Fusarium proliferatum*: Heterologous Expression and In Silico Analysis. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 2352, 2023.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 70, p. 181–184, 1967.

CHAGAS, Eliana P.; SODEK, Ladaslav. Purification and properties of asparaginase from the testa of immature seeds of pea (*Pisum sativum* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S. l.], v. 44, p. 239–245, 2001.

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

CHAKRAVARTY, Namrata; PRIYANKA; SINGH, Jyoti; SINGH, R. P. P. A potential type-II L-asparaginase from marine isolate *Bacillus australimaris* NJB19: Statistical optimization, in silico analysis and structural modeling. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 174, p. 527–539, 2021. . Acesso em: 21 fev. 2022.

CHAND, Subhash; MAHAJAN, Richi V.; PRASAD, Jai Prakash; SAHOO, Debendra K.; MIHOOLLIYA, Kanti Nandan; DHAR, Mahesh S.; SHARMA, Girish. A comprehensive review on microbial l-asparaginase: Bioprocessing, characterization, and industrial applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 619–647, 2020. DOI: 10.1002/BAB.1888.

CHEN, S. H.; PEI, D.; YANG, W.; CHENG, C.; JEHA, S.; COX, N. J.; EVANS, W. E.; PUI, C. H.; RELLING, M. V. Genetic Variations in GRIA1 on Chromosome 5q33 Related to Asparaginase Hypersensitivity. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 88, n. 2, p. 191–196, 2010. DOI: 10.1038/CLPT.2010.94. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/clpt.2010.94>. Acesso em: 21 set. 2024.

CHOI, Jong Hyun; KEUM, Ki Chang; LEE, Sang Yup. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 876–885, 2006. DOI: 10.1016/J.CES.2005.03.031.

CHOW, Yin Hui; YAP, Yee Jiun; TAN, Chin Ping; ANUAR, Mohd Shamsul; TEJO, Bimo Ario; SHOW, Pau Loke; ARIFF, Arbakariya Bin; NG, Eng Poh;

LING, Tau Chuan. Characterization of bovine serum albumin partitioning behaviors in polymer-salt aqueous two-phase systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 120, n. 1, p. 85–90, 2015. DOI: 10.1016/J.JBIOSEC.2014.11.021. Acesso em: 15 set. 2024.

CHUA, Leong Huat; TAN, Soo Choon; LIEW, Mervyn W. O. Process intensification of core streptavidin production through high-cell-density cultivation of recombinant *E. coli* and a temperature-based refolding method. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 276–277, p. 34–41, 2018. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2018.04.012. Acesso em: 20 set. 2024.

CLEMENTI, A. Presence of L-asparaginase in animals and its significance. **Archives International Physiol**, [S. l.], v. 19, p. 369–398, 1922.

CORRÊA, Carla Levi Oliveira; DAS MERCES PENHA, Edmar; DOS ANJOS, Marianna Ramos; PACHECO, Sidney; FREITAS-SILVA, Otaniel; LUNA, Aderval Severino; GOTTSCHALK, Leda Maria Fortes. Use of asparaginase for acrylamide mitigation in coffee and its influence on the content of caffeine, chlorogenic acid, and caffeic acid. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 338, p. 128045, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128045.

COSTA-SILVA, T. A.; COSTA, I. M.; BIASOTO, H. P.; LIMA, G. M.; SILVA, C.; PESSOA, A.; MONTEIRO, G. Critical overview of the main features and techniques used for the evaluation of the clinical applicability of L-asparaginase as a biopharmaceutical to treat blood cancer. **Blood Reviews**, [S. l.], v. 43, p. 100651, 2020. DOI: 10.1016/J.BLRE.2020.100651.

COSTA-SILVA, Tales A.; FLORES-SANTOS, Juan Carlos; FREIRE, Rominne K. B.; VITOLO, Michele; PESSOA-JR, Adalberto. Microbial cell disruption methods for efficient release of enzyme L-asparaginase. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S. l.], v. 48, n. 8, p. 707–717, 2018. DOI: 10.1080/10826068.2018.1487850. Acesso em: 1 dez. 2024.

CUTRIM, Flávia de Aquino; OLIVEIRA, Sônia M. A. Oliveira; DANTAS, Suzana Alencar Freire; SILVA, Roberto Luiz Xavier. Influência de meios de cultura e da interação carbono-nitrogênio no crescimento e esporulação de *Penicillium sclerotigenum*. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 85–88, 2006. DOI: 10.1590/S0100-54052006000100014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/c4Qd595R7PJ9gGs3LbHRTBG/>. Acesso em: 1 set. 2024.

DA SILVA, Leonardo Schultz; DOONAN, Liam B.; PESSOA, Adalberto; DE OLIVEIRA, Marcos Antonio; LONG, Paul F. Structural and functional diversity of asparaginases: Overview and recommendations for a revised nomenclature. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 503–513, 2021. DOI: 10.1002/BAB.2127. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bab.2127>. Acesso em: 4 jul. 2023.

DANTAS, Raquel Caminha R. C. et al. Expression of a recombinant bacterial l-asparaginase in human cells. **BMC Research Notes**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–6, 2019. DOI: 10.1186/S13104-019-4836-5/FIGURES/3. Disponível em: <https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-019-4836-5>. Acesso em: 23 fev. 2022.

DE ALMEIDA PARIZOTTO, Letícia et al. Increased glycosylated l-asparaginase production through selection of *Pichia pastoris* platform and oxygen-methanol control in fed-batches. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 173, p. 108083, 2021. DOI: 10.1016/J.BEJ.2021.108083. Acesso em: 28 abr. 2022.

DE ARAUJO SAMPAIO, Daniela; MAFRA, Luciana Igarashi; YAMAMOTO, Carlos Itsuo; DE ANDRADE, Eriel Forville; DE SOUZA, Michèle Oberson; MAFRA, Marcos Rogério; DE CASTILHOS, Fernanda. Aqueous two-phase (polyethylene glycol+sodium sulfate) system for caffeine extraction: Equilibrium diagrams and partitioning study. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, [S. l.], v. 98, p. 86–94, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2016.03.004>.

Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021961416000811>.

DE BERNARDEZ CLARK, Eliana; HEVEHAN, Diane; SZELA, Sandra; MAACHUPALLI-REDDY, Jhansi. Oxidative renaturation of hen egg-white lysozyme. Folding vs aggregation. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 47–54, 1998. DOI: 10.1021/bp970123w. Acesso em: 21 set. 2024.

DE MARCO, Ario et al. Bacterial inclusion bodies are industrially exploitable amyloids. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 53–72, 2019. DOI: 10.1093/FEMSRE/FUY038. Disponível em:
<https://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy038>. Acesso em: 20 set. 2024.

DEMAIN, Arnold L.; VAISHNAV, Preeti. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology advances**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009. DOI: 10.1016/J.BIOTECHADV.2009.01.008.

DEREWENDA, Zygmunt S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 354–363, 2004. DOI: 10.1016/j.ymeth.2004.03.024. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15325653/>. Acesso em: 25 set. 2024.

DHEVENDARAN, K.; ANNIE, K. Antibiotic and L-asparaginase activity of streptomycetes isolated from fish, shellfish and sediment of Veli estuarine lake along Kerala coast. [S. l.], 1999.

DIAZ, Ana Belen; BLANDINO, Ana; WEBB, Colin; CARO, Ildefonso. Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 100, n. 22, p. 9555–9566, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7629-y.

DOPP, Jared L.; REUEL, Nigel F. Process optimization for scalable E. coli extract preparation for cell-free protein synthesis. **Biochemical Engineering**

Journal, [S. l.], v. 138, p. 21–28, 2018. DOI: 10.1016/J.BEJ.2018.06.021. Acesso em: 10 out. 2022.

DOUKYU, Noriyuki; KUWAHARA, Hirokazu; AONO, Rikizo. Isolation of *Paenibacillus illinoisensis* That Produces Cyclodextrin Glucanotransferase Resistant to Organic Solvents. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [S. l.], v. 67, n. 2, p. 334–340, 2003. DOI: 10.1271/BBB.67.334. Acesso em: 10 ago. 2024.

DOUKYU, Noriyuki; OGINO, Hiroyasu. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 270–282, 2010. DOI: 10.1016/J.BEJ.2009.09.009. Acesso em: 10 ago. 2024.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**, [S. l.], v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977. DOI: 10.1099/00221287-98-2-493/CITE/REFWORKS.

D'SOUZA, Anisha A.; SHEGOKAR, Ranjita. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 1257–1275, 2016. DOI: 10.1080/17425247.2016.1182485.

DUMINA, M. V. V.; ZHGUN, A. A. A.; POKROVSKAY, M. V. V.; ALEKSANDROVA, S. S. S.; ZHDANOV, D. D. D.; SOKOLOV, N. N. N.; EL'DAROV, M. A. A. Comparison of Enzymatic Activity of Novel Recombinant L-asparaginases of Extremophiles. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 5, p. 594–602, 2021. DOI: 10.1134/S0003683821050057. Acesso em: 23 fev. 2022.

DUNLOP, P. C.; ROON, R. J. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 122, n. 3, p. 1017, 1975. DOI: 10.1128/JB.122.3.1017-1024.1975.

ECCLES, Sarah. Development of Expression Systems for Eukaryotic Proteins in *E. coli* and Mammalian cells. *Em*: SHEWRY, P. R.; GUTTERIDGE, S. (org.). **Plant Protein Engineering**. 1st. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. p. 3–16.

EFFER, Brian; LIMA, Guilherme Meira; CABARCA, Sindy; PESSOA, Adalberto; FARÍAS, Jorge G.; MONTEIRO, Gisele. L-Asparaginase from *E. chrysanthemi* expressed in glycoswitch®: effect of His-Tag fusion on the extracellular expression. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 49, n. 7, p. 679–685, 2019. DOI: 10.1080/10826068.2019.1599396. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826068.2019.1599396>. Acesso em: 21 fev. 2022.

EISELE, Nadine; LINKE, Diana; BITZER, Katrin; NA'AMNIEH, Shukry; NIMTZ, Manfred; BERGER, Ralf G. The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 3316–3321, 2011. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2010.10.098. Acesso em: 1 out. 2024.

EL-BATTARI, Assou; PROROK, Maëlle; ANGATA, Kiyohiko; MATHIEU, Sylvie; ZERFAOUI, Mourad; ONG, Edgar; SUZUKI, Misa; LOMBARDO, Dominique; FUKUDA, Minoru. Different glycosyltransferases are differentially processed for secretion, dimerization, and autoglycosylation. **Glycobiology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 941–953, 2003. DOI: 10.1093/GLYCOB/CWG117. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14514709/>. Acesso em: 26 set. 2024.

EL-GENDI, Hamada; SALEH, Ahmed K.; BADIERAH, Raied; REDWAN, Elrashdy M.; EL-MARADNY, Yousra A.; EL-FAKHARANY, Esmail M. A Comprehensive Insight into Fungal Enzymes: Structure, Classification, and Their Role in Mankind's Challenges. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2022. DOI: 10.3390/JOF8010023. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8778853/](https://pmc/articles/PMC8778853/). Acesso em: 1 set. 2024.

EL-NAGGAR, N. E.; EL-EWASY, Sara M.; EL-SHWEIHY, Nancy M. Microbial L-asparaginase as a potential therapeutic agent for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the pros and cons. **Int J Pharmacol**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 182–199, 2014.

EMADI, A.; LAW, J. Y. **Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) - Hematology and Oncology - MSD Manual Professional Edition**. 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/professional/hematology-and-oncology/leukemias/acute-lymphoblastic-leukemia-all>. Acesso em: 6 out. 2022.

EMOND, Stéphane; MONDEIL, Sophie; JAZIRI, Kais; ANDRÉ, Isabelle; MONSAN, Pierre; REMAUD-SIMÉON, Magali; POTOCKI-VÉRONÈSE, Gabrielle. Cloning, purification and characterization of a thermostable amylosucrase from *Deinococcus geothermalis*. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 285, n. 1, p. 25–32, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01204.x. Acesso em: 25 set. 2024.

