

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGO ISOLADO
DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO EM MEIO CONTENDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL

SAMUEL LEITE CARDOSO

BRASÍLIA-DF

2018

SAMUEL LEITE CARDOSO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGO ISOLADO
DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO EM MEIO CONTENDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL

Volume Único

Dissertação apresentada como
requisito para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas
pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de Brasília

Orientadora: Profa. Dra. Pérola de
Oliveira Magalhães

BRASÍLIA-DF

2018

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

Catálogo da Publicação

Leite Cardoso, Samuel

LL533a AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGO ISOLADO DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO EM MEIO CONTENDO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL / Samuel Leite Cardoso; orientador Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista. -- Brasília, 2018.
83 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. L-asparaginase. 2. Fungos. 3. Purificação. 4. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas. 5. Resíduos Agroindustriais. I. de Oliveira Magalhães Dias Batista, Pérola, orient. II.

Título.

SAMUEL LEITE CARDOSO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGO ISOLADO
DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO EM MEIO CONTENDO RESÍDUO
AGROINDUSTRIAL

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

Aprovada em 14 de Junho de 2018.

Banca examinadora

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

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Paula Marcela Duque Jaramillo
Centro Universitário UDF

Dedico este trabalho a toda a minha família, em especial ao meu pai Edson Cardoso e minha mãe Graça por todo o incentivo e paciência ao longo desses anos.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível:

À Deus, provedor de toda sabedoria, amor, cuidado e da minha salvação.

Aos meus pais e irmão, que com tanto carinho, cuidado e atenção participaram deste trabalho

À minha noiva, Jéssica Diniz, futura esposa, pela paciência e amor durante todo o período do mestrado.

Aos meus amigos da Farmácia 28, José Reinaldo, João Paulo, Lucas Fraga, Filipe, Carol Taveira†, Dafny, Giulian, Lorena, Yuri, Juliana, Dani, Fernanda, Ludmila, e Mariana, por todos os momentos aproveitados.

Aos companheiros de trabalho do quinteto, Amanda Carneiro, Marcela Medeiros, Diegue Henrique e Paula Souza, por todos os momentos divertidos e conselhos.

Às técnicas, Patrícia e Júlia, por todo o empenho e dedicação na colaboração com todos os trabalhos do grupo.

Aos membros da banca de avaliação, por terem aceitado o convite e por dispensarem sua atenção e contribuição neste trabalho.

A todo o pessoal do Laboratório de Produtos Naturais e Controle da Qualidade de Medicamentos pela recepção, ajuda e paciência durante esse período.

À CAPES pela bolsa de mestrado

À minha orientadora, Professora Pérola de Oliveira Magalhães por ter demonstrado atenção em todos os minutos, pelo carinho, pela preocupação, por todas as oportunidades e pelo crescimento que obtive ao longo de todos os anos.

A todos o meu muito obrigado!

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste”.

Steve Jobs

Resumo

A enzima L-asparaginase tem sido utilizada com sucesso no tratamento de neoplasia maligna, como a leucemia linfoblástica aguda. Porém, com o desenvolvimento tecnológico, a busca por novas fontes de L-asparaginase tem se tornado cada vez mais atraente. Nesta direção, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção e purificação de uma L-asparaginase fúngica através de um sistema micelar de duas fases aquosas (Triton X-114/Tampão). O fungo codificado como 2DSST1 foi isolado do solo do Cerrado. Um delineamento de Plackett-Burman foi utilizado para determinar os efeitos de 11 variáveis na produção de L-asparaginase, seguido por um planejamento com composto central e um planejamento fatorial 2^4 completo. As variáveis avaliadas foram L-asparagina (X_1), L-prolina (X_2), farelo de trigo (X_3), caldo de batata-dextrose (X_4), sulfato de amônio (X_5), temperatura de incubação (X_6), tempo de fermentação (X_7), pH inicial do meio de cultura (X_8), extrato de levedura (X_9), sacarose (X_{10}) e concentração de glicose (X_{11}). O ensaio de asparaginase foi realizado avaliando a formação de β -hidroxamato aspártico. Um delineamento com composto central para os sistemas micelares de duas fases aquosas foi realizado em dois níveis (+1 e -1), utilizando-se a concentração de Triton X-114 (p/v), a temperatura da fase de separação e a concentração do extrato bruto (p/v). O coeficiente de partição de L-asparaginase (K) foi considerado como variável dependente (resposta) do planejamento experimental. 64 corridas foram realizadas e a atividade máxima (2,33 UI/mL) foi encontrada no ponto central do planejamento fatorial. As variáveis positivas significativas em um nível de confiança de 95% (L-asparagina, L-prolina, caldo de dextrose de batata e sacarose) foram avaliadas em 2 níveis (+1 e -1) com triplicatas no ponto central. Foram preparados 16 sistemas, 3 pontos centrais, 5 pontos axiais e 10 pontos fatoriais. O sistema 8 foi considerado o mais promissor, considerando o fator de purificação de 1,4 e o rendimento de 100%, indicando que não houve perda enzimática. Além disso, o valor de K de 0,07 indica a migração da L-asparaginase principalmente para a fase pobre em micelas do sistema. Este é o primeiro relato de um sistema micelar aplicado na pré purificação de uma L-asparaginase fúngica. **Palavras-Chave:** L-asparaginase, fungo, resíduo agroindustrial, purificação, sistema micelar de duas fases aquosas

Abstract

L-asparaginase has been successfully used in the treatment of malignant neoplasia, such as acute lymphoblastic leukemia. However, with technological development, the search for new sources of L-asparaginase has become increasingly attractive. Thus, the objective of this work was to study the production and purification of a fungal L-asparaginase through an aqueous two-phase micellar system (Triton X-114/Buffer). The fungus coded as 2DSST1 was isolated from the Cerrado soil. A Plackett-Burman design was used to determine the effects of 11 variables on the production of L-asparaginase, followed by a central composite design and a complete 2^4 full factorial design. The variables evaluated were L-asparagine (X1), L-proline (X2), wheat bran (X3), potato-dextrose broth (X4), ammonium sulfate (X5), incubation temperature (X6) (X7), the initial pH of the culture medium (X8), yeast extract (X9), sucrose (X10) and the glucose concentration (X11). The asparaginase assay was performed by evaluating the formation of β -aspartyl hydroxamate. A central compound design for aqueous two-phase micellar systems was performed at two levels (+1 and -1), using the concentration of Triton X-114 (w / v), the temperature of the separation phase and concentration of the crude extract (w / v). The partition coefficient of L-asparaginase (K) was considered as the dependent variable (response) of the experimental design. 16 systems, 3 central points, 5 axial points and 10 factorial points were prepared. 64 runs were performed and the maximum activity (2.33 IU / mL) was found at the central point of factorial planning. Significant positive variables at a 95% confidence level (L-asparagine, L-proline, potato dextrose broth and sucrose) were evaluated at 2 levels (+1 and -1) with triplicates at the central point. System 8 was considered the most promising, considering the purification factor of 1.4 and the yield of 100%, indicating that there was no enzymatic loss. In addition, the K value of 0.07 indicates the migration of L-asparaginase mainly to the micelle-poor phase system. This is the first report of a micellar system applied in the pre-purification of a fungal L-asparaginase. **Keywords:** L-asparaginase, fungus, wheat bran, purification, aqueous two-phase micellar system

Índice de Figuras

Figura 1: Reação catalisada pela L-asparaginase. Fonte: Narta et al. (2007) com modificações.....	1
Figura 2: Representação de um sistema micelar de duas fases aquosas. (Liu et al., 1996).....	19
Figura 3 : Representação da curva binodal de solução aquosa do tensoativo Triton X-114 obtida experimentalmente por (Lopes, 2010)......	21
Figura 4: Reação catalisada pela L-asparaginase para determinação da atividade enzimática.....	28
Figura 5: Cultivo do fungo 2DSST1. A – crescimento da biomassa após 24 horas; B – crescimento da biomassa após 96 horas	34
Figura 6: Atividade enzimática da L-asparaginase para diferentes resíduos. ...	34
Figura 7: Gráfico de superfície resposta para atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo em função das variáveis X1 (L-asparagina) e X2 (L-prolina).	41
Figura 8: Gráfico de superfície resposta para atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo em função das variáveis X1 (L-asparagina) e X10 (Sacarose).	45
Figura 9: Curva de coexistência obtida experimentalmente para o SMDFA Triton X-114/ Tampão Tris/HCl 0,05M pH 8,6.	47
Figura 10: Gráfico de Tendência. Resultados dos valores experimentais (eixo x) x valores preditos pelo modelo (eixo y), para cada corrida numerada.	51
Figura 11: Gráfico de superfície de resposta em função das variáveis Triton X-114 e Temperatura para a resposta K.	51

Índice de Tabelas

Tabela 1: L-asparaginases comerciais disponíveis para o tratamento de leucemia linfóide aguda.	2
Tabela 2: Principais alterações bioquímicas e hematológicas encontradas no tratamento com a utilização de L-asparaginase.	7
Tabela 3: Comparação entre as fermentações submersas e em estado sólido.	13
Tabela 4: Medicamentos biológicos disponíveis no Brasil aprovados pela ANVISA em 2016.	16
Tabela 5: Biofármacos produzidos por fungos e suas aplicações.	18
Tabela 6: Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de L-asparaginase em cultivo sólido sob influência de diferentes valores de pH, temperatura, tempo, L-prolina, L-asparagina, glicose.	27
Tabela 7: Níveis e valores codificados das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de L-asparaginase.	29
Tabela 8: Resultados obtidos quanto a composição de resíduos e substratos	33
Tabela 9: Resultados após diferentes métodos de extração para L-asparaginase produzida por cultivo em estado sólido em casca de soja.	35
Tabela 10: Matriz do Design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase em cultivo sólido. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo casca de soja como resíduo.	36
Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) para PBD da produção de L-asparaginase em casca de soja e farelo de trigo.	37
Tabela 12: Matriz do planejamento experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase em cultivo submerso.	

Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.....	39
Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) e efeito para PBD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo em estado submerso.	40
Tabela 14: Matriz do planejamento design do composto central com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.	41
Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) para o CCD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo. Incluindo as variáveis independentes.	43
Tabela 16: Matriz do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.	44
Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para o segundo CCD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo. Incluindo as variáveis independentes.	45
Tabela 18: Resultados obtidos para o Design de composto central para a extração líquido-líquido com variação dos parâmetros como temperatura, concentração de triton X-114 e concentração de extrato bruto de L-asparaginase.....	49
Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) para Design do composto central do coeficiente de partição da enzima (K).	50

Lista de Siglas e Abreviaturas

A_0 – Atividade do Caldo fermentado
 A_c – Atividade da fase concentrada
 A_d – Atividade da fase diluída
AeC - Atividade específica do caldo fermentado
Aed – Atividade específica da fase diluída
ANOVA – Análise de variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASNase – L- asparaginase
BDA – Ágar Batata Dextrose
BM – Balanço de Massa
CATB - Cetiltrimetilamônio
CCD – Design do Composto Central
CMC – Concentração Micelar Crítica
IAPO - *International Alliance of Patient's Organizations*
K – Coeficiente de partição
 K_p – Coeficiente de partição de proteínas totais
LLA – Leucemia Linfóide Aguda
PBD – Design Placket Burman
Pf – Fator de purificação
pH – Potencial hidrogeniônico
rpm – Rotações por minuto
RV – Razão Volumétrica
S - Seletividade
SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SMDFA – Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas
TCA – Ácido Tricloroacético
TRIS - 2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TRITON X-114 - Polioxietileno p-t-octil fenol
UI – Unidade Internacional
 V_0 – Volume do caldo fermentado

V_c – Volume da fase concentrada

V_d – Volume da fase diluída

η – Rendimento

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Leucemia	4
2.1.1. Leucemia Linfóide Aguda	5
2.2. L-asparaginase.....	6
2.3. Fungos.....	9
2.3.1. Processos de cultivo de micro-organismos.....	12
2.4. Biofármacos	15
2.5. Sistema micelar de duas fases aquosas.....	18
3. Objetivos	23
4. Materias e Métodos	24
4.1. Preparo de Soluções	24
4.2. Resíduos Agroindustriais	24
4.2.1. Tratamento dos resíduos.....	24
4.2.2. Composição dos resíduos	25
4.3 Seleção dos micro-organismos produtores	25
4.4. Quantificação de Proteínas Totais	25
4.5. Preparo do Meio de Cultivo em Estado sólido.....	26
4.5.1. Determinação da atividade enzimática em meio sólido	26
4.6. Obtenção de L-asparaginase no cultivo em estado sólido.....	26
4.7. Otimização da produção em cultivo sólido.	26
4.8. Determinação da atividade enzimática	27
4.9. Otimização da produção de L-asparaginase em cultivo submerso.	29
4.10. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)	30
4.10.1. Cálculo do coeficiente de partição, balanço de massa, razão volumétrica, rendimento, fator de purificação e seletividade.	30
4.11. Análise Estatística.....	31

5. Resultados e Discussão	33
5.1. Composição dos resíduos	33
5.2. Obtenção de L-asparaginase no cultivo em estado sólido.....	33
5.3. Avaliação da metodologia de rompimento celular na atividade enzimática	35
5.4. Otimização da produção de L-asparaginase em cultivo sólido.	35
5.5. Avaliação da produção de L-asparaginase em cultivo submerso utilizando farelo de trigo.....	38
5.6. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas.....	47
5.6.1. Curva de coexistência	47
5.6.2. Aplicação do sistema micelar de duas fases aquosas na purificação de L- asparaginase	48
6. Conclusão	53
7. Referências Bibliográficas	54

1. Introdução

A L-asparaginase (ASNase) também denominada L-asparagina amido hidrolase, EC 3.5.1.1, é uma enzima que catalisa seletivamente a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e ácido aspártico (Figura 1).