EVANS, William E.; RIVERA, Gaston; MURPHY, Sharon B.; DAHL, Gary V; DENISON, Marilyn; CROM, William R.; BARKER, Larry F.; MAUER, Alvin M. Anaphylactoid Reactions to *Escherichia Coli* and *Erwinia Asparaginase* in Children with Leukemia and Lymphoma. [S. l.], 1980. DOI: 10.1002/1097-0142.

FEKETE, Szabolcs; BECK, Alain; VEUTHEY, Jean Luc; GUILLARME, Davy. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [S. l.], v. 113, p. 43–55, 2015. DOI: 10.1016/J.JPBA.2015.02.037. Acesso em: 1 out. 2024.

FERDOUS, Sakib; DOPP, Jared L.; REUEL, Nigel F. Optimization of *E. coli* tip-sonication for high-yield cell-free extract using finite element modeling. **AICHe Journal**, [S. l.], v. 67, n. 10, p. e17389, 2021. DOI: 10.1002/AIC.17389.

FERLAY, J.; STELIAROVA-FOUCHER, E.; LORTET-TIEULENT, J.; ROSSO, S.; COEBERGH, J. W. W.; COMBER, H.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 1374–1403, 2013. DOI: 10.1016/J.EJCA.2012.12.027.

FERREIRA, Luisa A.; UVERSKY, Vladimir N.; ZASLAVSKY, Boris Y. Phase equilibria, solvent properties, and protein partitioning in aqueous polyethylene glycol-600-trimethylamine N-oxide and polyethylene glycol-600-choline chloride two-phase systems. **Journal of chromatography. A**, [S. l.], v. 1535, p. 154–161, 2018. DOI: 10.1016/J.CHROMA.2018.01.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29307533/>. Acesso em: 13 set. 2024.

FIOCRUZ. **Ministério da Saúde garante medicamento contra leucemia infantil**. 2013. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/minist%C3%A9rio-da-sa%C3%BAde-garante-medicamento-contr-leucemia-infantil>. Acesso em: 28 out. 2023.

FLORES, Sandra S.; NOLAN, Verónica; PERILLO, María A.; SÁNCHEZ, Julieta M. Superactive β -galactosidase inclusion bodies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 173, p. 769–775, 2019. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2018.10.049. Acesso em: 20 set. 2024.

FONSECA, Marcela Helena Gambim; DA SILVA FIÚZA, Tayná; DE MORAIS, Stephanie Bath; TREVIZANI, Raphael. Circumventing the side effects of L-asparaginase. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 139, p. 111616, 2021.

FREITAS, M. M. **Produção e purificação de L-Asparaginase por fungos filamentosos isolados do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro**. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

FREITAS, Marcela et al. Filamentous Fungi Producing L-Asparaginase with Low Glutaminase Activity Isolated from Brazilian Savanna Soil. **Pharmaceutics** **2021**, Vol. **13**, Page **1268**, [S. l.], v. 13, n. 8, p. 1268, 2021. DOI: 10.3390/PHARMACEUTICS13081268.

FREITAS, Marcela et al. L-Asparaginase from *Penicillium sizovae* Produced by a Recombinant *Komagataella phaffii* Strain. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 746, 2022. DOI: 10.3390/PH15060746.

FRIED, Joel R. Introduction to Polymer Science. *Em*: PEARSON EDUCATION INC. (org.). **Polymer Science & Technology**. 3. ed. Westford, MA: Prentice Hall, 2014. p. 1–24.

GALLOWAY, Chad A.; SOWDEN, Mark P.; SMITH, Harold C. Increasing the Yield of Soluble Recombinant Protein Expressed in *E. coli* by Induction during Late Log Phase. <https://doi.org/10.2144/03343st04>, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 524–530, 2018. DOI: 10.2144/03343ST04.

GANDÍA, Mónica; GARRIGUES, Sandra. Filamentous Fungi as Excellent Industrial Strains: Development and Applications. **Journal of Fungi** **2024**, Vol. **10**, Page **541**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. 541, 2024. DOI: 10.3390/JOF10080541. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/10/8/541/htm>. Acesso em: 1 set. 2024.

GARCÍA-FRUITÓS, Elena; VÁZQUEZ, Esther; DÍEZ-GIL, César; CORCHERO, José Luis; SERAS-FRANZOSO, Joaquin; RATERA, Imma; VECIANA, Jaume; VILLAVERDE, Antonio. Bacterial inclusion bodies: Making gold from waste. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 65–70, 2012. DOI: 10.1016/j.tibtech.2011.09.003. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0167779911001685/fulltext>. Acesso em: 20 set. 2024.

GECIOVA, Jana; BURY, Dean; JELEN, Paul. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 541–553, 2002.

GLYK, Anna; SCHEPER, Thomas; BEUTEL, Sascha. Influence of different phase-forming parameters on the phase diagram of several PEG-salt aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical and Engineering Data**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 850–859, 2014. DOI: 10.1021/JE401002W/SUPPL_FILE/JE401002W_SI_001.PDF. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/je401002w>. Acesso em: 11 ago. 2024.

GOLDBERG, Stanley. Mechanical/Physical Methods of Cell Distribution and Tissue Homogenization. Em: POSCH, Anton (org.). **Proteomic Profiling: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 1–20. DOI: 10.1007/978-1-4939-2550-6_1. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2550-6_1.

GOMES, Tatiane Aparecida; ZANETTE, Cristina Maria; SPIER, Michele Rigon. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. **Preparative biochemistry & biotechnology**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 635–654, 2020.

GOODSELL, David S. The Molecular Perspective: L-Asparaginase. **STEM CELLS**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 710–711, 2005. DOI: 10.1634/STEMCELLS.FCM3. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1634/stemcells.FCM3>. Acesso em: 21 jul. 2024.

GOPAL, Gopal Jee; KUMAR, Awanish. Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli. **Protein Journal**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 419–425, 2013. DOI: 10.1007/S10930-013-9502-5/FIGURES/2.

GOSSE, Marilyn E.; PADMANABHAN, Anita; FLEISCHMANN, Robert D.; GOTTESMAN, Michael M. Expression of Chinese hamster cAMP-dependent

protein kinase in *Escherichia coli* results in growth inhibition of bacterial cells: a model system for the rapid screening of mutant type I regulatory subunits.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [S. l.], v. 90, n. 17, p. 8159–8163, 1993. DOI: 10.1073/PNAS.90.17.8159. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8396261/>. Acesso em: 26 set. 2024.

GREEN, Rachel; ROGERS, Elizabeth J. Transformation of Chemically Competent *E. coli*. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 529, p. 329–336, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00028-8.

GUAJARDO, Nadia; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, Habil Pablo; AHUMADA, Katherine; SCHREBLER, Rodrigo A.; RAMÍREZ-TAGLE, Rodrigo; CRESPO, Fernando A.; CARLESI, Carlos. Water as Cosolvent: Nonviscous Deep Eutectic Solvents for Efficient Lipase-Catalyzed Esterifications. **ChemCatChem**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1393–1396, 2017. DOI: 10.1002/CCTC.201601575. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cctc.201601575>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GUAJARDO, Nadia; MÜLLER, Christoph R.; SCHREBLER, Rodrigo; CARLESI, Carlos; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, Pablo. Deep Eutectic Solvents for Organocatalysis, Biotransformations, and Multistep Organocatalyst/Enzyme Combinations. **ChemCatChem**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1020–1027, 2016. DOI: 10.1002/CCTC.201501133. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cctc.201501133>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GUAJARDO, Nadia; SCHREBLER, Rodrigo A. Upstream and Downstream Bioprocessing in Enzyme Technology. **Pharmaceutics 2024, Vol. 16, Page 38**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 38, 2023. DOI: 10.3390/PHARMACEUTICS16010038. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/16/1/38/htm>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GUIMARÃES, Luis Henrique S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, Simone C.; MICHELIN, Michele; RIZZATTI, Ana Carolina S.; SANDRIM, Valéria C.; ZANOELO, Fabiana F.; AQUINO, Ana Carla M. M.; JUNIOR, Altino B.; POLIZELI, Maria De Lourdes T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 474–480, 2006. DOI: 10.1590/S1517-83822006000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/MrM9QxGNNn4cyNdXTGv3Rhh/?lang=en>. Acesso em: 10 ago. 2024.

GUO, Hwai-Chen; XU, Qian; BUCKLEY, Deirdre; GUAN, Chudi. Crystal Structures of Flavobacterium Glycosylasparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 32, p. 20205–20212, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.32.20205. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925818490473/fulltext>. Acesso em: 29 jun. 2023.

GUO, Li; WANG, Jinhua; YAN, Xiyun; CHEN, Runsheng; QIAN, Shijun; MENG, Guangzhen. Characterization of L-Asparaginase Fused with a Protective ScFv and the Protection Mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 276, n. 1, p. 197–203, 2000. DOI: 10.1006/BBRC.2000.3434. Acesso em: 20 set. 2024.

GUPTA, Anshu; KHARE, S. K. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 42, n. 1, p. 11–16, 2007. DOI: 10.1016/J.ENZMICTEC.2007.07.019. Acesso em: 10 ago. 2024.

GURUNATHAN, Baskar; SAHADEVAN, Renganathan. Design of experiments and artificial neural network linked genetic algorithm for modeling and optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, [S. l.], v. 16, p. 50–58, 2011.

GURUNATHAN, Baskar; SAHADEVAN, Renganathan. Optimization of Culture Conditions and Bench-Scale Production of L-Asparaginase by Submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **J. Microbiol. Biotechnol.**, [S. l.], v. 22, n. 7, p. 923–929, 2012. DOI: 10.4014/JMB.1112.12002.

HAMILTON, Stephen R. et al. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. **Science**, [S. l.], v. 313, n. 5792, p. 1441–1443, 2006. DOI: 10.1126/SCIENCE.1130256/SUPPL_FILE/HAMILTON_SOM.PDF. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1130256>. Acesso em: 28 abr. 2022.

HAMORSKY, Krystal Teasley; KOUOKAM, J. Calvin; JURKIEWICZ, Jessica M.; NELSON, Bailey; MOORE, Lauren J.; HUSK, Adam S.; KAJIURA, Hiroyuki; FUJIYAMA, Kazuhito; MATOBA, Nobuyuki. N-Glycosylation of cholera toxin B subunit in *Nicotiana benthamiana*: impacts on host stress response, production yield and vaccine potential. **Scientific Reports 2015 5:1**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015. DOI: 10.1038/srep08003. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep08003>. Acesso em: 28 abr. 2022.

HANNIG, Gerhard; MAKRIDES, Savvas C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01155-4.

HAUSJELL, Johanna; WEISSENSTEINER, Julia; MOLITOR, Christian; HALBWIRTH, Heidi; SPADIUT, Oliver. *E. coli* HMS174(DE3) is a sustainable alternative to BL21(DE3). **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1186/S12934-018-1016-6/TABLES/3.

HAYAT, Seyed M. G.; FARAHANI, Najmeh; GOLICHENARI, Behrouz; SAHEBKAR, Amirhossein. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current pharmaceutical design**, [S. l.], v. 24, n. 6, p. 718–725, 2018.

HEITINK-POLLÉ, Katja M. J.; PRINSEN, Berthil H. C. M. T.; DE KONING, Tom J.; VAN HASSELT, Peter M.; BIERINGS, Marc B. High incidence of symptomatic hyperammonemia in children with acute lymphoblastic leukemia receiving pegylated asparaginase. **JIMD Reports**, [S. l.], v. 7, p. 103–108, 2013. DOI: 10.1007/8904_2012_156/COVER.