Células neoplásicas sintetizam em pequenas quantidades a enzima asparagina L-sintetase e por isso são incapazes de produzirem L-asparagina em níveis regulares. Enquanto isso, células normais do organismo possuem essa capacidade de produção. Essa diferença metabólica entre células neoplásicas e células normais torna viável o uso de L-asparaginase no tratamento de câncer, uma vez que, a ASNase esgota rapidamente os níveis extracelulares de asparagina bloqueando o metabolismo normal das células neoplásicas e impedindo a síntese de proteínas, de DNA e RNA, inibindo a proliferação celular (Brunton *et al.*, 2012).

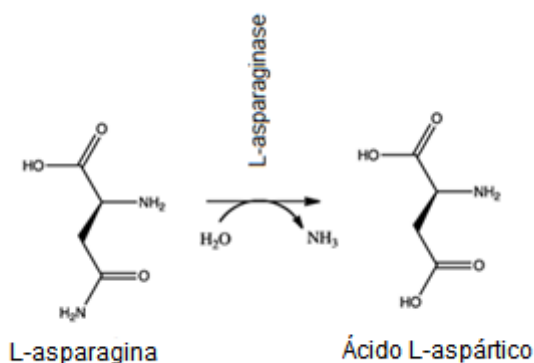


Figura 1: Reação catalisada pela L-asparaginase. Fonte: Narta et al. (2007) com modificações.

Em 1962 a ASNase foi incluída no tratamento da leucemia linfóide aguda. A combinação da L-asparaginase, corticoides e quimioterápicos tem se mostrado eficaz para a remissão da doença (Quintanilla-Flores *et al.*, 2014). A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de origem linfocitária caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea (Kebriaei *et al.*, 2002). Em pacientes adultos a taxa de cura ainda é de cerca de 40% o que pode ser considerada baixa. Pui (2006) atribui esse desempenho ruim a fatores como: resistência aos medicamentos, má adesão ao tratamento e à relutância em aceitar efeitos colaterais temporários (Pui e Evans, 2006).

A ASNase produzida por *Escherichia coli* é a mais aplicada no tratamento de LLA. Esta enzima comercial é administrada por via intramuscular ou por via endovenosa nas doses de 6.000 a 10.000 UI a cada três dias durante 3 a 4 semanas (Moghrabi *et al.*, 2007). Já a PEG-ASNase, pegaspargase, que é uma enzima conjugada com polímeros de polietileno glicol, também já produzida em escala industrial, é administrada em doses menores de 5.000 UI e geralmente é aplicada a cada 14 dias. A Tabela 1 mostra as L-asparaginases disponíveis no mercado para tratamento de LLA.

Tabela 1: L-asparaginases comerciais disponíveis para o tratamento de leucemia linfóide aguda.

Nome Comercial	Empresa Farmacêutica	Micro-organismo produtor
Kidrolase	EUSA pharma	<i>Escherichia coli</i>
Elspar	Merck Sharp & Dohme	<i>Escherichia coli</i>
Crasnitin	Bayer AG	<i>Escherichia coli</i>
Leunase	Sanofi-Aventis	<i>Escherichia coli</i>
Asparaginase Medac	Kyowa Hakko Kirin	<i>Escherichia coli</i>
Oncaspar	Sigma-Tau Pharmaceuticals	<i>Escherichia coli</i>
Erwinase	EUSA Pharma	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Leuginase	Bejin SL Pharmaceutical	<i>Escherichia coli</i>

Fonte: Pieters *et al.* (2011) adaptado e atualizado.

O tratamento com L-asparaginase de origem bacteriana apresenta alguns efeitos colaterais importantes como: crises neurológicas, anafilaxia, distúrbios de coagulação, leucopenia, trombose, pancreatite, hiperglicemia e hepatotoxicidade (Saeed *et al.*, 2017) e como pode ser visto na tabela 1, as enzimas presentes hoje no mercado, para o tratamento de LLA, são obtidas por meio de organismos procariotos como *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (Batool *et al.*, 2015).

A partir de 2012, o cenário nacional para a importação do medicamento aumentou exponencialmente, situação provocada pela falta de abastecimento do mercado nacional que era suprido somente pelo Laboratório Bagó. Até o final do ano 2015 o Brasil gastou cerca 1,4 milhões de dólares na importação da L-asparaginase. Segundo a base de dados *AliceWeb2* do Ministério de Indústria, Comércio, Exterior e Serviços até outubro de 2017 já foram gastos cerca de 370 mil dólares com importação de L-asparaginase (Brasil, 2018)

Em junho de 2017, a ANVISA aprovou a comercialização da Oncaspar® pela empresa Baxalta Brasil Biociência LTDA. A solução injetável de pegaspargase de *E.coli* contendo 750 UI/mL para o tratamento de LLA está disponível no Brasil até 2022.

No cenário mundial, é de grande importância a produção de L-asparaginase de origem eucariota. Uma vez que existe a possibilidade de diminuição nos efeitos adversos quando o uso é comparado ao medicamento proveniente de organismos procariotos.

A busca por novas fontes de L-asparaginase para o tratamento de leucemia linfóide aguda tem se tornado cada vez mais interessante. A utilização de métodos alternativos de cultivo e purificação que visam a diminuição nos custos de produção desta enzima também são pontos relevantes a serem observados. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo otimizar a produção de L-asparaginase a partir do cultivo fúngico utilizando resíduos agroindustriais e aplicar o meio otimizado à uma técnica não cromatográfica de purificação.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Leucemia

As leucemias são um grupo de patologias neoplásicas provenientes da proliferação descontrolada de células sanguíneas. Podem ser classificadas em agudas ou crônicas a depender da velocidade de crescimento das células, ou ainda, são classificadas de acordo com as linhagens das células em: mielóides, quando as células são da linhagem da medula óssea, ou linfóide se as células leucêmicas são de origem linfocitária (Sabath, 2013).

Em 2016 Organização Mundial da Saúde (OMS) inseriu novas classificações em tumores dos tecidos hematopoéticos e linfóides. Estas foram atualizadas em: neoplasias mieloproliferativas e mielodisplásicas, neoplasias mielóides com predisposição germinativa, leucemias agudas de linhagem ambígua, leucemia linfoblástica de linfócitos B, e leucemia linfoblástica de linfócitos T (Arber *et al.*, 2016).

Alguns fatores genéticos descritos na literatura podem ser citados como fatores que influenciam na manifestação positiva da LLA, são exemplos: o aparecimento de LLA juntamente com a síndrome de Down (Hertzberg *et al.*, 2010), a presença de neurofibromatose (Stiller *et al.*, 1994) e a síndrome de Bloom (Passarge, 1991). Além dos fatores genéticos, o *National Institute of Cancer* (NCI) apresenta que exposição à altas doses de radiação no período pré-natal e tratamentos quimioterápicos prévios são fatores de risco para o desenvolvimento da LLA.

O diagnóstico é primeiramente realizado através de microscopia óptica. A doença é caracterizada após o resultado da contagem de células anormais. Outros exames diagnósticos podem ser descritos, como exames imunológicos e colorações histoquímicas (Sabath, 2013).

O tratamento irá depender da origem da célula neoplásica. A linhagem celular geralmente é caracterizada por citometria de fluxo. Uma técnica em que os anticorpos marcados com fluorescência se ligam especificamente à superfície celular de células leucêmicas, e logo após esse processo a fluorescência é medida através de um aparelho (Sabath, 2013).

Segundo o INCA foram estimados cerca de 10.000 casos de leucemia no Brasil em 2016 (Inca, 2016). Belson (2007) define a leucemia como um câncer raro, porém esta patologia é responsável por 30% das neoplasias diagnosticadas em crianças menores que 15 anos. Dentre estas, aproximadamente 75% são diagnosticadas com Leucemia linfóide aguda (Belson *et al.*, 2007; Onciu, 2009).

2.1.1. Leucemia Linfóide Aguda

A Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna de origem linfocitária caracterizada pelo acúmulo de células imaturas na medula óssea (Kebriaei *et al.*, 2002). A LLA possui um pico de incidência em crianças com idade entre 2 e 5 anos. Entretanto só representa cerca de 20% das leucemias agudas diagnosticadas em adultos (Kebriaei *et al.*, 2002; Onciu, 2009). Em 2015 a taxa de sobrevivência em crianças era de até 80%. Os sintomas mais comuns referentes a LLA incluem: astenia, palidez e cansaço. Além de serem bastante variáveis estão também relacionados aos graus de anemia, neutropenia e trombocitopenia (Kebriaei *et al.*, 2002; Onciu, 2009; Almeida, 2015).

A terapia de remissão da LLA consiste em duas fases: 1) indução e remissão; 2) fase de intensificação ou consolidação. Na fase de indução e remissão busca-se afetar 99% das células leucêmicas e restaurar a hematopoese do paciente com o uso de glicocorticoides, vincristina e um agente antineoplásico, geralmente a L-asparaginase. Na fase seguinte, depois de restaurado o processo de renovação das células sanguíneas, o tratamento continua com altas doses de L-asparaginase, metotrexato e mercaptopurina (Pui e Evans, 2006).

Desde 1962 diversas drogas são administradas no tratamento de LLA. A combinação da L-asparaginase, corticóides e quimioterápicos tem se mostrado eficaz para a remissão da doença (Quintanilla-Flores *et al.*, 2014). O transplante com células hematopoiéticas pode ser realizado naqueles pacientes que não respondem bem ao tratamento quimioterápico. Esse procedimento consiste em um transplante de células extraídas da medula óssea, do sangue periférico ou do cordão umbilical de um doador compatível (Almeida *et al.*, 2015).

2.2. L-asparaginase

A ASNase foi inicialmente descoberta por Lang (1904) em tecidos de carne bovina. Em 1953, Kidd observou pela primeira vez o efeito antitumoral da enzima em soro de cobaia *Cavia porcellus*, esses resultados foram confirmados por Broome (1961). Anos depois Oettgen *et al.* (1967) estudou a atividade anti-leucêmica em humanos.

Cedar e Schwartz (1967) identificaram 2 isoformas da L-asparaginase: L-asparaginase I e L-asparaginase II (Cedar e Schwartz, 1967). A primeira isoforma encontra-se majoritariamente no citosol celular e tem menor afinidade pelo substrato L-asparagina, enquanto a segunda isoforma com maior afinidade pelo aminoácido, encontra-se no espaço periplasmático de bactérias e fungos (Yun *et al.*, 2007). L-asparaginases de origem bacteriana possuem peso molecular variado de 34 a 200 KDa. Sua conformação varia de homodímero a homotetrâmero. O ponto isoelétrico dessa enzima é encontrado entre pH 5,5 e 8,5 (Manna *et al.*, 1995; Pritsa e Kyriakidis, 2001; Khushoo *et al.*, 2004; Krasotkina *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2011; Sudhir *et al.*, 2014)

A cristalização da L-asparaginase II comercial (Elspar®) revelou um homotetrâmero, com 2 subunidades enzimáticas e dois domínios em cada subunidade. Cada domínio possui um sítio ativo responsável pela catálise dos substratos. Possivelmente o mecanismo de ação desta enzima está relacionado a um ataque nucleofílico no grupo amida da L-asparagina. Com base na proximidade das cadeias laterais do aspartato, tem-se como nucleófilos potenciais a Thr-12, Tyr-25, Ser-58 e Thr-89. A partir da análise da posição e orientação do produto formado pode-se afirmar que o resíduo de aminoácido com maior probabilidade de atuar como nucleofilo é a Thr-89 (Swain *et al.*, 1993).

Apesar dos 40 anos de pesquisa, os mecanismos moleculares associados à ação catalítica da L-asparaginase e os efeitos secundários do tratamento ainda não estão plenamente elucidados (Borek *et al.*, 2014).

Existem três formas de tratamento para LLA utilizando L-asparaginase na prática clínica: a enzima nativa derivada de *Escherichia coli*, a enzima pegilada e uma ASNase isolada de *Erwinia chrysanthemi*.

Alterações bioquímicas em pacientes usando L-asparaginase para o tratamento de LLA, como a redução dos níveis de L-glutamina, já são esperadas. O que é justificado pelo mecanismo de ação de enzima e pela afinidade que

pode apresentar pelo substrato L-glutamina. Alterações hematológicas já são bem descritas na literatura. O uso de ASNase para o tratamento de leucemia linfóide aguda é geralmente relacionado com a redução dos níveis séricos de antitrombina III, fibrinogênio e o aparecimento de tromboembolismo e acidentes hemorrágicos. A redução dos níveis de antitrombina III é a alteração mais estudada (Johnston, P. G. *et al.*, 1974; Anderson, N. *et al.*, 1979; Priest, J. R. *et al.*, 1982; Gugliotta, L. *et al.*, 1990; Risseeuw-Appel *et al.*, 1994; Kirschke, R. *et al.*, 1998; Beinart, G. e Damon, L., 2004; Athale, U. H. *et al.*, 2005; Appel, I. M. *et al.*, 2006; Merryman, R. *et al.*, 2012; Merlen, C. *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017a). Além disso, alguns estudos apresentaram alterações bioquímicas, com destaque para alterações na função de tireoide (Heidemann, P. H. *et al.*, 1981; Pui *et al.*, 1981b; Fadilah, S. A. *et al.*, 2000; Bodmer, M. *et al.*, 2006; Kearney, S. L. *et al.*, 2009; Van Der Sluis, I. *et al.*, 2013; Misgar, R. A. *et al.*, 2015). A Tabela 2 mostra os principais efeitos adversos encontrados na literatura no tratamento de LLA com L-asparaginase.

Tabela 2: Principais alterações bioquímicas e hematológicas encontradas no tratamento com a utilização de L-asparaginase.

Referência	Tipo de Estudo	Principal alteração	Origem da L-asparaginase	Características da enzima
Anderson, Norwood <i>et al.</i> (1979)	Estudo de casos	Redução dos níveis de antitrombina III	<i>E. coli</i>	NR
Appel, Inge M <i>et al.</i> (2006)	Cego randomizado	Redução dos níveis de plasminogênio	<i>E. coli</i> <i>E. chrysanthemi</i>	NR
Athale, Uma H <i>et al.</i> (2005)	NR	Tromboembolismo	NR	NR
Beinart, Garth e Damon, Lloyd (2004)	NR	Redução nos níveis de fibrinogênio/ Tromboembolismo	NR	NR
Bodmer, Michael <i>et al.</i> (2006)	Estudo de caso	Elevação nos parâmetros de Fosfatase Alcalina, Bilirrubina, TGO, TGP e Amonia	NR	NR
Fadilah, S. <i>et al.</i> (2000)	Estudo de casos	Redução temporária nos níveis de T3	NR	NR

Tabela 2: Principais alterações bioquímicas e hematológicas encontradas no tratamento com a utilização de L-asparaginase (Continuação).

Referência	Tipo de Estudo	Principal alteração	Origem da L-asparaginase	Características da enzima
Gugliotta, Luigi et al. (1990)	Cego randomizado	Redução dos níveis de antitrombina III	<i>E. coli</i>	NR
Heidemann, P. et al. (1981)	NR	Redução dos níveis de TBG e T3 temporariamente	NR	NR
Huang et al. (2017b)	Randomizado	Anemia, Trombocitopenia, Leucocitopenia, Aumento de transaminases	NR	NR
Johnston, P. et al. (1974)	Estudo de caso	Neutrofilia	<i>E. coli</i>	NR
Kearney, Susan L et al. (2009)	Randomizado	Elevação dos níveis de lipase e amilase	<i>E. coli</i>	ASNase + PEG
Kirschke, Ralf et al. (1998)	NR	Tromboembolismo	<i>E. coli</i>	NR
Merlen, Clémence et al. (2015)	NR	Redução dos níveis de antitrombina III e fibrinogênio	<i>E. coli</i> <i>E. chrysanthemi</i>	ASNase + PEG
Merryman, Reid et al. (2012)	NR	Mielossupressão	<i>E. coli</i> <i>E. chrysanthemi</i>	ASNase + PEG
Misgar, Raiz Ahmad et al. (2015)	Estudo de caso	Hipoglicemia	NR	NR
Priest, John R et al. (1982)	Randomizado	Redução dos níveis de antitrombina III e fibrinogênio	NR	NR
Pui et al. (1981a)	Estudo retrospectivo	Hiperglicemia	NR	NR
Risseuw-Appel et al. (1994)	Randomizado	Redução nas concentrações de fibrinogênio	<i>E. coli</i> <i>E. chrysanthemi</i>	NR
Van Der Sluis, Inge et al. (2013)	NR	Redução dos níveis séricos de glutamina	NR	NR

NR: não relatado.

Diversos exemplos de produção da ASNase são encontrados na literatura. Badoei-Dalfard (2015), purificou, otimizou e caracterizou uma L-asparaginase de origem bacteriana de uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. Neste estudo, o autor utilizou métodos estatísticos para a otimização da produção onde foram avaliados parâmetros como: pH, concentração de L-asparagina, glicose, extrato de levedura, sulfato de magnésio, fosfato de potássio, e cloreto de sódio. Após clonagem e purificação, a atividade máxima encontrada utilizando o método proposto por Imada e colaboradores (1973) para a quantificação de amônia livre foi identificado 785 UI. O SDS-PAGE revelou uma única banda de 34 KDa. As características encontradas nesse estudo, como baixo peso molecular e pouca afinidade pela L-glutamina, tornam interessante o uso desta ASNase para aplicações medicinais.

Outro estudo demonstrou a produção da enzima em *Pseudomonas fluorescens* como estrutura homotetramérica e peso molecular total de 140 KDa. A ASNase purificada apresentou uma atividade de 26 UI/mg de proteína e meia vida maior que a L-asparaginase comercialmente disponível de *E.coli*. Além disso, a melhor resposta de catálise enzimática foi encontrada em temperatura e pH fisiológicos, um bom indicativo de uso na terapêutica (Sindhu e Manonmani, 2018).

Souza e colaboradores identificaram 19 estudos relacionados à produção de L-asparaginase de origem fungica. Dos 19 estudos selecionados, somente 6 apresentaram total purificação da enzima. O que demonstra mais uma vez a necessidade de produção desta enzima por micro-organismos eucariotos. Os estudos de purificação de asparaginase selecionados nessa revisão sistemática apresentaram enzimas com pesos molecular variando de 35 para 133 kDa (Souza *et al.*, 2017)

2.3. Fungos

O reino *Fungi* é formado por uma variedade de micro-organismos. Até 2014 cerca 110.000 fungos foram descritos no mundo, porém são estimadas de 500 mil a 5 milhões de espécies. São seres uni ou pluricelulares, eucariotos (Wasser, 2014). Possuem a capacidade de se reproduzirem assexuadamente pela fragmentação de hifas ou formação de esporos. O tipo de esporos é uma

das formas de identificação desses organismos, além disso a reprodução sexuada também pode ocorrer pela propagação dessas microestruturas (Tortora *et al.*, 2009). Os fungos podem ser classificados em quatro grupos: Ascomicetos, Basidiomicetos, Zigomicetos e Deuteromicetos (Kanagawa, 2011).

A principal fonte de carbono desses organismos é a glicose, no entanto, são raros os casos onde pode-se observar glicose livre para obtenção e conversão em energia. O reino *Fungi* possui indivíduos com enzimas capazes de quebrar a maioria dos polímeros de carbono transformando-os em glicose. A absorção de moléculas de açúcares pode acontecer por difusão facilitada ou difusão ativa (Watkinson *et al.*, 2015).

O crescimento desses organismos passa por quatro etapas, iniciando por uma fase de adaptação ao meio de cultivo (fase lag), seguida de uma fase de crescimento exponencial (fase logarítima). Na fase logarítima observa-se a produção de metabólitos primários como macromoléculas de proteínas, polissacarídeos, DNA e RNA. Em seguida, observa-se um nivelamento na população total de micro-organismos (fase estacionária) onde nota-se a presença de metabólitos secundários - antibióticos, toxinas, pigmentos e hormônios. Posteriormente, observa-se o esgotamento de nutrientes no meio, originando a fase de declínio onde acontece a redução de células viáveis (Brock *et al.*, 1994).

Os fungos podem reagir à diversos estímulos extracelulares como temperatura, intensidade da luz, pH, composição espectral, gravidade, toque e até mesmo níveis de nutrientes disponíveis no meio. Fungos termotolerantes são aqueles capazes de crescer a temperaturas de 50°C ou mais. Fungos termófilos são reconhecidos pela sua incapacidade de crescimento abaixo de 20°C, no entanto podem se adaptar a temperaturas de até 75°C. A grande maioria dos fungos que não são nem termotolerantes nem termofílicos, são denominados mesófilos e possuem capacidade de crescimento em temperaturas entre 15°C e 40 °C (Watkinson *et al.*, 2015). O crescimento fúngico em várias temperaturas não depende apenas de fatores genéticos intrínsecos de cada espécie, mas também de outros parâmetros físicos de crescimento e da disponibilidade de nutrientes (Kavanagh, 2017).

Os fungos não são diazotróficos, ou seja, não possuem a capacidade de fixar nitrogênio, no entanto, essa molécula é ideal para a formação de

aminoácidos e precisa ser fornecida através de compostos contendo azoto, quer sob a forma inorgânica como os sais de amônio ou sob a forma orgânica, tais como aminoácidos. O sulfato de amônio é comumente utilizado como fonte de nitrogênio em meios de crescimento de fungos (Kavanagh, 2017).

Os fungos filamentosos representam um rico reservatório de produtos naturais nas quais muitas vezes encontram-se atividades biológicas potentes com aplicações em diferentes campos. Os produtos naturais com alto valor comercial podem ser produzidos por metabolismo microbiano primário ou secundário (Watkinson *et al.*, 2015).

Em regra, fungos filamentosos são conhecidos pela capacidade de secretar em grandes quantidades metabólitos primários e secundários no meio extracelular. A maioria das enzimas secretadas são hidrolíticas e desempenham papel importante na nutrição celular (El-Enshasy, 2007).

Várias espécies de fungos filamentosos foram exploradas em processos industriais para a produção de metabólitos e enzimas industriais. Espécies do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são altamente conhecidas pelas suas capacidades de produção de diferentes moléculas. Esses organismos têm grande importância industrial na produção de enzimas de interesse farmacêutico, β -galactosidase (Cardoso *et al.*, 2017; Niu *et al.*, 2017), L-asparaginase (Dias *et al.*, 2016; Saeed *et al.*, 2018) proteases alcalinas (Salihi *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2017). Além disso, ainda são responsáveis pela produção de uma grande variedade de compostos tais como: antibióticos (Barbosa *et al.*, 2017; Ziemons *et al.*, 2017), agentes anticancerígenos (Evidente *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017b), estatinas (Boruta e Bizukojc, 2017; Subhan *et al.*, 2017), imunossupressores (Ismail, 2017; Lu *et al.*, 2017), entre outros.

Enzimas microbianas possuem a vantagem de serem produzidas em grande quantidade por técnicas de fermentação e cultivo já estabelecidas. Além disso, o uso de biologia molecular auxilia na modificação do aparato genético e cria novas e mais simples possibilidades de produção de biofármacos em microorganismos quando comparados com organismos mais complexos como plantas e animais (Stanbury *et al.*, 2013).

A liberação de enzimas é regulada em tempo e espaço de acordo com disponibilidade de substrato e as condições de crescimento em que o fungo se encontra. O mercado global de enzimas geradas por fermentação excede US\$

5 bilhões, e a fermentação por filamentos fungos representam metade dessa produção (Watkinson *et al.*, 2015).

2.3.1. Processos de cultivo de micro-organismos

A fermentação é um processo realizado há milhares de anos, sua definição é originária do verbo em latim *fervere* que significa ferver, um conceito referente ao estado observado nas bebidas que eram submetidas a esse processo. A definição restrita consiste na formação de produtos através de processos anaeróbios. No entanto, a fermentação passou a ter diferentes significados para bioquímicos e microbiologistas industriais. O significado bioquímico tem relação com a geração de energia pelo catabolismo de compostos orgânicos como por exemplo a glicose, enquanto seu significado na microbiologia industrial se estendeu para qualquer processo capaz de produzir algum produto pela reprodução da cultura de micro-organismos (Stanbury *et al.*, 2013).