HENDRIKSEN, Hanne V.; KORNBRUST, Beate A.; ØSTERGAARD, Peter R.; STRINGER, Mary A. Evaluating the Potential for Enzymatic Acrylamide Mitigation in a Range of Food Products Using an Asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 57, n. 10, p. 4168–4176, 2009. DOI: 10.1021/jf900174q.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004. DOI: 10.1007/s00253-003-1504-3.

HOLLE, Lisa M. Pegaspargase: An alternative? **Annals of Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 616–624, 1997. DOI: 10.1177/106002809703100517. Acesso em: 18 set. 2024.

HORCHANI, Habib; OUERTANI, Selmene; GARGOURI, Youssef; SAYARI, Adel. The N-terminal His-tag and the recombination process affect the biochemical properties of *Staphylococcus aureus* lipase produced in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S. l.], v. 61, n. 3–4, p. 194–201, 2009. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.07.002.

HORCHANI, Habib; SABRINA, Lignon; RÉGINE, Lebrun; SAYARI, Adel; GARGOURI, Youssef; VERGER, Robert. Heterologous expression and N-terminal His-tagging processes affect the catalytic properties of staphylococcal lipases: A monolayer study. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.],

v. 350, n. 2, p. 586–594, 2010. DOI: 10.1016/J.JCIS.2010.07.021. Acesso em: 25 set. 2024.

HUANG, Linhua; LIU, Yu; SUN, Yan; YAN, Qiaojuan; JIANG, Zhengqiang. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 80, n. 5, p. 1561–1569, 2014. DOI: 10.1128/AEM.03523-13/SUPPL_FILE/ZAM999105155SO1.PDF. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.03523-13>. Acesso em: 8 abr. 2022.

HUERTA-ZEPEDA, Alejandra; ORTUÑO, Leobardo; DU PONT, Gisela; DURÁN, Socorro; LLORET, Alejandro; MERCHANT-LARIOS, Horacio; CALDERÓN, Jorge. Isolation and characterization of *Rhizobium etli* mutants altered in degradation of asparagine. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 179, n. 6, p. 2068–2072, 1997. DOI: 10.1128/JB.179.6.2068-2072.1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9068657/>. Acesso em: 30 jun. 2023.

IDT. **OligoAnalyzer Tool - primer analysis**. 2022. Disponível em: <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer?returnurl=%2Fcalc%2Falyzer>. Acesso em: 17 ago. 2022.

INABA, Hiroto; PUI, Ching Hon. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Medicine** 2021, Vol. 10, Page 1926, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1926, 2021. DOI: 10.3390/JCM10091926.

INCA. **Leucemias (taxas brutas)**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-brutas/leucemias>. Acesso em: 6 abr. 2022.

INCA. **Leucemia**. 2022a. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/leucemia>. Acesso em: 5 out. 2022.

INCA. **Atlas On-line de Mortalidade**. 2022b. Disponível em: <https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>. Acesso em: 6 out. 2022.

ISLAM, Mohammed Shehadul; ARYASOMAYAJULA, Aditya; SELVAGANAPATHY, Ponnambalam Ravi. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. **Micromachines** 2017, Vol. 8, Page 83, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 83, 2017. DOI: 10.3390/MI8030083.

ITO, Takeshi; KIKUTA, Hirokazu; NAGAMORI, Eiji; HONDA, Hiroyuki; OGINO, Hiroyasu; ISHIKAWA, Haruo; KOBAYASHI, Takeshi. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 91, n. 3, p. 245–250, 2001. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80128-6. Acesso em: 10 ago. 2024.

IZADPANA, Fatemeh; HOMAEL, Ahmad; FERNANDES, Pedro; JAVADPOUR, Sedigheh. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. **Microbiological Research**, [S. l.], v. 208, p. 99–112, 2018. DOI: 10.1016/J.MICRES.2018.01.011. Acesso em: 9 out. 2022.

IZADPANA QESHMI, Fatemeh; HOMAEL, Ahmad; KHAJEH, Khosro; KAMRANI, Ehsan; FERNANDES, Pedro. Production of a Novel Marine *Pseudomonas aeruginosa* Recombinant L-Asparaginase: Insight on the Structure and Biochemical Characterization. **Marine biotechnology (New York, N.Y.)**, [S. l.], 2022. DOI: 10.1007/s10126-022-10129-9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35507234>. Acesso em: 15 jun. 2022.

JABBOUR, Elias; O'BRIEN, Susan; KONOPLEVA, Marina; KANTARJIAN, Hagop. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute

lymphoblastic leukemia. **Cancer**, [S. l.], v. 121, n. 15, p. 2517–2528, 2015. DOI: 10.1002/CNCR.29383.

JEBUR, Iman Mohammed; NAJAF, Karrar Najim; ALI, Hayder Hasan Rajab; IBRAHIM, Mohammed Suad. Cloning and expression of L-Asparaginase gene from *Aspergillus terreus* in *E. coli*. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 961–965, 2019.

JIA, Ruiying; WAN, Xiao; GENG, Xu; XUE, Deming; XIE, Zhenxing; CHEN, Chaoran. Microbial L-asparaginase for Application in Acrylamide Mitigation from Food: Current Research Status and Future Perspectives. **Microorganisms**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 1659, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9081659.

JOHANSSON, Hans Olof; KARLSTRÖM, Gunnar; TJERNELD, Folke; HAYNES, Charles A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, [S. l.], v. 711, n. 1–2, p. 3–17, 1998. DOI: 10.1016/S0378-4347(97)00585-9. Acesso em: 15 set. 2024.

JÜRGEN, Britta; BREITENSTEIN, Antje; URLACHER, Vlada; BÜTTNER, Knut; LIN, Hongying; HECKER, Michael; SCHWEDER, Thomas; NEUBAUER, Peter. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–13, 2010. DOI: 10.1186/1475-2859-9-41/FIGURES/8. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-9-41>. Acesso em: 20 set. 2024.

KANG, Beibei; TANG, Huicheng; ZHAO, Zengdian; SONG, Shasha. Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property. **ACS Omega**, [S. l.], v. 5, n. 12, p. 6229–6239, 2020. DOI: 10.1021/ACSOMEGA.0C00237/SUPPL_FILE/AO0C00237_SI_001.PDF. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acsomega.0c00237>. Acesso em: 25 set. 2024.

KANGO, Naveen; JANA, Uttam Kumar; CHOUKADE, Ritumbhara. Fungal Enzymes: Sources and Biotechnological Applications. *Em*: SATYANARAYANA, Tulasi; DESHMUKH, Sunil Kumar; DESHPANDE, Mukund V. (org.). **Advancing Frontiers in Mycology & Mycotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 515–538. DOI: 10.1007/978-981-13-9349-5.

KANTE, Rajesh Kumar; VEMULA, Sandeep; SOMAVARAPU, Silpa; MALLU, Maheswara Reddy; BOJE GOWD, B. H.; RONDA, Srinivasa Reddy. Optimized upstream and downstream process conditions for the improved production of recombinant human asparaginase (rhASP) from *Escherichia coli* and its characterization. **Biologicals**, [S. l.], v. 56, p. 45–53, 2018. DOI: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2018.10.002. Acesso em: 20 set. 2024.

KARKAŞ, Taylan; ÖNAL, Seçil. Characteristics of invertase partitioned in poly(ethylene glycol)/magnesium sulfate aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 60, p. 142–150, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.11.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X11002981>.

KEATING, Michael J.; HOLMES, Romaine; LERNER, Susan; HO, Dah Hsi. L-Asparaginase and PEG Asparaginase— Past, Present, and Future. **Leukemia & Lymphoma**, [S. l.], v. 10, n. S1, p. 153–157, 2009. DOI: 10.3109/10428199309149129.

KELLEY, R. F.; WINKLER, M. E. Folding of eukaryotic proteins produced in *Escherichia coli*. **Genetic engineering**, [S. l.], v. 12, p. 1–19, 1990. DOI: 10.1007/978-1-4613-0641-2_1/COVER. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4613-0641-2_1. Acesso em: 25 out. 2023.

KHOW, Orawan; SUNTRARACHUN, Sunutcha. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal**

of **Tropical Biomedicine**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 159–162, 2012. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60213-X. Acesso em: 25 set. 2024.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 98, p. 565–582, 1953.

KIRIENKO, N. V.; LEPIKHOV, K. A.; ZHELEZNAYA, L. A.; MATVIENKO, N. I. Significance of codon usage and irregularities of rare codon distribution in genes for expression of BsPLU11III methyltransferases. **Biochemistry (Moscow)**, [S. l.], v. 69, n. 5, p. 527–535, 2004. DOI: 10.1023/B:BIRY.0000029851.96180.92/METRICS. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/B:BIRY.0000029851.96180.92>. Acesso em: 26 set. 2024.

KLIBANOV, Alexander. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 97–101, 1997. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01013-5. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0167779997010135/fulltext>. Acesso em: 28 set. 2024.

KLOOS, Robin Q. H.; UYL-DE GROOT, Carin A.; VAN LITSENBURG, Raphaële R. L.; KASPERS, Gertjan J. L.; PIETERS, Rob; VAN DER SLUIS, Inge M. A cost analysis of individualized asparaginase treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric blood & cancer**, [S. l.], v. 64, n. 12, 2017. DOI: 10.1002/PBC.26651. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28766887/>. Acesso em: 20 jul. 2024.

KORNBRUST, Beate A.; STRINGER, Mary Ann; LANGE, Niels Erik Krebs; HENDRIKSEN, Hanne Vang; WHITEHURST, R.; OORT, M. V. Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products. **Enzymes in food technology**, [S. l.], v. 2, p. 59–87, 2009.

KRALL, Abigail S.; XU, Shili; GRAEBER, Thomas G.; BRAAS, Daniel; CHRISTOFK, Heather R. Asparagine promotes cancer cell proliferation through use as an amino acid exchange factor. **Nature Communications** **2016** **7:1**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1038/ncomms11457.

KRISHNAPURA, Prajna Rao; BELUR, Prasanna D.; SUBRAMANYA, Sandeep. A critical review on properties and applications of microbial l-asparaginases. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2015.1022505>, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 720–737, 2015. DOI: 10.3109/1040841X.2015.1022505.

KULA, Maria-Regina; SCHÜTTE, Horst. Purification of proteins and the disruption of microbial cells. **Biotechnology Progress**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 31–42, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** **1970** **227:5259**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: 10.1038/227680a0.

LANG, S. Über desamidierung im Tierkörper. **Beitr chem Physiol Pathol**, [S. l.], v. 5, p. 321–345, 1904.

LAPMAK, Kodchakorn; LUMYONG, Saisamorn; THONGKUNTHA, Sutheera; WONGPUTTISIN, Pairote; SARDSUD, Uraporn. L-asparaginase production by *Bipolaris* sp. BR438 isolated from brown rice in Thailand. **Chiang Mai J Sci**, [S. l.], v. 37, p. 160–164, 2010.

LEFIN, Nicolás; MIRANDA, Javiera; BELTRÁN, Jorge F.; BELÉN, Lisandra Herrera; EFFER, Brian; PESSOA, Adalberto; FARIAS, Jorge G.; ZAMORANO, Mauricio. Current state of molecular and metabolic strategies for the improvement of L-asparaginase expression in heterologous systems. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 14, p. 1208277, 2023. DOI: 10.3389/FPHAR.2023.1208277/BIBTEX. Acesso em: 19 set. 2024.

LEVY, Raphael; WEISS, Robert; CHEN, Gang; IVERSON, Brent L.; GEORGIU, George. Production of correctly folded Fab antibody fragment in the cytoplasm of *Escherichia coli* *trxB* *gor* mutants via the coexpression of molecular chaperones. **Protein expression and purification**, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 338–347, 2001. DOI: 10.1006/PREP.2001.1520. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11676610/>. Acesso em: 26 set. 2024.

LI, Ruo Jing et al. FDA approval summary: Calaspargase Pegol-mknl for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Young Adults. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 328–331, 2020. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1255/75395/AM/FDA-APPROVAL-SUMMARY-CALASPARGASE-PEGOL-MKNL-FOR.

LI, X. Xu et al. Simultaneous cell disruption and semi-quantitative activity assays for high-throughput screening of thermostable L-asparaginases. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2018. . Acesso em: 23 fev. 2022.

LI, Xu et al. Design of a high-efficiency synthetic system for L-asparaginase production in *Bacillus subtilis*. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 229–239, 2019. DOI: 10.1002/ELSC.201800166. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/elsc.201800166>. Acesso em: 20 set. 2024.

LI, Yi; BEITL, Robert R. Protein Purification via Aqueous Two-Phase Extraction (ATPE) and Immobilized Metal Affinity Chromatography. Effectiveness of Salt Addition To Enhance Selectivity and Yield of GFPuv. [S. l.], 2002. DOI: 10.1021/bp025526x. Disponível em: <https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1021/bp025526x>. Acesso em: 1 out. 2024.

LIMA, Carolina A.; JÚNIOR, Augusto CV Freitas; FILHO, José L. Lima; CONVERTI, Attilio; MARQUES, Daniela A. Viana; CARNEIRO-DA-CUNHA, Maria G.; PORTO, Ana Lúcia F. Two-phase partitioning and partial

characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 75, p. 64–71, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.012>.

LIMA, Guilherme Meira; EFFER, Brian; BIASOTO, Henrique Pellin; FEIJOLI, Veronica; PESSOA, Adalberto; PALMISANO, Giuseppe; MONTEIRO, Gisele. Glycosylation of L-asparaginase from *E. coli* through yeast expression and site-directed mutagenesis. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 156, p. 107516, 2020. DOI: 10.1016/J.BEJ.2020.107516.

LIMA, Raul Alcântara Teixeira. **Caracterização bioquímica e biofísica de uma β -glicosidase obtida do metagenoma de intestino de *Syntermes wheeleri***. 2019. Universidade de Brasília, [S. l.], 2019.

LINDSAY, Robert C.; JANG, Sungjoon. Chemical Intervention Strategies for Substantial Suppression of Acrylamide Formation in Fried Potato Products. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 561, p. 393–404, 2005. DOI: 10.1007/0-387-24980-X_30.

LING, Jordy Kim Ung; HADINOTO, Kunn. Deep eutectic solvent as green solvent in extraction of biological macromolecules: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 3381, 2022.

LIU, Xuanting; ZHANG, Wenqi; LIU, Jingbo; PEARCE, Robin; ZHANG, Yang; ZHANG, Kangxin; RUAN, Qingyang; YU, Yiding; LIU, Boqun. Mg 2p inhibits heat-induced aggregation of BSA: The mechanism and its binding site. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 101, p. 105450, 2020. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105450. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105450>. Acesso em: 24 set. 2024.

LIU, Yuan; GUAN, Chudi; ARONSON, Nathan N. Site-directed mutagenesis of essential residues involved in the mechanism of bacterial glycosylasparaginase. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 273, n. 16, p. 9688–9694, 1998.

DOI: 10.1074/jbc.273.16.9688. Disponível em: <http://www.jbc.org/article/S0021925818461868/fulltext>. Acesso em: 29 jun. 2023.

LOCH, Joanna I.; JASKOLSKI, Mariusz. Structural and biophysical aspects of L-asparaginases: a growing family with amazing diversity. **IUCrJ**, [S. l.], v. 8, n. Pt 4, p. 514–531, 2021. DOI: 10.1107/S2052252521006011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34258001/>. Acesso em: 29 jun. 2023.

LOPES, André Moreni et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 82–99, 2017. DOI: 10.3109/07388551.2015.1120705. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1120705>.

LÓPEZ-LAGUNA, Hèctor; SÁNCHEZ, Julieta; UNZUETA, Ugutz; MANGUES, Ramón; VÁZQUEZ, Esther; VILLAVERDE, Antonio. Divalent Cations: A Molecular Glue for Protein Materials. **Trends in Biochemical Sciences**, [S. l.], v. 45, n. 11, p. 992–1003, 2020. DOI: 10.1016/j.tibs.2020.08.003.

LOUGH, Tony J.; REDDINGTON, Brett D.; GRANT, Murray R.; HILL, Diana F.; REYNOLDS, Paul H. S.; FARNDEN, Kevin J. F. The isolation and characterisation of a cDNA clone encoding L-asparaginase from developing seeds of lupin (*Lupinus arboreus*). **Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 391–399, 1992. DOI: 10.1007/BF00023386/METRICS. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00023386>. Acesso em: 3 jul. 2023.

MAESE, Luke; RAU, Rachel E. Current Use of Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoblastic Lymphoma. **Frontiers in Pediatrics**, [S. l.], v. 10, 2022. DOI: 10.3389/fped.2022.902117.

MAGRI, Agnes; PECORARI, Thainá; PEREIRA, Matheus M.; CILLI, Eduardo M.; GREAVES, Tamar L.; PEREIRA, Jorge F. B. Enhancing the Biocatalytic Activity of L-Asparaginase Using Aqueous Solutions of Cholinium-Based Ionic Liquids.

ACS Sustainable Chemistry and Engineering, [S. l.], v. 7, n. 24, p. 19720–19731, 2019. DOI: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B04931/SUPPL_FILE/SC9B04931_SI_001.PDF.

MAGRI, Agnes; PIMENTA, Marcela V.; SANTOS, João H. P. M.; COUTINHO, João A. P.; VENTURA, Sónia P. M.; MONTEIRO, Gisele; RANGEL-YAGUI, Carlota O.; PEREIRA, Jorge F. B. Controlling the L-asparaginase extraction and purification by the appropriate selection of polymer/salt-based aqueous biphasic systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, [S. l.], v. 95, n. 4, p. 1016–1027, 2020. DOI: 10.1002/JCTB.6281.

MAGRI, Agnes; SOLER, Matheus F.; LOPES, André M.; CILLI, Eduardo M.; BARBER, Patrick S.; PESSOA, Adalberto; PEREIRA, Jorge F. B. A critical analysis of L-asparaginase activity quantification methods—colorimetric methods versus high-performance liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 410, n. 27, p. 6985–6990, 2018. DOI: 10.1007/S00216-018-1326-X/FIGURES/2. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-018-1326-x>. Acesso em: 15 mar. 2023.

MAHAVIDYALAYA, Miraj; MUNDAGANUR, Miraj DS; KANNARATH, Ashokan. In Silico Drug Search for Better Treatment for Cancer: L-Asparaginase. **International Journal of Research Studies in Biosciences**, [S. l.], v. 2, n. 11, p. 75–84, 2014. Disponível em: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>. Acesso em: 20 set. 2024.

MAJOREK, Karolina A.; KUHN, Misty L.; CHRUSZCZ, Maksymilian; ANDERSON, Wayne F.; MINOR, Wlodek. Double trouble-Buffer selection and His-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. **Protein science : a publication of the Protein Society**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1359–1368, 2014. DOI: 10.1002/PRO.2520. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25044180/>. Acesso em: 25 set. 2024.

MALEKI, Fahimeh; MASHAYEKHI, Kazem; BADIEE KHEIRABADI, Seyedeh Elham; MOUSAVI, Mohammad Javad; SANKIAN, Mojtaba. A Convenient Method for Solubilization and Refolding Recombinant Proteins: An Experience from Recombinant Mouse TGF- β 1. **Research in Molecular Medicine**, [S. l.], p. 9–16, 2020. DOI: 10.32598/rmm.8.1.9.

MANERA, Ana Paula; ORES, Joana da Costa; RIBEIRO, Vanessa Amaral; RODRIGUES, Maria Isabel; KALIL, Susana Juliano; FILHO, Francisco Maugeri. Use of agroindustrial residues in biotechnological process by beta-galactosidase production from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, [S. l.], v. 33, n. 2, 2011. DOI: 10.4025/actascitechnol.v33i2.9919. Disponível em: <https://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciTechnol/article/view/9919>.

MARCHEL, Mateusz; COROADINHA, Ana Sofia; MARRUCHO, Isabel M. Novel Acidic Deep Eutectic Solvent-Based Aqueous Biphasic Systems for Efficient Extraction of Pepsin. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, [S. l.], v. 8, n. 33, p. 12400–12408, 2020. DOI: 10.1021/ACSSUSCHEMENG.0C02673. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02673>. Acesso em: 28 set. 2024.

MARINESCU, George Cătălin; POPESCU, Roua Gabriela; STOIAN, Gheorghe; DINISCHIOTU, Anca. β -nicotinamide mononucleotide (NMN) production in *Escherichia coli*. **Scientific Reports 2018 8:1**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30792-0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-30792-0>. Acesso em: 10 out. 2022.

MARKETYSERS GLOBAL CONSULTING LLP. **Reports and Data**. 2021. Disponível em: <https://www.reportsanddata.com/report-detail/asparaginase-market>. Acesso em: 4 set. 2024.

MATTOS, Carla; RINGE, Dagmar. Proteins in organic solvents. **Current Opinion in Structural Biology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 761–764, 2001. DOI: 10.1016/S0959-440X(01)00278-0. Acesso em: 28 set. 2024.

MAYER, Marcus; FREY, Stephan; KOIVUNEN, Peppi; MYLLYHARJU, Johanna; BUCHNER, Johannes. Influence of the oxidoreductase ERp57 on the folding of an antibody fab fragment. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 341, n. 4, p. 1077–1084, 2004. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.06.068. Acesso em: 26 set. 2024.

MAYOLO-DELOISA, Karla; TREJO-HERNÁNDEZ, Maria del Refugio; RITO-PALOMARES, Marco. Recovery of laccase from the residual compost of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 435–439, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.12.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511308003905>.

MEVADA, Jayeshkumar; DEVI, Sumedh; PANDIT, Aniruddha. Large scale microbial cell disruption using hydrodynamic cavitation: Energy saving options. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 143, p. 151–160, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.12.010>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X18304315>.

MICHALSKA, Karolina; BUJACZ, Grzegorz; JASKOLSKI, Mariusz. Crystal structure of plant asparaginase. **Journal of molecular biology**, [S. l.], v. 360, n. 1, p. 105–116, 2006.

MIHOOLIYA, Kanti Nandan; NITIKA, Nitika; BHAMBURE, Rahul; RATHORE, Anurag S. Post-refolding stability considerations for optimization of in-vitro refolding: L-asparaginase as a case study. **Biotechnology Journal**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 2200505, 2023. DOI: 10.1002/BIOT.202200505. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/biot.202200505>. Acesso em: 20 set. 2024.

MIJAKOVIC, Ivan; PETRANOVIC, Dina; MACEK, Boris; CEPO, Tina; MANN, Matthias; DAVIES, Julian; JENSEN, Peter R.; VUJAKLIJA, Dusica. Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 34, n. 5, p. 1588–1596, 2006. DOI: 10.1093/NAR/GKJ514. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16549871/>. Acesso em: 26 set. 2024.

MILLER, Samuel I.; SALAMA, Nina R. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. **PLOS Biology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. e2004935, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.2004935.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 312, de 27 de Março de 2013**. 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0312_27_03_2013.html. Acesso em: 26 ago. 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Ministério da Saúde enviou medicamento para teste de qualidade — Ministério da Saúde**. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2017/abril/ministerio-da-saude-enviou-medicamento-para-teste-de-qualidade>. Acesso em: 20 jul. 2024.

MIRONOVA, Roumyana; NIWA, Toshimitsu; HANDZHIYSKI, Yordan; SREDOVSKA, Angelina; IVANOV, Ivan. Evidence for non-enzymatic glycosylation of Escherichia coli chromosomal DNA. **Molecular Microbiology**, [S. l.], v. 55, n. 6, p. 1801–1811, 2005. DOI: 10.1111/J.1365-2958.2005.04504.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2005.04504.x>. Acesso em: 26 set. 2024.