Processos de fermentação ou de cultivo tem como objetivo principal a produção de biomassa como produto final, de enzimas microbianas, de metabólitos primários e secundários, de produtos recombinantes, além da finalidade em se obter modificações químicas em um composto adicionado ao processo (Stanbury *et al.*, 2013).

A fermentação submersa se caracteriza pelo crescimento microbiano em meio de cultivo líquido e sob agitação. Esse processo oferece uma série de vantagens como a facilidade de controle de parâmetro físico-químicos, maior eficiência de absorção de nutrientes diminuindo o tempo de processo e gerando altos rendimentos. A fermentação submersa pode ser conduzida em biorreatores aerados com capacidade de 20 a 1000 litros (Elba, 2008).

Divide-se o processo de fermentação submersa em três modelos: 1) batelada simples: aonde, no frasco de cultivo ou no biorreator, o processo de fermentação acontece de forma única e direta, sem a adição ou retirada do meio reacional. A dificuldade encontrada nessa técnica é a supressão do micro-organismo pela alta concentração de produto e baixa concentração de substrato. 2) batelada alimentada: processo definido pela adição de um ou mais substratos ao decorrer do tempo. 3) batelada contínua: método no qual existe a adição de substrato e a retirada de produto ao longo do tempo. Esse método é o mais

utilizado pela indústria, no entanto enfrenta problemas de contaminação e alterações genéticas que podem ocorrer nos micro-organismos (Elba, 2008; Stanbury *et al.*, 2013).

Já a fermentação em estado sólido é uma técnica utilizada há muitos séculos e tem se tornado cada vez mais importante. O conceito refere-se basicamente no crescimento de micro-organismos em substratos sólidos úmidos ou na ausência de água (Botella *et al.*, 2005).

A fermentação em estado sólido torna-se mais atraente do que a fermentação submersa pois possui maior simplicidade, baixo custo, produção de níveis elevados de enzimas além de permitirem a possibilidade do uso de resíduos agroindustriais de baixo custo e amplamente disponíveis como substratos (De Castro *et al.*, 2015). A Tabela 3 mostra comparativamente as diferenças existentes entre fermentação submersa e fermentação em estado sólido para cada fator existente no processo.

Tabela 3: Comparação entre as fermentações submersas e em estado sólido.

Fator	Fermentação Submersa	Fermentação em estado sólido
Substrato	Substratos solúveis	Matriz complexa de substratos insolúveis
Condições assépticas	Esterilização por calor e controle asséptico	Esterilização por vapor
Água	Grande volume de água consumido	Consumo pequeno de água
Aeração	Limitação de oxigênio solúvel. Alto nível de oxigênio necessário	-
Aquecimento metabólico	Fácil controle de temperatura	Difícil controle de temperatura
Controle de pH	Fácil controle de pH	Substratos adicionados de tampão
Agitação	Boa e necessária homogeneização	Condições estáticas
Escalonamento	Equipamentos industriais disponíveis	Equipamentos industriais disponíveis
Inóculo	Inóculo fácil e possibilidade de processo contínuo	Produção em batelada e inoculação de esporos
Contaminação	Alto risco de contaminação	Baixo risco de contaminação
Consideração energética	Alto consumo de energia	Baixo consumo de energia

Tabela 3: Comparação entre as fermentações submersas e em estado sólido (Continuação).

Fator	Fermentação Submersa	Fermentação em estado sólido
Volume do equipamento	Grande volume e tecnologia de médio/alto custo	Baixos volumes e baixos custos de equipamentos
Efluente e poluição	Alto volume de efluentes	Baixa taxa de poluição

Fonte: Raimbault (1998) com modificações.

Diversas enzimas são produzidas a partir da fermentação em estado sólido. Novelli *et al.* (2016) demonstraram a produção de proteases a partir de diferentes espécies de *Aspergillus* em fermentação em estado sólido em resíduos de farelo de trigo e soja. A exploração de celulases de fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* para a indústria de papel e celulose a partir de fermentação em estado sólido de resíduos de trigo, de café, de soja e bagaço de cana também é bem descrita na literatura (Hu *et al.*, 2011; Cerda *et al.*, 2017; Idris *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017). No setor de alimentos e detergentes também pode-se citar a aplicação de lipases obtidas por meio de fermentação em estado sólido (Hu *et al.*, 2011; Cerda *et al.*, 2017; Idris *et al.*, 2017).

Além disso, a produção de etanol, bioetanol (Talebnia *et al.*, 2010; Canabarro *et al.*, 2017), e biogás (Yahmed *et al.*, 2017) é uma realidade. O uso de resíduos agroindustriais como casca de soja e farelo de trigo podem ser uma grande estratégia para a produção de compostos bioativos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (Divate *et al.*, 2017; Meghavarnam e Janakiraman, 2017). Os resíduos industriais são reconhecidos como importantes fontes renováveis de biocombustíveis e outros produtos de valor agregado. Estes resíduos são compostos por polímeros de celulose, hemicelulose e lignina. Devido à sua heterogeneidade, várias enzimas microbianas são utilizadas para catalisar a hidrólise destes polímeros. A composição dos materiais lignocelulósicos utilizados como indutores enzimáticos tem diferentes efeitos na produção de enzimas por culturas fúngicas (Rodrigues *et al.*, 2017).

Resíduos do tratamento da soja e do trigo são amplamente utilizados para a produção de diversas enzimas extracelulares. De Castro *et al.* (2015)

observaram a produção de protease de *Aspergillus niger* de 262,78 U/g após 48 horas de fermentação utilizando farelo de trigo e grãos de soja em estado sólido. Esse estudo mostra a relação sinérgica do uso de diferentes resíduos com um aumento de 581,7% na produção desta enzima quando o cultivo foi comparado com resíduos individuais como farelo de trigo, farelo de soja, farelo de algodão e casca de laranja.

O uso de farelo de trigo também foi estudado por Couri e colaboradores na produção de xilanases, proteases e poligalacturonases através da fermentação em estado sólido do fungo *Aspergillus niger* durante 42 horas (Couri *et al.*, 2000).

Deste modo, o uso de resíduos agroindustriais para o desenvolvimento de processos biotecnológicos é uma ótima estratégia para a obtenção de biomoléculas através de fermentação em estado sólido como a obtenção de enzimas com alto valor agregado e baixo custo de produção (De Castro *et al.*, 2015).

2.4. Biofármacos

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os medicamentos biológicos são macromoléculas de alto peso molecular produzidos a partir do emprego de tecnologia microbiana, ou de origem animal. A legislação brasileira, na Resolução Diretoria do Colegiado nº 55 de 16/12/2010 abrange seis categorias de produtos: alérgenos, anticorpos monoclonais, biomedicamentos, hemoderivados, probióticos e vacinas (Anvisa, 2011).

Esses biofármacos podem ser produzidos por meio de cultivo e fermentação de células microbianas. Outra vertente para a produção de medicamentos biológicos é a utilização de engenharia recombinante onde buscam-se alterações no DNA celular para a produção de moléculas específicas.

A terapia com medicamentos biológicos é um grande avanço da medicina nas últimas décadas. Existem mais de 250 produtos comercialmente disponíveis e mais da metade das terapias oncológicas em desenvolvimento são de origem biológica (Gifoni *et al.*, 2017)..

Segundo a *International Alliance of Patient's Organizations* (IAPO) em seu "Guia rápido sobre Medicamentos biológicos e biossimilares" os medicamentos biológicos possuem maior probabilidade de causarem reações imunológicas

devido ao tamanho da molécula. Outra característica é que esses medicamentos geralmente são administrados por via endovenosa ou intramuscular e são geralmente utilizados para doenças mais graves. O que difere da maioria dos medicamentos sintéticos, que são administrados por via oral, com menor probabilidade de causarem reações imunológicas por serem moléculas pequenas (Iapo, 2013). No entanto, os biofármacos agem de forma mais específica que os medicamentos sintéticos usados para o tratamento de câncer. Por serem mais seletivos tendem a destruir somente as células malignas. Em consequência pode-se observar uma diminuição nos efeitos adversos (De Sousa Brandão e De Souza, 2016).

Em 2016, a ANVISA registrou 882 novos medicamentos, sendo 25 medicamentos biológicos. Foi registrado um aumento de mais de 200% referente aos registros de 2014. Os medicamentos biológicos registrados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Medicamentos biológicos disponíveis no Brasil aprovados pela ANVISA em 2016.

Medicamentos biológicos aprovados pela ANVISA em 2016	Princípio Ativo
	Betainterferona 1A
Bexsero®	Vacina adsorvida meningocócica B recombinante
Cyramza®	Ramucirumabe
Eloctate®	Alfafmorocotocogue
Elprolix®	Alfaeftrenonacogue
Hepatect®	Imunoglobulina humana anti hepatite B
Hexaxim®	Vacina adsorvida difteria, tétano, pertussis
Intratect®	Imunoglobulina humana
Keytruda®	Pembrolizumabe
Kollagenase®	Colagenase
Menveo®	Vacina meningocócica ACWY conjugada
Opdivo®	Nivolumabe
Plegridy®	Betapeginterferona 1A

Tabela 4: Medicamentos biológicos disponíveis no Brasil aprovados pela ANVISA em 2016 (Continuação).

Medicamentos biológicos aprovados pela ANVISA em 2016	Princípio Ativo
Praluent®	Alirocumabe
Prolia®	Denosumabe
Repatha®	Evolocumabe
Saxenda® ()	Liraglutida
Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis (acelular)	
Vacina adsorvida hepatite a (inativada)	
Vacina <i>Haemophilus influenzae</i> b (conjugada)	
Vacina hepatite B (recombinante)	
Vacina poliomielite 1, 2 e 3 (inativada)	
Vacina poliomielite 1, 3 atenuada	
Xgeva®	Denosumabe
Zarzio®	Filgrastim

Fonte: Anvisa (2017).

No documento publicado pela ANVISA referente ao ano de 2016 nenhum medicamento biológico registrado é de origem fúngica, encontram-se somente medicamentos provenientes de *E.coli*, *Clostridium histolyticum*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenza*, hemoderivados e algumas linhagens celulares como células de murino (NS0). Todos os medicamentos são fabricados a partir de técnicas de DNA recombinante. Neste contexto, faz-se necessário a exploração de medicamentos produzidos através de organismos eucariotos. A Tabela 5 traz exemplos de fungos produtores de biofármacos e suas aplicações em diversos tratamentos.

Tabela 5: Biofármacos produzidos por fungos e suas aplicações.

Composto	Micro-organismos	Aplicação	Referência
Paclitaxel	<i>Aspergillus aculeatinus</i> <i>Taxomyces andrenae</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Tratamento de carcinoma avançado de ovário	(Stierle <i>et al.</i> , 1993; Elavarasi <i>et al.</i> , 2012; Qiao <i>et al.</i> , 2017)
β-Galactosidase	<i>Aspergillus foetidus</i>	Intolerância a Lactose	(Martarello, 2016)
Lovastatina	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Hipercolesterolemia	(Mouafi <i>et al.</i> , 2016; Rahim <i>et al.</i> , 2017)
L-asparaginase	<i>Aspergillus terreus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Flammulina velutipes</i>	Tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda	(Nakahama <i>et al.</i> , 1973; Eisele <i>et al.</i> , 2011; Baskar e Renganathan, 2012; Dias <i>et al.</i> , 2016; Meghavarnam e Janakiraman, 2017)
Ergotamina	<i>Claviceps purpúrea</i>	Tratamento de Enxaqueca	(Tudzynski <i>et al.</i> , 1999)
Anfotericina B	<i>Penicillium nalgiovense</i>	Antifúngico	(Svahn <i>et al.</i> , 2015)

Fonte: Jozala *et al.* (2016) com modificações

2.5. Sistema micelar de duas fases aquosas

O sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA) é uma variação de um sistema tradicional entre um polímero e uma fase aquosa contendo certa concentração de um sal, esse sistema tradicional é conhecido como sistema de duas fases aquosas (SDFA). O SMDFA é um método mais eficiente para a recuperação de biomoléculas e é mediado pela separação de fases com o uso de tensoativos (Nadar *et al.*, 2017). Esse sistema tem despertado bastante interesse para purificar e concentrar moléculas como albumina (Shiomori *et al.*, 1998; Pawar *et al.*, 2017), antibióticos (Rundlett e Armstrong, 1995; Soto *et al.*, 2005), enzimas (Rangel-Yagui, 2003; Jaramillo *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017a), ácido clavulânico (Guedes De Andrade *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2011; Haga *et al.*, 2013) e compostos orgânicos (Saitoh e Hinze, 1991).

Métodos tradicionais para a purificação de biomoléculas envolvem várias etapas como cromatografias, métodos de diálises, ultrafiltração ou até mesmo métodos não cromatográficos. No entanto, a utilização de um sistema de duas fases pode ser uma boa estratégia para antecipar uma das etapas do processo (Mazzola *et al.*, 2008).

O SMDFA baseia-se na concentração de micelas na fase superior do sistema e na fase inferior após o aumento da temperatura (Figura 2). Essa diferença de concentração é a base para separação de biomoléculas, visto que existe uma diferença físico química em cada fase do sistema (Mazzola *et al.*, 2008; Becker *et al.*, 2009).

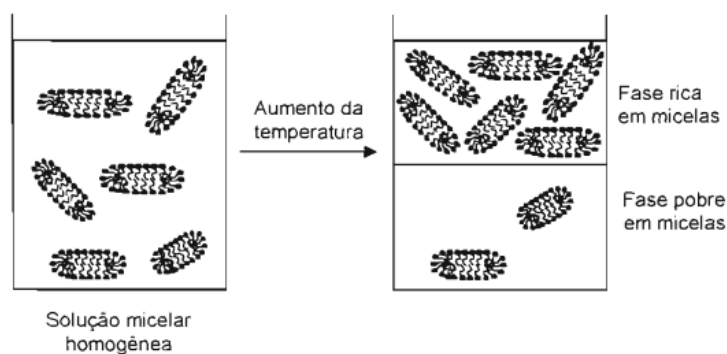


Figura 2: Representação de um sistema micelar de duas fases aquosas. (Liu *et al.*, 1996)

Uma molécula de tensoativo consiste basicamente de duas partes químicas distintas: 1) a porção hidrofílica, comumente conhecida como “cabeça polar”; e 2) a porção hidrofóbica referida como "cauda". Devido a esta estrutura química quando as moléculas de tensoativos são dissolvidas em água além de uma concentração mínima conhecida como concentração de micelas críticas (CMC), eles formam espontaneamente estruturas agregadas conhecidas como micelas na solução aquosa.

Os tensoativos podem ser enquadrados em 3 diferentes classificações: 1) iônicos: moléculas que apresentam carga elétrica na porção polar, podendo ser negativa (tensoativo aniônico) ou positiva (tensoativo catiônico). São exemplos de tensoativos iônicos o dodecil sulfato de sódio (SDS) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CATB). 2) não iônicos: são moléculas que não fornecem íons em solução aquosa e a sua solubilidade em água se deve à presença de grupamentos funcionais que são extremamente hidrofílicos. Como exemplo de tensoativo não-iônico pode-se citar o polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114). 3) zwitteriônicos: essas moléculas em condições normais apresentam um momento dipolo em meio aquoso, também são conhecidos como tensoativos

anfóteros. Um exemplo de tensoativos zwitteriônico é o dioctanoilfosfatidilcolina (C8-lecitina) (Rossi *et al.*, 2006).

As principais forças que regem a montagem de estruturas micelares tem origem na interação hidrofóbica na interface hidrocarboneto-água, que induz as moléculas à repulsão hidrofílica, a força iônica ou estérica das cabeças polares que impõe a exigência oposta de que eles permanecem em contato com a água (Israelachvili, 2011).

Existem diversos fatores que influenciam na partição entre duas fases. O principal fator é o tamanho da molécula ou a área de superfície, outra condição importante é o potencial elétrico entre as fases que auxilia na separação de moléculas através das suas cargas. Outras condições a serem avaliadas são, as propriedades hidrofóbicas do sistema e a conformação das moléculas (Asenjo, 1990). O comportamento da enzima em um sistema micelar de duas fases aquosas pode ser definido pelo coeficiente de partição (K) que é determinado pela razão entre a atividade enzimática encontrada na fase pobre em micelas e a fase rica em micelas.

Lopes e colaboradores (2014) estudaram a influência da adição de sais em sistemas de micelares de duas fases aquosas utilizando tensoativos não iônicos. A escolha do sal e a sua concentração possuem grande importância quando avaliada a partição de compostos em condições extremas. A adição de sal em SMDFA diminui a temperatura de partição do ponto de névoa, facilitando a extração das biomoléculas. Um exemplo é a diminuição do coeficiente de partição de uma proteína pouco hidrofílica, o que implica na migração mais eficiente desta proteína para a fase pobre em micelas (Lopes *et al.*, 2014).

A separação de fases pode ser representada por uma curva em forma de sino, denominada curva binodal com concavidades para cima ou para baixo a depender do aumento ou diminuição da temperatura. A curva binodal representa graficamente a relação entre a concentração de tensoativo e temperatura na qual existe ou não a separação das fases (Nikas *et al.*, 1992). A Figura 3 representa uma curva binodal para o sistema micelar de duas fases aquosas do tensoativo Triton X-114/Tampão. A curva binodal para esse tipo de sistema apresenta concavidade voltada para cima, onde o ponto inferior é denominado ponto crítico que está relacionado diretamente com a temperatura crítica e a concentração mínima de agente tensoativo (Rangel-Yagui, 2003).

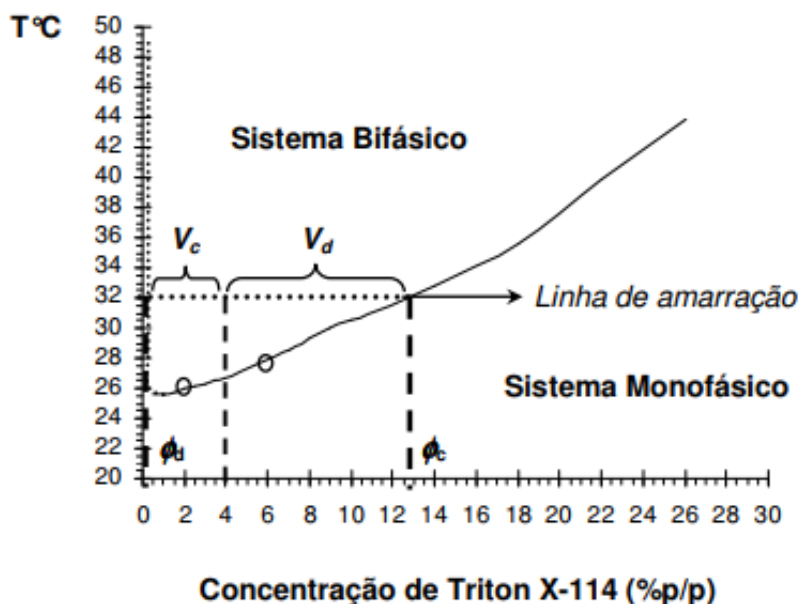


Figura 3 : Representação da curva binodal de solução aquosa do tensoativo Triton X-114 obtida experimentalmente por (Lopes, 2010).

Onde, V_c : volume da fase concentrada; V_d : volume da fase diluída

A partição de uma biomolécula também pode ser mais seletiva quando utilizado um sistema de micelas mistas consistindo em tensoativos carregados, ou de ligantes de afinidade de tipo surfactante, misturados com tensoativos não iônicos (Mazzola *et al.*, 2008; Chuo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017b)

A primeira aplicação do SMDFA na literatura foi apresentada por Bordier (1981) Este estudo apresenta a migração de proteínas hidrofílicas como albumina, catalase e mioglobina para a fase pobre em micelas, enquanto proteínas hidrofóbicas como acetilcolinesterase e citocromo c oxidase migraram para a fase rica em micelas do sistema (Bordier, 1981).

Caprara (2016) estudou a purificação de proteases utilizando o SMDFA. Proteases menores que 100 KDa foram capazes de migrar para a fase aquosa do sistema, o que foi representado pelo coeficiente de partição menor que 1. O sistema contendo 10% de Triton X-114, 10% do caldo fermentado e submetido a 31°C apresentou um balanço de massa de 80% e rendimento de aproximadamente 138%. A purificação parcial das proteases presentes na amostra foi confirmada por zimograma onde as bandas proteicas com atividade proteolítica apresentaram pesos moleculares de aproximadamente 19 e 30 KDa (Caprara, 2016).

A partição de uma lipase produzida por levedura foi estudada por Duarte e colaboradores (2015). Neste caso o coeficiente de partição maior que 1 indica migração desta enzima para a fase rica em micelas. O SMDFA construído através de diferentes concentrações de Triton X-114 e tampão foi capaz de apresentar um fator de purificação de 1,7 e 73% de rendimento (Duarte *et al.*, 2015).

Malpiedi e colaboradores (2014) utilizaram um SMDFA com Triton X-114 para avaliar a partição de um fragmento de anticorpo obtido diretamente do sobrenadante da fermentação de *Pichia pastoris*. O melhor desempenho foi alcançado com 4% de tensoativo e 60% do caldo fermentado. O sistema ainda apresentou um rendimento de 88% e um fator de purificação de 2 (Malpiedi *et al.*, 2014). Lopes e colaboradores (2011) foram capazes de separar proteínas na fase pobre em micelas e remover contaminantes como lipopolissacarídeos para a fase rica em micelas (Lopes *et al.*, 2011). Esses resultados demonstram a potencial aplicabilidade destes sistemas.

3. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal estudar a produção de L-asparaginase de origem fúngica utilizando resíduos agroindustriais.

Para isso, objetivos secundários foram traçados:

1. Produzir e otimizar a enzima L-asparaginase em cultivo sólido utilizando resíduos agroindustriais;
2. Produção e otimizar a enzima L-asparaginase em cultivo submerso utilizando resíduos agroindustriais;
3. Utilizar uma metodologia para a pré-purificação da enzima.

4. Materias e Métodos

4.1. Preparo de Soluções

Tampão Tris-HCl 0.05M

O tampão Tris-HCl 0,05M foi preparado por meio da solubilização de 6,05 g de trisaminometano ($C_4H_{11}NO_3$) em 800 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 8,6 com solução 1,0 M de HCl, após o ajuste foi completado o volume para 1 L.

Solução de L-asparagina 0,1 M

Para o preparo da solução de L-asparagina, 0,132 g de L-asparagina foram solubilizadas em 10 mL de água purificada. A solução foi preparada nos dias de uso, em momentos antes da realização dos ensaios enzimáticos.

Solução de cloridrato de hidroxilamina 2 M

O preparo da solução estoque de hidroxilamina 2 M ocorreu a partir da dissolução de 13,89 g em 100 mL de água purificada. A solução foi mantida sob refrigeração a 4 °C. No momento do uso, a solução foi diluída na proporção de 1:1 com uma solução de NaOH 2 M.

Solução de $FeCl_3$ /TCA/HCl

Solução A – Foi solubilizado 16,48 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ em 100 mL de água purificada.

Solução B - Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 7,00 mL de HCl 37 % e 20 mL de TCA 6,1 M (100% p/v). O volume do balão foi completado com água purificada.

Ao final, as duas soluções foram unidas e armazenadas sob refrigeração.

4.2. Resíduos Agroindustriais

4.2.1. Tratamento dos resíduos

A casca de soja e o farelo de trigo foram gentilmente cedidos após processos realizados na safra de cultivo da região do Programa de Assentamento Dirigido do Distrito Federal. Os resíduos foram previamente autoclavados por 2 horas a 121°C e pressão a 1 atm. Em seguida lavados em

água corrente. Os resíduos foram então secos em estufa de circulação de ar a 60°C durante 48 horas. Para o cultivo em estado líquido a casca de soja foi pulverizada com um auxílio de um liquidificador até a obtenção de um pó fino.

4.2.2. Composição dos resíduos

A casca de soja, o farelo de trigo, o caldo batata dextrose e o extrato de levedura que foram utilizados neste trabalho foram enviados para a Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Paulista (IQ-USP) e analisados quanto a sua composição em massa de carbono, nitrogênio e hidrogênio.

4.3 Seleção dos micro-organismos produtores

Para identificação dos possíveis fungos produtores de L-asparaginase foi utilizada a metodologia proposta por Gulati (1997) com modificações. No meio contendo 0,2% glicose, 1% L-asparagina, 0,15% KH_2PO_4 , 0,052% KCl, 0,052% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2% ágar (p/v), pH 6,2 e suplementado com vermelho de fenol (0,009% concentração final) foi inoculado um disco de micélio com 5mm de diâmetro. As amostras permaneceram incubadas por 48 horas a 30°C. Depois desse período avaliou-se o aparecimento de um halo rosado ao redor das colônias. Esse experimento foi realizado pelo grupo do laboratório onde selecionou-se diversos fungos produtores de L-asparaginase, entre eles, o fungo utilizado nesse trabalho codificado como 2DSST1.

4.4. Quantificação de Proteínas Totais

O teor de proteínas totais foi determinado por meio da utilização do *Kit Pierce™ BCA Protein Assay*. Onde 25 μL da amostra foram submetidos à reação com 200 μL (solução Kit 50:1) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente ao tempo de reação a leitura foi realizada a 570 nm em leitor de microplacas. Uma curva de calibração foi construída utilizando albumina nas concentrações de 2 a 2000 $\mu\text{g/mL}$.