MITRAGOTRI, Samir; BURKE, Paul A.; LANGER, Robert. Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies. **Nature reviews Drug discovery**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 655–672, 2014.

MOHAMED, Saleh A.; ELSHAL, Mohamed F.; KUMOSANI, Taha A.; ALDAHLAWI, Alia M.; BASBRAIN, Tasneem A.; ALSHEHRI, Fauziah A.; CHOUDHRY, Hani. L-Asparaginase Isolated from Phaseolus vulgaris Seeds Exhibited Potent Anti-Acute Lymphoblastic Leukemia Effects In-Vitro and Low Immunogenic Properties In-Vivo. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2016, Vol. 13, Page 1008, [S. l.], v. 13, n. 10, p. 1008, 2016. DOI: 10.3390/IJERPH13101008. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/13/10/1008/htm>. Acesso em: 30 jun. 2023.

MOHAMMADI, Azadeh; NIAZI, Ali; ARAM, Farzaneh; HASSANI, Farshid; GHASEMI, Younes. Transformation of the L-Asparaginase II Gene to Potato Hairy Roots for Production of Recombinant Protein. [S. l.], v. 23, n. 1, p. 81–88, [s.d.]. DOI: 10.1007/S12892-018-0030-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12892-018-0030-0>. Acesso em: 23 fev. 2022.

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, Ravi; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from Cladosporium sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 150–158, 2013. DOI: 10.1016/J.INDCROP.2012.07.023.

MONICA, Twesiime; LINCOLN, Lynette; NIYONZIMA, Francois; MORE, Sunil. Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from Mucor hiemalis. **J. Biocatal. Biotransform.**, [S. l.], v. 2, p. 2–9, 2013.

MONTALESCOT, V.; RINALDI, T.; TOUCHARD, R.; JUBEAU, S.; FRAPPART, M.; JAOUEN, P.; BOURSEAU, P.; MARCHAL, L. Optimization of bead milling parameters for the cell disruption of microalgae: Process modeling and application to Porphyridium cruentum and Nannochloropsis oculata. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 196, p. 339–346, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.075>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415010378>.

MONTARROYOS, Angélica Virgínia Valois; COELHO, Rildo Sartori Barbosa; FERRAZ, Gabriela de Moraes Guerra; SANTOS, Rômulo Dos; SANTOS, Venézio Felipe Dos; ANDRADE, Paulo Paes De. Efeitos de meio de cultura, fontes de carbono e nitrogênio, pH e regime luminoso no crescimento de *Mycosphaerella musicola*. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 86–89, 2007. DOI: 10.1590/S0100-54052007000100014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/Nc3WqWnqXGSG975LpxRtFKL/>. Acesso em: 1 set. 2024.

MOREIRA, Sérgio; SILVÉRIO, Sara C.; MACEDO, Eugénia A.; MILAGRES, Adriane M. F.; TEIXEIRA, José A.; MUSSATTO, Solange I. Recovery of *Peniophora cinerea* laccase using aqueous two-phase systems composed by ethylene oxide/propylene oxide copolymer and potassium phosphate salts. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1321, p. 14–20, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.056>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313016750>.

MORENO-ENRÍQUEZ, Angélica; EVANGELISTA-MARTÍNEZ, Zahaed; GONZÁLEZ-MONDRAGÓN, Edith G.; CALDERÓN-FLORES, Arturo; ARREGUÍN, Roberto; PÉREZ-RUEDA, Ernesto; HUERTA-SAQUERO, Alejandro. Biochemical Characterization of Recombinant L-Asparaginase (AnsA) from *Rhizobium etli*, a Member of an Increasing Rhizobial-Type Family of L-Asparaginases. **J. Microbiol. Biotechnol.**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 292–300, 2012. DOI: 10.4014/JMB.1107.07047. Disponível em: <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1107.07047>. Acesso em: 1 jul. 2023.

MOULTON, Garner G. Recombinant fed-batch fermentation using *Escherichia coli*. *Em: Fed-batch fermentation: A practical guide to scalable recombinant protein production in Escherichia coli*. UK: Elsevier, 2014. p. 63–106. . Acesso em: 10 out. 2022.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 97–113, 1998. DOI: 10.1016/S1040-8428(98)00015-8. Acesso em: 9 out. 2022.

MUNEER, Faizan; SIDDIQUE, Muhammad Hussnain; AZEEM, Farrukh; RASUL, Ijaz; MUZAMMIL, Saima; ZUBAIR, Muhammad; AFZAL, Muhammad; NADEEM, Habibullah. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 202, n. 5, p. 967–981, 2020. DOI: 10.1007/s00203-020-01814-1.

MUNHOZ COSTA, Iris; CUSTÓDIO MOURA, Débora; MEIRA LIMA, Guilherme; PESSOA, Adalberto; ORESCO DOS SANTOS, Camila; DE OLIVEIRA, Marcos A.; MONTEIRO, Gisele. Engineered asparaginase from *Erwinia chrysanthemi* enhances asparagine hydrolase activity and diminishes enzyme immunoreactivity - a new promise to treat acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 228–239, 2022. DOI: 10.1002/JCTB.6933. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jctb.6933>. Acesso em: 20 set. 2024.

MUNRO, Sean; PELHAM, Hugh R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. **Cell**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 899–907, 1987. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90086-9. Disponível em: <http://www.cell.com/article/0092867487900869/fulltext>. Acesso em: 28 abr. 2022.

MUSSAGY, Cassamo U. et al. A look into *Phaffia rhodozyma* biorefinery: From the recovery and fractionation of carotenoids, lipids and proteins to the sustainable manufacturing of biologically active bioplastics. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 362, p. 127785, 2022. a. DOI: 10.1016/J.BIORTECH.2022.127785. Acesso em: 15 mar. 2023.

MUSSAGY, Cassamo U.; GONZALEZ-MIQUEL, Maria; SANTOS-EBINUMA, Valeria C.; PEREIRA, Jorge F. B. Microbial torularhodin – a comprehensive review. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 540–558, 2023. DOI: 10.1080/07388551.2022.2041540. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2041540>.

MUSSAGY, Cassamo U.; KURNIA, Kiki A.; DIAS, Ana C. R. V; RAGHAVAN, Vijaya; SANTOS-EBINUMA, Valeria C.; PESSOA JR, Adalberto. An eco-friendly approach for the recovery of astaxanthin and β -carotene from *Phaffia rhodozyma* biomass using bio-based solvents. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 345, p. 126555, 2022. b.

MUSSAGY, Cassamo U.; REMONATTO, Daniela; PAULA, Ariela V; HERCULANO, Rondinelli D.; SANTOS-EBINUMA, Valéria C.; COUTINHO, João A. P.; PEREIRA, Jorge F. B. Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 266, p. 118548, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118548>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586621002495>.

MUSSAGY, Cassamo U.; SANTOS-EBINUMA, Valéria C.; HERCULANO, Rondinelli D.; COUTINHO, João A. P.; PEREIRA, Jorge F. B.; PESSOA, Adalberto. Ionic liquids or eutectic solvents? Identifying the best solvents for the extraction of astaxanthin and β -carotene from *Phaffia rhodozyma* yeast and preparation of biodegradable films. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 118–123, 2022. c.

MUSSAGY, Cassamo U.; SANTOS-EBINUMA, Valéria C.; KURNIA, Kiki A.; DIAS, Ana C. R. V.; CARVALHO, Pedro; COUTINHO, Joaõ A. P.; PEREIRA, Jorge F. B. Integrative platform for the selective recovery of intracellular carotenoids and lipids from *Rhodotorula glutinis* CCT-2186 yeast using mixtures of bio-based solvents. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 22, n. 23, p. 8478–8494, 2020. DOI: 10.1039/D0GC02992K. Disponível em:

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/gc/d0gc02992k>. Acesso em: 30 ago. 2024.

NABIEL, Ahmad; YOSUA, Yosua; SRIWIDODO, Sriwidodo; MAKSUM, Iman Permana. Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 47–52, 2023. DOI: 10.7324/JABB.2023.112204. Disponível em: https://jabonline.in/abstract.php?article_id=937&sts=2. Acesso em: 21 set. 2024.

NADERI, Mousa; GHADERI, Roghayeh; KHEZRI, Jafar; KARKHANE, Aliasghar; BAMBAL, Bijan. Crucial role of non-hydrophobic residues in H-region signal peptide on secretory production of L-asparaginase II in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 636, p. 105–111, 2022. DOI: 10.1016/J.BBRC.2022.10.029. Acesso em: 20 set. 2024.

NAGARAJA, Viswanatha H.; IYYASWAMI, Regupathi. Aqueous two phase partitioning of fish proteins: partitioning studies and ATPS evaluation. **Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 52, p. 3539–3548, 2015.

NAGARETHINAM, Sivagurunathan; NAIK, Anantha Nagappa; UDUPA, N.; RAO, Venkata J.; VANATHI, Meenashi B. Microbial L-Asparaginase and its future prospects. **Asian Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 159–168, 2012.

NAIR, A.; KUMAR, R.; DEVI, R. A.; BALAKRISHNAN, K. Screening of commonly available solid process residues as substrate for L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Res J Pharm Biol Chem Sci**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 1731–1737, 2013.

NARTA, Umesh K.; KANWAR, Shamsheer S.; AZMI, Wamik. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. **Critical**

Reviews in Oncology/Hematology, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007. DOI: 10.1016/J.CRITREVONC.2006.07.009. Acesso em: 21 jul. 2024.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Age-Adjusted and Age-Specific SEER Cancer Incidence Rates**. 2018.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **BLAST: Basic Local Alignment Search Tool**. 2022. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 17 ago. 2022.

NEVES, Catarina M. S. S.; SHAHRIARI, Shahla; LEMUS, Jesus; PEREIRA, Jorge F. B.; FREIRE, Mara G.; COUTINHO, João A. P. Aqueous biphasic systems composed of ionic liquids and polypropylene glycol: insights into their liquid–liquid demixing mechanisms. **Physical Chemistry Chemical Physics**, [S. l.], v. 18, n. 30, p. 20571–20582, 2016. DOI: 10.1039/C6CP04023C. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/cp/c6cp04023c>. Acesso em: 11 ago. 2024.

OBERG, Keith; CHRUNYK, Boris A.; WETZEL, Ronald; FINK, Anthony L. Native-like secondary structure in interleukin-1. beta. Inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR. **Biochemistry**, [S. l.], v. 33, n. 9, p. 2628–2634, 1994.

OGINO, Hiroyasu; MIMITSUKA, Takashi; MUTO, Toshiaki; MATSUMURA, Miharu; YASUDA, Masahiro; ISHIMI, Kosaku; ISHIKAWA, Haruo. Cloning, Expression, and Characterization of a Lipolytic Enzyme Gene (lip8) from *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 212–223, 2004. DOI: 10.1159/000079830. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1159/000079830>. Acesso em: 10 ago. 2024.

OHGANE, Kenji; YOSHIOKA, Hiromasa. Quantification of Gel Bands by an Image J Macro, Band/Peak Quantification Tool. *[S. l.]*, 2019. DOI: 10.17504/protocols.io.7vghn3w.

OINONEN, Carita; TIKKANEN, Ritva; ROUVINEN, Juha; PELTONEN, Leena. Three-dimensional structure of human lysosomal aspartylglucosaminidase. **Nature Structural Biology** 1995 2:12, *[S. l.]*, v. 2, n. 12, p. 1102–1108, 1995. DOI: 10.1038/nsb1295-1102. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nsb1295-1102>. Acesso em: 29 jun. 2023.

OMS. **World Health Organization Model List of Essential Medicines**. 22st List ed. [s.l: s.n.].

ONCIU, Mihaela. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, *[S. l.]*, v. 23, n. 4, p. 655–674, 2009. DOI: 10.1016/J.HOC.2009.04.009.