4.5. Preparo do Meio de Cultivo em Estado sólido

Em frascos tipo erlenmeyer de 125 mL adicionaram-se 5 g de resíduo agroindustrial, casca de soja ou farelo de trigo. O inóculo do material biológico foi realizado com discos de 5 mm de diâmetro do fungo 2DSST1 cultivado em meio Batata Dextrose Ágar (BDA). A atividade enzimática foi avaliada após 7 dias de cultivo para ambas as amostras.

4.5.1. Determinação da atividade enzimática em meio sólido

A torta contendo resíduo e o fungo 2DSST1 foi filtrada após 10 minutos em contato com tampão Tris/HCl 0,05M pH 8,6 sob agitação a 25°C. Para realização da atividade enzimática, foi utilizado 0,1g da torta filtrada. O cultivo foi realizado em duplicata, no entanto o ensaio enzimático foi realizado em triplicata.

4.6. Obtenção de L-asparaginase no cultivo em estado sólido.

Como triagem inicial o fungo 2DSST1, identificado pelo grupo do laboratório em colaboração com o Laboratório de Genética e Biologia da Embrapa Agroenergia foi cultivado em casca de soja e testado para 3 métodos de extração da enzima. Em um primeiro momento foram adicionados 50 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,6, antes da filtração, as amostras foram submetidas a agitação após determinados períodos de tempo (10 a 60 minutos) e condições diferentes: 1) agitador magnético; 2) sonicador. A atividade foi analisada tanto na torta quanto no filtrado.

Um último ensaio independente foi realizado para observar a extração enzimática mecânica através da maceração por gral e pistilo. As amostras submetidas aos processos de extração por maceração foram congeladas por 24 horas à -80°C e então maceradas até a obtenção de um pó fino. Este ficou em contato com tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,6 durante 10 minutos sob agitação. Após esse processo, a mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C. A atividade enzimática foi avaliada no sobrenadante da amostra.

4.7. Otimização da produção em cultivo sólido.

Foram adicionados 5 g de resíduo em frascos tipo erlenmeyers de 125 mL. Um disco de 5mm de diâmetro foi inoculado em cada frasco. O resíduo foi

umedecido com 5 mL de soluções em diferentes valores de pH contendo diferentes concentrações de L-asparagina, L-prolina e glicose. Para a identificação dos fatores mais importantes na produção em meio sólido foi proposto um delineamento experimental Plackett–Burman Design (PBD) onde foram realizados 15 ensaios. Optou-se por adicionar um número reduzido de variáveis e induzir a produção enzimática de L-asparaginase utilizando como maior parte o resíduo disponível para o crescimento da biomassa. pH, temperatura, tempo, L-prolina, L-asparagina e glicose, foram as variáveis definidas em dois níveis: superior (+1) e inferior (-1) (Tabela 6)

Após análise do delineamento por PBD optou-se por um planejamento fatorial do composto central. Para esse planejamento, houve a variação somente das variáveis significativas definidas pelo PBD. Decidiu-se então pela exclusão de variáveis não significativas segundo a análise de variância.

Tabela 6: Níveis e valores das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de L-asparaginase em cultivo sólido sob influência de diferentes valores de pH, temperatura, tempo, L-prolina, L-asparagina, glicose.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores		
		-1	0	+1
pH	X_1	5,5	7,5	9,5
Temperatura (°C)	X_2	25	30	35
Tempo (horas)	X_3	48	72	96
L-prolina (%)	X_4	0,5	1,0	1,5
L-asparagina (%)	X_5	0,5	1,0	1,5
Glicose (%)	X_6	0,5	1,25	2,0

4.8. Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi determinada segundo o método proposto por Drainas e colaboradores (1977) com modificações (Figura 4). Onde, uma unidade de L-asparaginase é definida como a quantidade de enzima que formou

1 μmol de β -hidroxamato aspártico em 1 minuto. 0,5 mL da amostra foram incubados na presença de 0,2 mL de L-asparagina 0,1M e 0,2 mL de cloridrato de hidroxilamina 1M. O volume da reação foi completado com 1,1 mL de tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,6. A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos. Após o tempo de incubação a reação foi interrompida com 0,5 mL da solução $\text{FeCl}_3/\text{TCA}/\text{HCl}$. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos sucedida da leitura a 500 nm em espectrofotômetro (Biomate 3S Thermo Scientific). Foi construída uma curva padrão variando as concentrações de β -hidroxamato aspártico de 0 a 3,0 μM . O cálculo da atividade enzimática foi determinada a partir da seguinte equação (Equação 1):

$$\text{Atividade de L - asparaginase} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mL}} \right) = \frac{\mu\text{mol de } \beta\text{-hidroxamato aspártico} \times 2,5\text{mL}}{\text{VA} \times \text{Tempo}}$$

Equação 1

VA = volume da amostra.

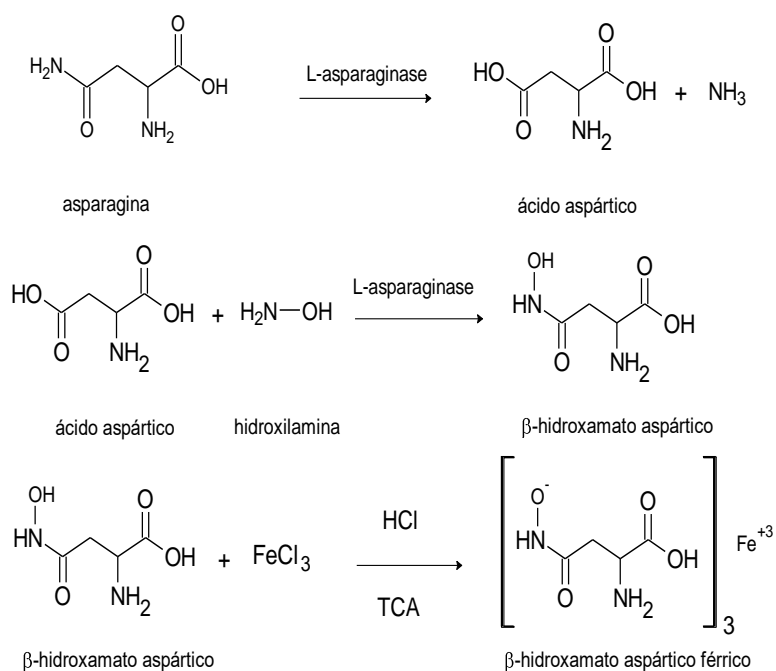


Figura 4: Reação catalisada pela L-asparaginase para determinação da atividade enzimática

4.9. Otimização da produção de L-asparaginase em cultivo submerso.

Os cultivos em condições submersas foram realizados em frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio mínimo (0,15% K_2HPO_4 ; 0,052% KCl; 0,052% $MgSO_4$; 0,001% $FeSO_4$; 0,001% $ZnSO_4$; 0,001% $CuSO_4$, p/v). Foram inoculados $3,7 \times 10^7$ esporos. Foi proposto um delineamento experimental Plackett–Burman design (PBD) com triplicata no ponto central para avaliar a interação de 11 variáveis independentes na produção enzimática. Farelo de trigo foi utilizado como resíduo agroindustrial. Os níveis inferiores (-1) e superiores (+1), assim como os valores do ponto central (0) estão descritos na Tabela 7.

Após realizado o PBD, as variáveis significativas com efeitos positivo foram submetidas à metodologias de superfície de resposta através do Design do Composto Central (CCD) e planejamento fatorial 2^4 . As variáveis não significativas foram excluídas do planejamento. As variáveis significativas com efeito negativo foram mantidas no menor nível.

Tabela 7: Níveis e valores codificados das variáveis independentes do processo experimental para o estudo da produção de L-asparaginase.

Variáveis independentes	Símbolos	Níveis e valores		
		-1	0	+1
L - asparagina (%)	X_1	0,40	0,90	1,40
L - prolina (%)	X_2	0,50	1,75	3,00
Resíduo (%)	X_3	1,00	3,00	5,00
Caldo batata dextrose (%)	X_4	1,00	3,00	5,00
Sulfato de amônia (%)	X_5	0,50	1,50	2,50
Temperatura (°C)	X_6	25	30	35
Tempo (h)	X_7	48	72	96
pH	X_8	5	7	9
Extrato de Levedura (%)	X_9	0,50	1,00	1,50
Sacarose (%)	X_{10}	0,20	0,70	1,20
Glicose (%)	X_{11}	0,20	0,70	1,20

4.10. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

Os SMDFA foram construídos através de diferentes concentrações de Triton X-114. Todos os sistemas continham 3 g, onde variou-se as concentrações do tensoativo, do caldo enzimático e a temperatura a qual os sistemas eram submetidos. Uma curva de coexistência entre Triton-X114/Tampão Tris-HCl foi estabelecida segundo o ponto de névoa (Van Der Meeren *et al.*, 2002) variando as concentrações de triton X-114 em: 2, 4, 6, 8 e 10 % (p/p), na qual determinou-se em quais regiões o sistema se tornaria bifásico. Os sistemas foram submetidos a determinadas temperaturas em banho maria durante 1 hora, em seguida permaneciam em temperatura ambiente por 30 minutos. As fases eram separadas e submetidas ao ensaio de determinação enzimática.

4.10.1 Cálculo do coeficiente de partição, balanço de massa, razão volumétrica, rendimento, fator de purificação e seletividade.

O coeficiente de partição (K) foi determinado através das atividades enzimáticas definidas para cada fase do sistema (Equação 2):

$$K = \frac{A_c}{A_d} \quad \text{Equação 2}$$

Os balanços de massa (BM) foram calculados para identificar possíveis perdas da enzima durante o processo. A Equação 3 determina como foram calculados os balanços de massa:

$$BM = \frac{A_c V_c + A_d V_d}{A_0 V_0} \times 100\% \quad \text{Equação 3}$$

Onde, A_0 refere-se às atividades da L-asparaginase no caldo fermentado inicialmente adicionada ao sistema, A_c e A_d referem-se as atividades nas fases com alta concentração de micelas e baixa concentração de micelas, respectivamente. V_c , V_d e V_0 são os volumes das fases concentrada (c), diluída (d) e da solução estoque (0) inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

A razão volumétrica (R) foi determinada através do volume de ambas as fases, segundo a seguinte expressão (Equação 4):

$$R = \frac{V_d}{V_c} \quad \text{Equação 4}$$

Onde V_d = volume da fase diluída e V_c = volume da fase concentrada.

O rendimento (η) foi determinado a partir da Equação 5.

$$\eta = \frac{(V_t \times A_{rt})}{(V_0 \times C_0)} \times 100\% \quad \text{Equação 5}$$

Sendo que, V_t = volume da fase em que a L-asparaginase foi extraída na maior proporção; A_{rt} = Atividade enzimática na fase onde há maior proporção de extração. V_0 = volume de caldo sujeito a extração; C_0 = atividade da enzimática da amostra original.

O fator de purificação (PF) foi calculado através da razão da atividade específica (UI/mg de proteína) na fase superior e no caldo fermentado (Equação 6).

$$PF = \frac{A_{ed}}{A_{ec}} \quad \text{Equação 6}$$

Em que: A_{ed} = Atividade específica (UI/mg de proteína) na fase pobre em micelas

A_{ec} = Atividade específica (UI/mg de proteína) no caldo fermentado.

A seletividade (S) foi calculada pela razão do coeficiente de partição (K) e o coeficiente de partição das proteínas totais (K_p) (Equação 7).

$$S = \frac{K}{K_p} \quad \text{Equação 7}$$

4.11. Análise Estatística

A análise estatística e os planejamentos experimentais foram realizados com o auxílio do Design-Expert® Software Version 7.0 - Stat-Ease. A análise de variância (ANOVA) tem como objetivo revelar o quanto de variância total existe

entre e dentro dos grupos avaliados. Se a maior parte de variância estiver entre os grupos, então, provavelmente, existe um efeito significativo. Entretanto, se a maior parte da variância está dentro dos valores do mesmo grupo, não existe, provavelmente, um efeito significativo.

A ANOVA foi calculada a partir da média dos ensaios realizados em triplicata. O desvio padrão de todos os ensaios foi menor que 5%; Foram considerados significativas as variáveis com valor de $p > 0,05$.

5. Resultados e Discussão

5.1. Composição dos resíduos

Os resultados da composição dos resíduos utilizados neste trabalho como substrato para o meio de cultivo para o crescimento do fungo 2DSST1 estão presentes na Tabela 8.