OU, Jingxing; WANG, Lei; DING, Xiaolan; DU, Jianyang; ZHANG, Yuan; CHEN, Huiping; XU, Anlong. Stationary phase protein overproduction is a fundamental capability of *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, *[S. l.]*, v. 314, n. 1, p. 174–180, 2004. DOI: 10.1016/J.BBRC.2003.12.077. Acesso em: 10 out. 2022.

PAN, S. H.; MALCOLM, B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). **BioTechniques**, *[S. l.]*, v. 29, n. 6, p. 1234–1238, 2000. DOI: 10.2144/00296ST03. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11126126/>. Acesso em: 18 set. 2024.

PARASHIVA, Javaraiah; NUTHAN, Bettadapura Rameshgowda; RAKSHITH, Devaraju; SATISH, Sreedharamurthy. Endophytic Fungi as a Promising Source of Anticancer L-Asparaginase: A Review. **Current Microbiology**, *[S. l.]*, v. 80, n. 9, p. 282, 2023. DOI: 10.1007/s00284-023-03392-z. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03392-z>.

PASSAGLIA, L. M. P.; ZAHA, A. Técnicas de Biologia Molecular. *Em: TECHBOOKS (org.). Biologia Molecular Básica*. 5ª Edição ed. São Paulo: Artmed, 2014. p. 333–362.

PATEL, Payal G.; PANSERIYA, Haresh Z.; VALA, Anjana K.; DAVE, Bharti P.; GOSAI, Haren B. Exploring current scenario and developments in the field of microbial L-asparaginase production and applications: A review. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 121, p. 529–541, 2022. DOI: 10.1016/J.PROCBIO.2022.07.029. Acesso em: 19 set. 2024.

PATRO, K. Krishna Raju; SATPATHY, S.; GUPTA, Nibha. Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 219–221, 2011.

PAUL, J. H. Isolation and characterization of a Chlamydomonas-asparaginase. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 203, n. 1, p. 109–115, 1982. DOI: 10.1042/BJ2030109.

PECIULYTE, Ausra; PISANO, Maria; DE VRIES, Ronald P.; OLSSON, Lisbeth. Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. **Biotechnology Letters**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1403–1411, 2017. DOI: 10.1007/s10529-017-2371-9.

PEREIRA ALCÂNTARA, Lizzy Ayra; DO NASCIMENTO, Kelany Santiago; MOURÃO, Cecília Alves; MINIM, Valéria Paula Rodrigues; MINIM, Luis Antonio. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)–sodium polyacrylate system for amyloglucosidase purification: Equilibrium diagrams and partitioning studies. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 118, p. 888–894, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.08.039>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586613005248>.

PETKOVIC, Marija; FERGUSON, Jamie L.; GUNARATNE, H. Q. Nimal; FERREIRA, Rui; LEITÃO, Maria C.; SEDDON, Kenneth R.; REBELO, Luís Paulo N.; PEREIRA, Cristina Silva. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids—toxicity and biodegradability. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 643–649, 2010. DOI: 10.1039/B922247B. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/B922247B>.

PIETERS, Rob; HUNGER, Stephen P.; BOOS, Joachim; RIZZARI, Carmelo; SILVERMAN, Lewis; BARUCHEL, Andre; GOEKBUGET, Nicola; SCHRAPPE, Martin; PUI, Ching Hon. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, [S. l.], v. 117, n. 2, p. 238–249, 2011. DOI: 10.1002/CNCR.25489.

PINHO, Jean Marcel Rodrigues; PASSOS, Flávia Maria Lopes. SOLVENT EXTRACTION OF β -GALACTOSIDASE FROM *KLUYVEROMYCES LACTIS* YIELDS A STABLE AND HIGHLY ACTIVE ENZYME PREPARATION. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 323–336, 2011. DOI: 10.1111/J.1745-4514.2010.00384.X. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1745-4514.2010.00384.x>. Acesso em: 10 ago. 2024.

PRZYBYCIEN, Todd M.; DUNN, Joseph P.; VALAX, Pascal; GEORGLOU, George. Secondary structure characterization of β -lactamase inclusion bodies. **Protein Engineering, Design and Selection**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 131–136, 1994. DOI: 10.1093/PROTEIN/7.1.131. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/protein/7.1.131>. Acesso em: 20 set. 2024.

QUINTANILLA-FLORES, Dania Lizet; FLORES-CABALLERO, Miguel Ángel; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, René; TAMEZ-PÉREZ, Héctor Eloy; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, José Gerardo. Acute Pancreatitis and Diabetic Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Case Reports in Oncological Medicine**, [S. l.], v. 2014, p. 1–3, 2014. DOI: 10.1155/2014/139169.

RAJAKUMAR, Merlyn Sujatha; MUTHUKUMAR, Karuppan. Influence of pre-soaking conditions on ultrasonic extraction of *Spirulina platensis* proteins and its recovery using aqueous biphasic system. **Separation Science and Technology**, [S. l.], v. 53, n. 13, p. 2034–2043, 2018. DOI: 10.1080/01496395.2018.1442860. Disponível em: <https://www.tandfonline.com.ez1.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/01496395.2018.1442860>. Acesso em: 10 set. 2024.

RAJENDRAN, Vivek; PUSHPAVANAM, S.; JAYARAMAN, Guhan. Continuous refolding of L-asparaginase inclusion bodies using periodic counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1662, p. 462746, 2022. . Acesso em: 4 maio. 2022.

RAMÓN, Ana; SEÑORALE-POSE, Mario; MARÍN, Mónica. Inclusion bodies: Not that bad... **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. FEB, p. 77304, 2014. DOI: 10.3389/FMICB.2014.00056/BIBTEX. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 20 set. 2024.

RANI, Soniyamby Ambi; SUNDARAM, Lalitha; VASANTHA, Praveesh Bahuleyan. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **Int J Pharm Pharm Sci**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 279, 2012.

RATELADE, Julien; MIOT, Marie Caroline; JOHNSON, Emmett; BETTON, Jean Michel; MAZODIER, Philippe; BENAROUDJ, Nadia. Production of recombinant proteins in the lon-deficient BL21(DE3) strain of *Escherichia coli* in the absence of the DnaK chaperone. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 75, n. 11, p. 3803–3807, 2009. DOI: 10.1128/AEM.00255-09/SUPPL_FILE/TABLES2.PDF.

REA, Jennifer C.; MORENO, G. Tony; LOU, Yun; FARNAN, Dell. Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations. **Journal of Pharmaceutical**

and Biomedical Analysis, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 317–323, 2011. DOI: 10.1016/J.JPBA.2010.08.030. Acesso em: 1 out. 2024.

RINALDI, Roberto; JASTRZEBSKI, Robin; CLOUGH, Matthew T.; RALPH, John; KENNEMA, Marco; BRUIJNINCX, Pieter C. A.; WECKHUUSEN, Bert M. Paving the Way for Lignin Valorisation: Recent Advances in Bioengineering, Biorefining and Catalysis. **Angewandte Chemie International Edition**, [S. l.], v. 55, n. 29, p. 8164–8215, 2016. DOI: 10.1002/ANIE.201510351. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.201510351>. Acesso em: 10 ago. 2024.

RITO-PALOMARES, Marco. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 807, n. 1, p. 3–11, 2004. DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2004.01.008. Acesso em: 19 jul. 2024.

RITO-PALOMARES, Marco; BENAVIDES, Jorge. **Aqueous two-phase systems for bioprocess development for the recovery of biological products**. [s.l.] : Springer, 2017.

RODRIGUES ANDRADE, Kellen Cruvinel; CORDEIRO DE ABREU, Joel Antonio; GUIMARÃES, Marina Borges; ABRUNHOSA, Letícia Santos; LEÔNICIO RODRIGUES, Ana Luisa; FONSECA-BAZZO, Yris Maria; SILVEIRA, Damaris; SOUZA, Paula Monteiro; MAGALHÃES, Pérola Oliveira. Heterologous expression of fungal L-asparaginase: a systematic review. **Future Microbiology**, [S. l.], 2023. DOI: 10.2217/fmb-2023-0131.

RODRIGUES, David et al. Fed-batch production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by recombinant *Pichia pastoris* MUTs strain. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, n. FEB, p. 16, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2019.00016/BIBTEX. Acesso em: 28 abr. 2022.

RODRIGUES, Mariane A. D. et al. Influence of lysosomal protease sensitivity in the immunogenicity of the antitumor biopharmaceutical asparaginase. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 182, p. 114230, 2020. DOI: 10.1016/J.BCP.2020.114230. Acesso em: 21 set. 2024.

ROMANO, Angela; VARRIALE, Simona; PEZZELLA, Cinzia; TOTARO, Grazia; ANDANSON, Jean Michel; VERNEY, Vincent; SISTI, Laura. Natural deep eutectic solvents as thermostabilizer for *Humicola insolens* cutinase. **New Biotechnology**, [S. l.], v. 76, p. 118–126, 2023. DOI: 10.1016/J.NBT.2023.05.006. Acesso em: 10 ago. 2024.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. APR, p. 172, 2014. DOI: 10.3389/FMICB.2014.00172/BIBTEX.

ROSANO, Germán L.; MORALES, Enrique S.; CECCARELLI, Eduardo A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. **Protein Science**, [S. l.], v. 28, n. 8, p. 1412–1422, 2019. DOI: 10.1002/PRO.3668. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.3668>. Acesso em: 28 abr. 2022.

ROSENBERG, A. H.; GOLDMAN, E.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W.; ZUBAY, G. Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 175, n. 3, p. 716, 1993. DOI: 10.1128/JB.175.3.716-722.1993. Disponível em: [/pmc/articles/PMC196210/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/196210/). Acesso em: 26 set. 2024.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio. Boston, MAPCB, , 2020. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>.

RUDOLPH' AND, Rainer; LILIE, Hauke. In vitro folding of inclusion body proteins. **The FASEB Journal**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 49–56, 1996. DOI: 10.1096/FASEBJ.10.1.8566547.

RYŚ, Sylwia; MUCA, Renata; KOŁODZIEJ, Michał; PIATKOWSKI, Wojciech; DÜRAUER, Astrid; JUNGBAUER, Alois; ANTOS, Dorota. Design and optimization of protein refolding with crossflow ultrafiltration. **Chemical Engineering Science**, [S. l.], v. 130, p. 290–300, 2015. DOI: 10.1016/J.CES.2015.03.035. Acesso em: 20 set. 2024.

SAEED, Hesham; ALI, Hadeer; SOUDAN, Hadeer; EMBABY, Amira; EL-SHARKAWY, Amany; FARAG, Aida; HUSSEIN, Ahmed; ATAYA, Farid. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant *Aspergillus terreus* l. asparaginase in *Escherichia coli*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 106, p. 1041–1051, 2018. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2017.08.110. Acesso em: 8 abr. 2022.

SAHA, Nandan; SARKAR, Baidurya; SEN, Kamalika. Aqueous biphasic systems: A robust platform for green extraction of biomolecules. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 363, p. 119882, 2022. DOI: 10.1016/j.molliq.2022.119882.

SAHDEV, Sudhir; KHATTAR, Sunil K.; SAINI, Kulvinder Singh. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 307, n. 1–2, p. 249–264, 2007. DOI: 10.1007/s11010-007-9603-6.

SAJITHA, Syed; VIDYA, Jalaja; VARSHA, Karunakaran; BINOD, Parameswaran; PANDEY, Ashok. Cloning and expression of l-asparaginase from *E. coli* in eukaryotic expression system. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 102, p. 14–17, 2015. DOI: 10.1016/J.BEJ.2015.02.027. Acesso em: 28 abr. 2022.

SANKARAN, Hari et al. A comparison of asparaginase activity in generic formulations of E.coli derived L- asparaginase: In-vitro study and retrospective analysis of asparaginase monitoring in pediatric patients with leukemia. **British Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 86, n. 6, p. 1081–1088, 2020. DOI: 10.1111/bcp.14216.