Tabela 8: Resultados obtidos quanto a composição de resíduos e substratos

Resíduo	Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Relação C:N
Farelo de Trigo	41,15	5,65	2,92	14,04
Casca de Soja	42,96	6,41	1,77	24,27
Caldo Batata Dextrose	39,41	6,83	4,20	9,38
Extrato de Levedura	39,38	6,09	11,76	3,34

Pode-se observar maior quantidade de nitrogênio no farelo de trigo quando comparado a casca de soja. O extrato de levedura apresentou maior quantidade de nitrogênio, conseqüentemente menor relação Carbono/Nitrogênio foi calculado para esse substrato. Os valores das quantidades de cada elemento presente nos substratos foram utilizados para posterior cálculo da relação Carbono/Nitrogênio presente em cada meio de cultivo.

O carbono e nitrogênio são substâncias elementares de uma célula fúngica. O carbono é uma fonte imprescindível para a geração de energia. O nitrogênio participa da formação de duas macromoléculas importantes: as proteínas e os ácidos nucleicos. Moléculas essas, essenciais para o crescimento fúngico. Uma relação carbono nitrogênio elevada (10:1) pode garantir o conteúdo proteico no meio de cultura, entretanto, um excesso (50:1) pode favorecer a produção de metabólitos secundários (Esposito e Azevedo, 2004). Visto isso, é de extrema importância controlar a relação carbono nitrogênio nos meios de cultura visando uma melhor produção da enzima de interesse.

5.2. Obtenção de L-asparaginase no cultivo em estado sólido

Após 7 dias de cultivo do fungo 2DSST1 em meio sólido contendo casca de soja ou farelo de trigo pode-se observar o crescimento fúngico, e a atividade da enzima L-asparaginase pode ser quantificada no micélio. Foi encontrada uma

atividade de 0,017 UI/g no cultivo contendo casca de soja. No entanto, estes valores são inferiores ao encontrado na literatura por diversos autores. Meghavarnam e Janakiraman (2017) trabalharam com uma cepa de *Fusarium culmorum* (ASP-87) e quantificaram 18,91 UI/g quando avaliado crescimento no meio contendo 50% de farelo de trigo e 50% de casca de soja (Meghavarnam e Janakiraman, 2017). Kumar e Manonmani (2013) identificaram 9,67 UI quando avaliaram a produção de L-asparaginase em farelo de trigo a partir do fungo *Cladosporium* sp (Kumar e Manonmani, 2013). A Figura 5 mostra o crescimento micelial.

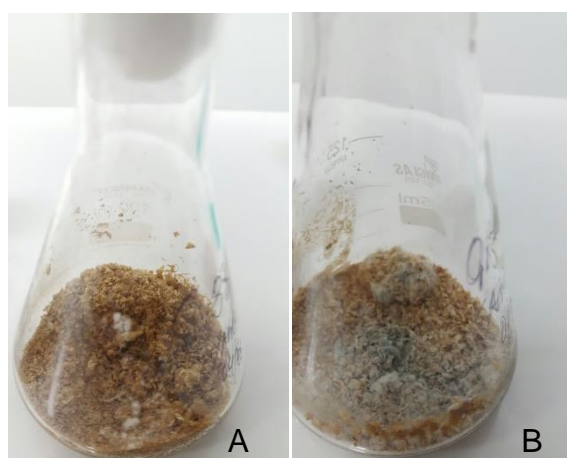


Figura 5: Cultivo do fungo 2DSST1. A – crescimento da biomassa após 24 horas; B – crescimento da biomassa após 96 horas

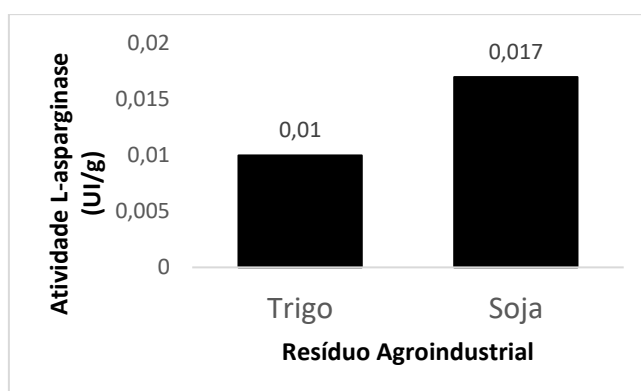


Figura 6: Atividade enzimática da L-asparaginase para diferentes resíduos.

5.3. Avaliação da metodologia de rompimento celular na atividade enzimática

Considerando que a L-asparaginase encontra-se no espaço periplasmático da membrana celular, foi necessário o estudo do rompimento da parede e liberação da enzima. O fungo 2DSST1 foi cultivado em casca de soja e ensaios foram realizados buscando obter a maior atividade de L-asparaginase. Independentemente do método o ensaio para quantificação de L-asparaginase foi realizado no filtrado e na torta.

Não foi possível determinar a atividade no filtrado de cada amostra, dado que era esperado, devido à localização da enzima no espaço periplasmático (Cedar e Schwartz, 1967). Foi então determinado que deveria ocorrer um rompimento da membrana celular para a liberação da enzima. A atividade enzimática na torta de 0,05 UI/g foi aumentada em cerca de 2 vezes (0,103 UI/g) quando a extração com gral e pistilo foi utilizada. Os resultados obtidos para cada etapa da extração estão disponíveis na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados após diferentes métodos de extração para L-asparaginase produzida por cultivo em estado sólido em casca de soja.

Método		Atividade L-asparaginase no filtrado (UI/g)	Atividade L-asparaginase micélio (UI/g)
Sonicador			
Tempo	30 min	0,00	0,05
	60 min	0,00	0,04
Agitador Magnético			
Tempo	10 min	0,00	0,04
	30 min	0,01	0,05
	60 min	0,01	0,01
Extração com gral e pistilo		-	0,103

A partir desse resultado, todas as amostras foram submetidas à maceração com gral e pistilo antes de serem submetidas ao ensaio para determinação da atividade enzimática.

5.4. Otimização da produção de L-asparaginase em cultivo sólido.

Foram realizadas 15 corridas no design Plackett–Burman para a identificação das variáveis significativas na produção de L-asparaginase em

cultivo sólido utilizando casca de soja ou farelo de trigo como resíduos (Tabela 10). A maior atividade encontrada foi determinada com a utilização de casca de soja, corrida 2 com 0,31 UI/mL. Porém a ANOVA (Tabela 10) identificou somente uma variável significativa, o tempo de cultivo (X_3 , $p=0,03$). O $R^2 = 0,61$ indica que esse modelo não pode ser utilizado para determinar a atividade enzimática. Quando analisada a produção com farelo de trigo, a atividade máxima foi encontrada na corrida 5 com 0,25 UI/mL.

Tabela 10: Matriz do Design experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase em cultivo sólido. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo casca de soja como resíduo.

Corrida	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	Atividade L-asparaginase em farelo de trigo (UI/mL)	Atividade L-asparaginase em casca de soja (UI/mL)
1	9,5	35	48	1,5	1,5	2	0,134	0,075
2	5,5	35	96	0,5	1,5	2	0,17	0,31
3	9,5	25	96	1,5	0,5	2	0,215	0,285
4	5,5	35	48	1,5	1,5	0,5	0,127	0,091
5	5,5	25	96	0,5	1,5	2	0,256	0,13
6	5,5	25	48	1,5	0,5	2	0,111	0,04
7	9,5	25	48	0,5	1,5	0,5	0,14	0
8	9,5	35	48	0,5	0,5	2	0,098	0,069
9	9,5	35	96	0,5	0,5	0,5	0,15	0,225
10	5,5	35	96	1,5	0,5	0,5	0,144	0,109
11	9,5	25	96	1,5	1,5	0,5	0,198	0
12	5,5	25	48	0,5	0,5	0,5	0,087	0,049
13	7,5	30	72	1	1	1,25	0,136	0,063
14	7,5	30	72	1	1	1,25	0,167	0,114
15	7,5	30	72	1	1	1,25	0,141	0,183

X_1 : pH; X_2 : Temperatura ($^{\circ}$ C); X_3 : Tempo de incubação (horas); X_4 : L-prolina (%); X_5 : L-asparagina (%); X_6 : Glicose

Kumar e colaboradores (2013) analisaram a resposta de atividade de L-asparaginase para o fungo *Cladosporium sp.* em função das variáveis umidade, temperatura, pH, concentração do inóculo e tempo de incubação. O fungo obteve maior atividade em farelo de trigo (3,74 UI). Segundo a análise de variância, todas as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos na produção de

L-asparaginase. No planejamento proposto por este trabalho para a produção de L-asparaginase em farelo de trigo, a ANOVA (Tabela 11) apresentou significância nas variáveis temperatura ($p=0,03$), tempo de incubação ($p=0,0003$) e concentração de L-asparagina ($p=0,01$) (Kumar *et al.*, 2013).

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) para PBD da produção de L-asparaginase em casca de soja e farelo de trigo.

Fonte	Casca de Soja		Farelo de Trigo	
	F-value	p-value	F-value	p-value
Modelo	1,86	0,2178	9,81	0,0025
X1: pH	0,06	0,8034	0,32	0,5867
X2: Temperatura	1,67	0,2370	6,79	0,0314
X3: Tempo de cultivo	6,42	0,0390	38,1	0,0003
X4: L-prolina	0,40	0,5481	0,16	0,7022
X5: L-Asparagina	0,35	0,5740	9,7	0,0143
X6: Glicose	2,25	0,1773	3,82	0,0865
Falta de Ajuste	2,31	0,3297	1,67	0,4211

Atividade L-asparaginase em farelo de trigo = $+0.062500 + 1.66667 \text{ E-}003 * X_1 - 3.06667 \text{ E-}003 * X_2 + 1.51389 \text{ E-}003 * X_3 + 4.66667 \text{ E-}003 * X_4 + 0.036667 * X_5 + 0.015333 * X_6$

Atividade L-asparaginase em casca de soja = $- 0.23398 - 3.12500 \text{ E-}003 * X_1 + 6.25000 \text{ E-}003 * X_2 + 2.55208 \text{ E-}003 * X_3 - 0.030500 * X_4 - 0.028500 * X_5 + 0.048333 * X_6$

$R^2_{\text{farelo de trigo}} = 0,88$. $R^2_{\text{casca de soja}} = 0,61$. Nível de significância de 95%.

Dias e colaboradores determinaram uma atividade de L-asparaginase de 89,22 U/g utilizando uma combinação de 3 resíduos, farelo de trigo, farelo de soja e farinha de algodão. Essa atividade foi determinada em 96 horas o que se assemelha ao tempo de incubação necessário para gerar as melhores atividades presentes no cultivo em estado sólido presente neste trabalho (Dias *et al.*, 2015).

No entanto, é válido ressaltar que os resultados presentes na literatura avaliam a produção de L-asparaginase através do método proposto por Imada e colaboradores (1973). Esse método quantifica a liberação de amônia no meio de cultivo como produto da reação catalisada pela L-asparaginase. Entende-se que, amônia pode ser um produto de metabolismo de diversos substratos presente

no meio de cultivo, logo, pode haver alterações que superestimem a atividade enzimática quando determinada por esse método. Essa hipótese já foi avaliada em trabalho anterior pertencente ao grupo do laboratório (Almeida, 2015). E por considerarmos a amônia presente no meio um interferente na metodologia apresentada por diversos autores, nós questionamos estes altos valores de L-asparaginase relatados na literatura e passamos a estudar a produção da enzima de interesse pela metodologia proposta por Drainas e colaboradores (1977), que por fundamentar-se na quantificação de β -hidroxamato aspártico liberado no meio pela presença da enzima L-asparaginase, diminui a interferência na quantificação pela metodologia proposta por Imada e colaboradores (1973), quando utilizada para avaliar a atividade enzimática em meio líquido. É importante dizer que a metodologia proposta por Imada *et al.* (1973) pode ser corretamente aplicada na quantificação da L-asparaginase purificada, onde não existe mais a interferência da amônia no método.

Além da interferência da amônia na metodologia inicial utilizada para quantificar a enzima de interesse presente no caldo fermentado e no micélio, observou-se que após o processo de fermentação em estado sólido não era possível separar o micélio do resíduo agroindustrial o que ocasionava posterior interação do resíduo da soja ou do trigo presentes no meio com o ensaio enzimático. O macerado resultante da extração enzimática possuía micélio fúngico e resíduo agroindustrial, impedindo a leitura fidedigna da atividade enzimática presente no meio. A quantificação da atividade enzimática no meio de cultivo, filtrado e sem resíduo agrícola não solucionava esta inferência, uma vez que se sabe que a L-asparaginase permanece no espaço periplasmático.

Desta forma, com o objetivo de eliminar estes interferentes, optou-se por utilizar os resíduos em cultivo submerso visando a diminuição dessas interações e o aumento da atividade de L-asparaginase.