SARQUIS, Maria Inez de Moura; OLIVEIRA, Edna Maria Morais; SANTOS, Alberdan Silva; COSTA, Gisela Lara Da. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004. DOI: 10.1590/S0074-02762004000500005.

SASSI, Alexandra Beumer; NAGARKAR, Radhika; HAMBLIN, Paul. Biobetter Biologics. **Novel Approaches and Strategies for Biologics, Vaccines and Cancer Therapies**, [S. l.], p. 199–217, 2015. DOI: 10.1016/B978-0-12-416603-5.00009-2. Acesso em: 19 set. 2024.

SAUNA, Zuben E.; LAGASSÉ, H. A. Daniel; ALEXAKI, Aikaterini; SIMHADRI, Vijaya L.; KATAGIRI, Nobuko H.; JANKOWSKI, Wojciech; KIMCHI-SARFATY, Chava. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. **F1000Research**, [S. l.], v. 6, 2017. DOI: 10.12688/F1000RESEARCH.9970.1. Disponível em: /pmc/articles/PMC5302153/. Acesso em: 19 set. 2024.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods** 2012 9:7, [S. l.], v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012. DOI: 10.1038/nmeth.2089.

SCHNUCHEL, Arndt; RADCKE, Christoph; THEOBALD, Lars; DOEDING, Stefan. Quality comparison of a state-of-the-art preparation of a recombinant L-asparaginase derived from Escherichia coli with an alternative asparaginase product. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 18, n. 6, p. e0285948, 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0285948.

SCHULZ, Horst; WAKIL, Salih J. Reactions of hydroxylamine with acetoacetyl thioesters or ethyl acetoacetate. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 457–461, 1970. DOI: 10.1016/0003-2697(70)90073-4. Acesso em: 27 set. 2024.

SCOPES, Robert K. Optimization of Procedures; Final Step. *Em: Protein Purification*. 3. ed. New York, NY: Springer New York, 1994. p. 310–345. DOI: 10.1007/978-1-4757-2333-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-2333-5>. Acesso em: 28 set. 2024.

SEBASTIAO, M. J.; MARTEL, P.; BAPTISTA, A.; PETERSEN, S. B.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Predicting the partition coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. **Biotechnology and bioengineering**, [S. l.], v. 56, n. 3, p. 248–257, 1997.

SENPHAN, Theeraphol; BENJAKUL, Soottawat. Use of the combined phase partitioning systems for recovery of proteases from hepatopancreas of Pacific white shrimp. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 129, p. 57–63, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586614001877>.

SERVIER. **Oncaspar**. [Bula]Indianapolis, EUAImportado e Registrado por: Laboratórios Servier do Brasil Ltda, , 2020.

SHAFEI, Mona S.; EL-REFAI, Heba A.; MOSTAFA, Hanan; EL-REFAI, Abdel-Monem H.; EL-BEIH, Fawkia M.; EASA, Saadia M.; GOMAA, Sanaa K. Purification, characterization and kinetic properties of *Penicillium cyclopium* L-asparaginase: Impact of lasparaginase on acrylamide content in potato products and its cytotoxic activity. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 132–140, 2015.

SHARP, Paul M.; DEVINE, Kevin M. Codon usage and gene expression level in *Dictyostelium discoideum*: highly expressed genes do “prefer” optimal codons.

Nucleic Acids Research, [S. l.], v. 17, n. 13, p. 5029, 1989. DOI: 10.1093/NAR/17.13.5029. Disponível em: [/pmc/articles/PMC318092/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/109318092/). Acesso em: 26 set. 2024.

SHRESTHA, Prashanta; HOLLAND, Troy Michael; BUNDY, Bradley Charles. Streamlined extract preparation for Escherichia coli-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. **BioTechniques**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 163–174, 2012. DOI: 10.2144/0000113924/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE3.JPEG.

SHRIVASTAVA, Abhinav; KHAN, Abdul Arif; SHRIVASTAV, Archana; JAIN, Sudhir K.; SINGHAL, Pradeep K. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 574–581, 2012. DOI: 10.1080/10826068.2012.672943. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826068.2012.672943>.

SIB. **Expasy ProtParam**. 2022. Disponível em: <https://www.expasy.org/>. Acesso em: 9 out. 2022.

SIMPSON, Deborah M.; BEYNON, Robert J. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. **Journal of proteome research**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 444–450, 2010.

SINGH, Anupam; UPADHYAY, Vaibhav; SINGH, Akansha; PANDA, Amulya K. Structure-Function Relationship of Inclusion Bodies of a Multimeric Protein. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 876, 2020. DOI: 10.3389/FMICB.2020.00876/BIBTEX.

SINGH, Anupam; UPADHYAY, Vaibhav; UPADHYAY, Arun Kumar; SINGH, Surinder Mohan; PANDA, Amulya Kumar. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1186/S12934-015-0222-8/TABLES/3.

SINGHVI, Priyank et al. Molecular Attributes Associated With Refolding of Inclusion Body Proteins Using the Freeze–Thaw Method. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 12, p. 719, 2021. DOI: 10.3389/FMICB.2021.618559/BIBTEX. Acesso em: 21 jun. 2022.

SINGHVI, Priyank; SANEJA, Ankit; SRICHANDAN, Sudeepa; PANDA, Amulya K. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 474–486, 2020. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.12.011.

SINGLA, Mohit; SIT, Nandan. Theoretical Aspects and Applications of Aqueous Two-Phase Systems. **ChemBioEng Reviews**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 65–80, 2023.

SLOUKA, Christoph; KOPP, Julian; HUTWIMMER, Stefan; STRAHAMMER, Michael; STROHMER, Daniel; EITENBERGER, Elisabeth; SCHWAIGHOFER, Andreas; HERWIG, Christoph. Custom made inclusion bodies: Impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–15, 2018. DOI: 10.1186/S12934-018-0997-5/FIGURES/7. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0997-5>. Acesso em: 20 set. 2024.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985. DOI: 10.1016/0003-2697(85)90442-7. Acesso em: 9 jun. 2022.

SOCIETY, A. C. **Leukemia in Children**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/leukemia-in-children.html>. Acesso em: 6 abr. 2022.

SODEK, Ladaslav; LEA, Peter J.; MIFLIN, Benjamin J. Distribution and Properties of a Potassium-dependent Asparaginase Isolated from Developing Seeds of *Pisum sativum* and Other Plants. **Plant Physiology**, [S. l.], v. 65, n. 1,

p. 22–26, 1980. DOI: 10.1104/PP.65.1.22. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1104/pp.65.1.22>. Acesso em: 3 jul. 2023.

SØRENSEN, Hans Peter; MORTENSEN, Kim Kusk. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005. DOI: 10.1016/J.JBIOTEC.2004.08.004. Acesso em: 27 abr. 2022.

SOUZA, Paula Monteiro; DE FREITAS, Marcela Medeiros; CARDOSO, Samuel Leite; PESSOA, Adalberto; GUERRA, Eliete Neves Silva; MAGALHÃES, Pérola Oliveira. Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [S. l.], v. 120, p. 194–202, 2017. DOI: 10.1016/J.CRITREVONC.2017.11.006.

SOUZA, Ranyere L.; LIMA, Rafaella A.; COUTINHO, João A. P.; SOARES, Cleide M. F.; LIMA, Álvaro S. Novel aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran and potassium phosphate buffer for purification of lipase. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 50, n. 9, p. 1459–1467, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511315300015>.

STADLER, Richard H.; BLANK, Imre; VARGA, Natalia; ROBERT, Fabien; HAU, Jörg; GUY, Philippe A.; ROBERT, Marie-Claude; RIEDIKER, Sonja. Acrylamide from Maillard reaction products. **Nature**, [S. l.], v. 419, n. 6906, p. 449–450, 2002. DOI: 10.1038/419449a.

STECHER, A. L.; MORGANTETTI DE DEUS, P.; POLIKARPOV, I.; ABRAHÃO-NETO, J. Stability of L-asparaginase: An enzyme used in leukemia treatment. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, [S. l.], v. 74, n. 1, p. 1–9, 1999. DOI: 10.1016/S0031-6865(99)00009-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10748619/>. Acesso em: 31 ago. 2024.

SUAREZ RUIZ, C. A.; VAN DEN BERG, C.; WIJFFELS, R. H.; EPPINK, M. H. M. Rubisco separation using biocompatible aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 196, p. 254–261, 2018. DOI: 10.1016/J.SEPPUR.2017.05.001. Acesso em: 13 set. 2024.

SUN, Zeao; WU, Yijian; LONG, Shihua; FENG, Sai; JIA, Xiao; HU, Yan; MA, Maomao; LIU, Jingxin; ZENG, Bin. Aspergillus oryzae as a Cell Factory: Research and Applications in Industrial Production. **Journal of Fungi** 2024, Vol. 10, Page 248, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 248, 2024. DOI: 10.3390/JOF10040248. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/10/4/248/html>. Acesso em: 1 set. 2024.

SUSHMA, Krishnan; BILGIMOL, Chuvappumkal Joseph; VIJAYALAKSHMI, Mookambeswaran A.; SATHEESHKUMAR, Padikara Kutty. Recovery of active anti TNF- α ScFv through matrix-assisted refolding of bacterial inclusion bodies using CIM monolithic support. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 891–892, p. 90–93, 2012. DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2012.02.011. Acesso em: 20 set. 2024.

SWAIN, A. L.; JASKOLSKI, M.; HOUSSET, D.; RAO, J. K. M.; WLODAWER, A. Crystal structure of Escherichia coli L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 1474–1478, 1993. DOI: 10.1073/PNAS.90.4.1474. Acesso em: 31 ago. 2024.

TADDIA, Antonela; RITO-PALOMARES, Marco; MAYOLO-DELOISA, Karla; TUBIO, Gisela. Purification of xylanase from Aspergillus niger NRRL3 extract by an integrated strategy based on aqueous two-phase systems followed by ion exchange chromatography. **Separation and Purification Technology**, [S. l.], v. 255, p. 117699, 2021. DOI: 10.1016/J.SEPPUR.2020.117699. Acesso em: 16 set. 2024.

TAHA, Mohamed; COUTINHO, João A. P. Organic-phase biological buffers for biochemical and biological research in organic media. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 221, p. 197–205, 2016. DOI: 10.1016/J.MOLLIQ.2016.05.052. Acesso em: 28 set. 2024.

TANFORD, Charles. The Interpretation Of Hydrogen Ion Titration Curves Of Proteins. **Advances in Protein Chemistry**, [S. l.], v. 17, n. C, p. 69–165, 1963. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60052-2. Acesso em: 25 set. 2024.

TAREKE, Eden; RYDBERG, Per; KARLSSON, Patrik; ERIKSSON, Sune; TÖRNQVIST, Margareta. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 50, n. 17, p. 4998–5006, 2002. DOI: 10.1021/jf020302f.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal** 2017 7:6, [S. l.], v. 7, n. 6, p. e577–e577, 2017. DOI: 10.1038/bcj.2017.53.

TIPPANI, Radhika; SIVADEVUNI, Girisham. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the Fusarium sp. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 15, p. 3692–3696, 2014. DOI: 10.4314/ajb.v11i15. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/100880>.

TOLIA, Niraj H.; JOSHUA-TOR, Leemor. Strategies for protein coexpression in Escherichia coli. **Nature Methods** 2006 3:1, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 55–64, 2006. DOI: 10.1038/nmeth0106-55.

TRIEU, Vuong. **ALBUMIN BINDING PEPTIDE-MEDIATED DISEASE TARGETING**, CA 2867252, 2015.

TRIPATHI, Nagesh K.; SHRIVASTAVA, Ambuj. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process

Development. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [S. l.], v. 7, p. 420, 2019. DOI: 10.3389/FBIOE.2019.00420/BIBTEX.

ULBRICHT, Juliane; JORDAN, Rainer; LUXENHOFER, Robert. On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. **Biomaterials**, [S. l.], v. 35, n. 17, p. 4848–4861, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.02.029>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961214001690>.

UMETSU, Mitsuo; TSUMOTO, Kouhei; ASHISH, Kumar; NITTA, Shigeki; TANAKA, Yoshikazu; ADSCHIRI, Tadafumi; KUMAGAI, Izumi. Structural characteristics and refolding of in vivo aggregated hyperthermophilic archaeon proteins. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 557, n. 1–3, p. 49–56, 2004. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01441-8. Acesso em: 20 set. 2024.

UNTERGASSER, Andreas; CUTCUTACHE, Ioana; KORESSAAR, Triinu; YE, Jian; FAIRCLOTH, Brant C.; REMM, Maido; ROZEN, Steven G. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 40, n. 15, p. e115–e115, 2012.

UPADHYAY, Arun K.; MURMU, Aruna; SINGH, Anupam; PANDA, Amulya K. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in escherichia coli. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0033951. Acesso em: 23 fev. 2022.

UPADHYAY, Arun K.; SINGH, Anupam; MUKHERJEE, K. J.; PANDA, Amulya K. Refolding and purification of recombinant L-asparaginase from inclusion bodies of E. coli into active tetrameric protein. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 3, 2014. DOI: 10.3389/FMICB.2014.00486. Acesso em: 23 fev. 2022.

UPPULURI, Kiran Babu; VR DASARI, Ravi Kumar; SAJJA, Vinod; JACOB, Annie Shanani; SRI RAMI REDDY, D. Optimization of L-asparaginase production by isolated *Aspergillus niger* C4 from sesame (black) oil cake under SSF using

Box–Behnken design in column bioreactor. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 103–109, 2013.

VALLEJO, Luis Felipe; RINAS, Ursula. Microbial Cell Factories Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. [S. l.], 2004. DOI: 10.1186/1475-2859-3-11. Disponível em: <http://www.microbialcellfactories.com/content/3/1/11>. Acesso em: 4 maio. 2022.

VEGA, Karina; KALKUM, Markus. Chitin, Chitinase Responses, and Invasive Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 2012, p. 920459, 2012. DOI: 10.1155/2012/920459. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/920459>.

VON HIPPEL, Peter H.; SCHLEICH, Thomas. Ion Effects on the Solution Structure of Biological Macromolecules. **Accounts of Chemical Research**, [S. l.], v. 2, n. 9, p. 257–265, 1969. DOI: 10.1021/AR50021A001. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>. Acesso em: 25 set. 2024.

VROOMAN, Lynda M. et al. Efficacy and toxicity of pegaspargase and calaspargase pegol in childhood acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: Results of DFCL 11-001. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 37, n. 15_suppl, p. 10006–10006, 2019. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.15_SUPPL.10006.

WALSH, Gary. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nature Biotechnology** **2018 36:12**, [S. l.], v. 36, n. 12, p. 1136–1145, 2018. DOI: 10.1038/nbt.4305. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.4305>. Acesso em: 28 abr. 2022.

WANG, M.; YUAN, W.; HALE, Andy. Three-Dimensional Simulation of Ultrasound-Induced Microalgal Cell Disruption. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [S. l.], v. 178, n. 6, p. 1184–1195, 2016. DOI: 10.1007/S12010-015-1937-Z/FIGURES/7. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-015-1937-z>. Acesso em: 10 out. 2022.

WANG, Yiming; XU, Wei; WU, Hao; ZHANG, Wenli; GUANG, Cuie; MU, Wanmeng. Microbial production, molecular modification, and practical application of L-Asparaginase: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 186, p. 975–983, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.107. Acesso em: 9 out. 2022.

WANG, Yudong; ZHUANG, Yang; YAN, Hao; LU, Yanxuan; DENG, Xingqun; HU, Yang; XIONG, Shanbai; YANG, Hong. The influence of pH and monovalent/divalent cations on the structural and physicochemical properties of myofibrillar protein from silver carp. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 404, p. 134519, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134519.

WEISS, Renate et al. Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*. **Journal of Cleaner Production**, [S. l.], v. 275, p. 122882, 2020. DOI: 10.1016/J.JCLEPRO.2020.122882. Acesso em: 1 set. 2024.

WESSEL, D. M.; FLÜGGE, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. **Analytical biochemistry**, [S. l.], v. 138, n. 1, p. 141–143, 1984.

WILDT, Stefan; GERNGROSS, Tillman U. The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. **Nature Reviews Microbiology** 2005 3:2, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 119–128, 2005. DOI: 10.1038/nrmicro1087. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1087>. Acesso em: 28 abr. 2022.

WÖSTEN, Han A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 59, p. 65–70, 2019. DOI: 10.1016/J.COPBIO.2019.02.010. Acesso em: 10 ago. 2024.

XIONG, Jie et al. SLC1A1 mediated glutamine addiction and contributed to natural killer T-cell lymphoma progression with immunotherapeutic potential. **eBioMedicine**, [S. l.], v. 72, 2021. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103614. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103614>.

XU, Fei; ORUNA-CONCHA, Maria-Jose; ELMORE, J. Stephen. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 210, p. 163–171, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.105.

XU, Panli; WANG, Yuzhi; CHEN, Jing; WEI, Xiaoxiao; XU, Wei; NI, Rui; MENG, Jiaojiao; ZHOU, Yigang. Development of deep eutectic solvent-based aqueous biphasic system for the extraction of lysozyme. **Talanta**, [S. l.], v. 202, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.053.

XUAN, Jiancheng; TARENTINO, Anthony L.; GRIMWOOD, Brian G.; PLUMMER, Thomas H.; CUI, Tao; GUAN, Chudi; VAN ROEY, Patrick. Crystal structure of glycosylasparaginase from *Flavobacterium meningosepticum*. **Protein Science**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 774–781, 1998. DOI: 10.1002/PRO.5560070327. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.5560070327>. Acesso em: 29 jun. 2023.

YAMAGUCHI, Hiroshi; MIYAZAKI, Masaya. Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies. **Biomolecules**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 235–251, 2014. DOI: 10.3390/BIOM4010235. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24970214/>. Acesso em: 21 set. 2024.

YANG, Z.; RUSSELL, A. J. Fundamentals of non-aqueous enzymology. *Em*: KOSIKEN, A. M. P.; KLIBANOV, A. M. (org.). **Enzymatic Reactions in Organic Media**. 1. ed. [s.l.] : Chapman & Hall, 1996. p. 43–69.

YAO, Shunyu; METTU, Srinivas; LAW, Sam Q. K.; ASHOKKUMAR, Muthupandian; MARTIN, Gregory J. O. The effect of high-intensity ultrasound on

cell disruption and lipid extraction from high-solids viscous slurries of *Nannochloropsis* sp. biomass. **Algal Research**, [S. l.], v. 35, p. 341–348, 2018. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2018.09.004. Acesso em: 30 ago. 2024.

YOSHIMOTO, Takayuki; NISHIMURA, Hiroyuki; SAITO, Yuji; SAKURAI, Katsukiyo; KAMISAKI, Yoshinori; WADA, Hiroshi; SAKO, Masahiro; TSUJINO, Giichi; INADA, Yuji. Characterization of polyethylene glycol-modified L-asparaginase from *Escherichia coli* and its application to therapy of leukemia. **Japanese Journal of Cancer Research : Gann**, [S. l.], v. 77, n. 12, p. 1264–1270, 1986.

YU, Zhi Bin; JIN, Jiang Ping. Removing the regulatory N-terminal domain of cardiac troponin I diminishes incompatibility during bacterial expression. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 461, n. 1, p. 138–145, 2007. DOI: 10.1016/J.ABB.2007.01.011. Acesso em: 26 set. 2024.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 263, n. 7, p. 3194–3201, 1988. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)69054-4. Acesso em: 28 set. 2024.

ZASLAVSKY, Boris Y.; UVERSKY, Vladimir N.; CHAIT, Arnon. Analytical applications of partitioning in aqueous two-phase systems: Exploring protein structural changes and protein-partner interactions in vitro and in vivo by solvent interaction analysis method. **Biochimica et biophysica acta**, [S. l.], v. 1864, n. 5, p. 622–644, 2016. DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2016.02.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26923390/>. Acesso em: 13 set. 2024.

ZENATTI, Priscila Pini; MIGITA, Natacha Azussa; CURY, Nathália Moreno; MENDES-SILVA, Rosângela Aparecida; GOZZO, Fabio Cesar; DE CAMPOS-LIMA, Pedro Otavio; YUNES, José Andrés; BRANDALISE, Sílvia Regina. Low Bioavailability and High Immunogenicity of a New Brand of *E. coli* L-Asparaginase with Active Host Contaminating Proteins. **EBioMedicine**, [S. l.], v. 30, p. 158–166, 2018. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.03.005. Disponível em:

<http://www.thelancet.com/article/S2352396418300896/fulltext>. Acesso em: 20 jul. 2024.

ZHANG, Rui; GRIMI, Nabil; MARCHAL, Luc; LEOVKA, Nikolai; VOROBIEV, Eugène. Effect of ultrasonication, high pressure homogenization and their combination on efficiency of extraction of bio-molecules from microalgae *Parachlorella kessleri*. **Algal Research**, [S. l.], v. 40, p. 101524, 2019. DOI: 10.1016/J.ALGAL.2019.101524. Acesso em: 30 ago. 2024.

ZHANG, Xian; WANG, Zhi; WANG, Yimai; LI, Xu; ZHU, Manchi; ZHANG, Hengwei; XU, Meijuan; YANG, Taowei; RAO, Zhiming. Heterologous Expression and Rational Design of L-asparaginase from *Rhizomucor miehei* to Improve Thermostability. **Biology** 2021, Vol. 10, Page 1346, [S. l.], v. 10, n. 12, p. 1346, 2021. DOI: 10.3390/BIOLOGY10121346. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/10/12/1346/htm>. Acesso em: 8 abr. 2022.

ZHANG, Zhiwen; GILDERSLEEVE, Jeff; YANG, Yu Ying; XU, Ran; LOO, Joseph A.; URYU, Sean; WONG, Chi Huey; SCHULTZ, Peter G. A new strategy for the synthesis of glycoproteins. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 303, n. 5656, p. 371–373, 2004. DOI: 10.1126/SCIENCE.1089509. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14726590/>. Acesso em: 26 set. 2024.

ZHAO, Dongxin; HUANG, Zhongxian. Effect of His-Tag on Expression, Purification, and Structure of Zinc Finger Protein, ZNF191(243-368). **Bioinorganic Chemistry and Applications**, [S. l.], v. 2016, p. 1–6, 2016. DOI: 10.1155/2016/8206854.

ZHAO, Hua; BAKER, Gary A. Ionic liquids and deep eutectic solvents for biodiesel synthesis: a review. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [S. l.], v. 88, n. 1, p. 3–12, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.3935>. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.3935>.

ZHOU, Jie; ZHANG, Fuliang; MENG, Hengkai; BAO, Guanhui; ZHANG, Yanping; LI, Yin. Development of a silicon carbide disruption method enables efficient extraction of proteins from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 49, n. 12, p. 2199–2202, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.09.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511314004851>.

ZHOU, Yuhao; WU, Wei; ZHANG, Na; SOLADOYE, Olugbenga P.; ZHANG, Yuhao; FU, Yu. Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges. **Food Research International**, [S. l.], v. 161, p. 111842, 2022. DOI: 10.1016/J.FOODRES.2022.111842. Acesso em: 28 set. 2024.

ZIA, M. A.; BASHIR, Rabia; AHMED, Ishtiaq; IFTIKHAR, Tehreema. Production of L-asparaginase from *Aspergillus niger* using agro wastes by-products in submerged fermentation process. **J Teknologi**, [S. l.], v. 62, n. 2, p. 47–51, 2013.

ZYZAK, David V. et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 51, n. 16, p. 4782–4787, 2003. DOI: 10.1021/jf034180i.