5.5. Avaliação da produção de L-asparaginase em cultivo submerso utilizando farelo de trigo.

Foram realizadas 64 corridas para determinar a atividade máxima de L-asparaginase nas condições propostas. Primeiramente, a matriz apresentada na Tabela 12 para o planejamento em Plackett–Burman estabeleceu 15 corridas para a avaliação de 11 variáveis independentes. A corrida 1 apresentou maior

resposta (1,27 UI/mL) ao modelo proposto. Pode-se observar que a menor resposta, corrida 12 (0,06 UI/mL) ocorreu quando todos os fatores analisados apresentavam menor nível. (Tabela 12).

Tabela 12: Matriz do planejamento experimental Plackett–Burman com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase em cultivo submerso. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.

Corrida	X ₁ (% p/v)	X ₂ (% p/v)	X ₃ (% p/v)	X ₄ (% p/v)	X ₅ (% p/v)	X ₆ (% p/v)	X ₇ (% p/v)	X ₈ (% p/v)	X ₉ (% p/v)	X ₁₀ (% p/v)	X ₁₁ (% p/v)	Atividade L- asparaginase (UI/mL)
1	1,4	3,0	1,0	5,0	2,5	35	48	5,0	0,5	1,2	0,2	1,27
2	0,4	3,0	5,0	1,0	2,5	35	96	5,0	0,5	0,2	1,2	0,15
3	1,4	0,5	5,0	5,0	0,5	35	96	9,0	0,5	0,2	0,2	0,33
4	0,4	3,0	1,0	5,0	2,5	25	96	9,0	1,5	0,2	0,2	0,49
5	0,4	0,5	5,0	1,0	2,5	35	48	9,0	1,5	1,2	0,2	0,00
6	0,4	0,5	1,0	5,0	0,5	35	96	5,0	1,5	1,2	1,2	0,14
7	1,4	0,5	1,0	1,0	2,5	25	96	9,0	0,5	1,2	1,2	0,59
8	1,4	3,0	1,0	1,0	0,5	35	48	9,0	1,5	0,2	1,2	0,81
9	1,4	3,0	5,0	1,0	0,5	25	96	5,0	1,5	1,2	0,2	0,43
10	0,4	3,0	5,0	5,0	0,5	25	48	9,0	0,5	1,2	1,2	0,41
11	1,4	0,5	5,0	5,0	2,5	25	48	5,0	1,5	0,2	1,2	0,09
12	0,4	0,5	1,0	1,0	0,5	25	48	5,0	0,5	0,2	0,2	0,06
13	0,9	1,75	3,0	3,0	1,5	30	72	7,0	1,0	0,7	0,7	0,29
14	0,9	1,75	3,0	3,0	1,5	30	72	7,0	1,0	0,7	0,7	0,36
15	0,9	1,75	3,0	3,0	1,5	30	72	7,0	1,0	0,7	0,7	0,37

X₁: L-asparagina (%); X₂: L-Prolina (%); X₃: Resíduo agroindustrial (%); X₄: Caldo Batata Dextrose (%); X₅: Sulfato de Amônia (%); X₆: Temperatura (°C); X₇: Tempo (h); X₈: pH; X₉: Extrato de levedura (%); X₁₀: Sacarose (%); X₁₁: Glicose (%);

A falta de ajuste do modelo foi considerada não significativa ($p > 0,05$) o que indica que o modelo pode ser utilizado para prever o efeito de cada variável na resposta (Rodrigues e lemma, 2005). As variáveis L-asparagina (X₁), L-prolina (X₂), caldo batata dextrose (X₄) e sacarose (X₁₀) apresentaram valor de $p < 0,05$ e efeito positivo (Tabela 13), então foram selecionadas para a continuação do processo de otimização. As variáveis que não expressaram significância ($p > 0,05$) foram excluídas do planejamento experimental. Quanto as variáveis significativas com efeito negativo, o resíduo e o extrato de levedura, essas foram mantidas no nível mínimo até o final do planejamento. O efeito apresentado pela ANOVA no primeiro planejamento representa a tendência de cada variável em

influenciar na resposta. Quando o efeito é positivo conclui-se que no aumento dos valores de determinada variável, até certo nível pode haver uma melhora positiva na resposta. Quando o resultado do efeito é negativo, entende-se que o decréscimo dos valores de cada variável analisada pode aumentar a resposta esperada.

Estudos analisando a otimização da produção de L-asparaginase utilizando PBD já definiram a L-asparagina como fator significativo com influência positiva. O que corrobora com resultados presentes neste trabalho (Baskar e Renganathan, 2009; Heba *et al.*, 2014; Farag *et al.*, 2015).

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) e efeito para PBD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo em estado submerso.

Fonte	SQ	GL	MQ	F-value	p-value	Efeito
Modelo	1,47	11	0,13	31,87	0,0079	-
X₁: L-asparagina	0,43	1	0,43	101,90	0,0021	0,38
X₂: L-prolina	0,47	1	0,47	110,90	0,0018	0,39
X₃: Resíduo	0,31	1	0,31	74,08	0,0033	- 0,32
X₄: Caldo Batata Dextrose	0,40	1	0,40	9,52	0,0539	0,04
X₅: Sulfato de Amonia	0,013	1	0,013	3,09	0,1768	0,066
X₆: Temperatura	0,032	1	0,032	7,65	0,0698	0,10
X₇: Tempo	0,021	1	0,021	5,06	0,1101	- 0,084
X₈: pH	0,020	1	0,020	4,74	0,1176	0,081
X₉: Extrato de Levedura	0,060	1	0,060	14,36	0,0322	- 0,14
X₁₀: Sacarose	0,069	1	0,069	16,31	0,0273	0,15
X₁₁: Glicose	0,012	1	0,012	2,94	0,1850	- 0,064
Falta de Ajuste	8,809*10 ⁻³	1	8,809*10 ⁻³	4,64	0,1642	-
Erro puro	3,800*10 ⁻³	2	1,900*10 ⁻³	-		

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; MQ= meia do quadrado; R²= 0,9915.* Nível de significância de 95%.

$$\text{Atividade Asparaginase} = - 0.36782 + 0.37783 * X_1 + 0.15767 * X_2 - 0.080542 * X_3 + 0.028875 * X_4 + 0.032917 * X_5 + 0.010350 * X_6 - 1.75347E-003 * X_7 + 0.020375 * X_8 - 0.14183 * X_9 + 0.15117 * X_{10} - 0.064167 * X_{11}$$

Analisando o gráfico de superfície de resposta (Figura 7) pode-se observar a tendência em se obter uma região ótima em relação à resposta de atividade de L-asparaginase. Portanto, um modelo de design do composto central foi proposto para a otimização da produção enzimática.

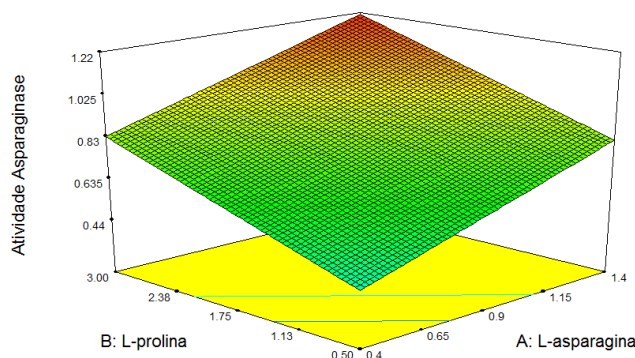


Figura 7: Gráfico de superfície resposta para atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo em função das variáveis X1 (L-asparagina) e X2 (L-prolina).

Outras 30 corridas (6 pontos centrais, 8 pontos axiais e 16 pontos fatorais) (Tabela 14) foram propostas utilizando planejamento de design do composto central. A atividade máxima experimental foi de 1,46 UI/mL. A relação C:N disponível no meio de cultura na corrida 3 foi de 4,82, uma relação considerada distante da relação C:N apresentada para a enzima L-asparaginase de 3 (Swain *et al.*, 1993).

Tabela 14: Matriz do planejamento design do composto central com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.

Corrida	X ₁ (% p/v)	X ₂ (% p/v)	X ₄ (% p/v)	X ₁₀ (% p/v)	Relação C:N	Atividade L- asparaginase Experimental	Atividade L- asparaginase Prevista
1	0,4	0,5	1,0	0,2	5,41	0,65	0,72
2	1,4	0,5	1,0	0,2	3,81	1,33	1,34
3	0,4	3,0	1,0	0,2	4,82	1,46	1,18
4	1,4	3,0	1,0	0,2	3,99	1,42	1,56
5	0,4	0,5	5,0	0,2	6,93	0,48	0,41
6	1,4	0,5	5,0	0,2	5,24	0,77	0,77
7	0,4	3,0	5,0	0,2	5,85	0,47	0,57
8	1,4	3,0	5,0	0,2	4,94	0,42	0,68
9	0,4	0,5	1,0	1,2	7,74	0,50	0,28
10	1,4	0,5	1,0	1,2	5,11	0,81	0,85

Tabela 14: Matriz do planejamento design do composto central com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo (Continuação).

Corrida	X ₁ (% p/v)	X ₂ (% p/v)	X ₄ (% p/v)	X ₁₀ (% p/v)	Relação C:N	Atividade L- asparaginase Experimental	Atividade L- asparaginase Prevista
11	0,4	3,0	1,0	1,2	5,92	0,82	0,96
12	1,4	3,0	1,0	1,2	4,79	1,18	1,29
13	0,4	0,5	5,0	1,2	6,99	0,32	0,33
14	1,4	0,5	5,0	1,2	6,21	0,33	0,64
15	0,4	3,0	5,0	1,2	5,88	0,67	0,70
16	1,4	3,0	5,0	1,2	5,59	0,69	0,77
17	0,0	1,75	3,0	0,7	7,02	0,09	-
18	1,9	1,75	3,0	0,7	4,44	1,36	-
19	0,9	0,0	3,0	0,7	5,95	0,27	-
20	0,9	4,25	3,0	0,7	5,02	1,08	-
21	0,9	1,75	0,0	0,7	4,36	1,27	-
22	0,9	1,75	7,0	0,7	6,24	0,81	-
23	0,9	1,75	3,0	0,0	4,91	1,35	-
24	0,9	1,75	3,0	1,7	6,07	1,13	-
25	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	0,48	0,69
26	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	1,01	0,69
27	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	0,84	0,69
28	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	0,65	0,69
29	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	0,74	0,69
30	0,9	1,75	3,0	0,7	6,06	0,45	0,69

X₁: L-asparagina (%); X₂: L-Prolina (%); X₄: Caldo Batata Dextrose (%); X₁₀: Sacarose (%).

A ANOVA (Tabela 15) identificou 3 variáveis significativas ($p < 0,05$), L-asparagina (X₁), L-prolina (X₂) e caldo Batata dextrose (X₄). A sacarose (X₁₀) não obteve significância na resposta ($p > 0,05$). Não foi observado relação entre as variáveis, confirmando assim, a hipótese de que nesses valores observados essas variáveis possuem efeito independente na atividade de L-asparaginase. É importante ressaltar que a análise estatística indica que variações quadráticas da concentração de sacarose podem ser significativas.

Tabela 15: Análise de variância (ANOVA) para o CCD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo. Incluindo as variáveis independentes.

Fonte	SQ	GL	MQ	F-value	p-value
Modelo	3,34	14	0,24	3,75	0,0079
X₁: L-asparagina	0,71	1	0,71	11,10	0,0046
X₂: L-prolina	0,53	1	0,53	8,29	0,0115
X₄: Caldo Batata Dextrose	1,02	1	1,02	15,95	0,0012
X₁₀: Sacarose	0,19	1	0,19	2,94	0,1071
X₁X₂	0,063	1	0,063	0,98	0,3377
X₁X₄	0,068	1	0,068	1,06	0,3194
X₁X₁₀	2,025*10 ⁻³	1	2,025*10 ⁻³	0,032	0,8609
X₂X₄	0,096	1	0,096	1,51	0,2384
X₂X₁₀	0,046	1	0,046	0,73	0,4078
X₄X₁₀	0,13	1	0,13	1,98	0,1800
X₁²	8,400*10 ⁻³	1	8,400*10 ⁻³	0,13	0,7216
X₂²	0,025	1	0,025	0,39	0,5430
X₄²	0,10	1	0,10	1,61	0,2232
X₁₀²	0,34	1	0,34	5,33	0,0357
Falta de Ajuste	0,96	15	0,064	1,57	0,3221
Erro puro	0,73	10	0,073		

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; MQ= meia do quadrado; R² = 0,77. Nível de significância de 95%.

$$\text{Atividade Asparaginase} = + 0,70 + 0,17 * X_1 + 0,15 * X_2 - 0,21 * X_4 - 0,088 * X_{10} - 0,063 * X_1 * X_2 - 0,065 * X_1 * X_4 - 0,011 * X_1 * X_{10} - 0,077 * X_2 * X_4 + 0,054 * X_2 * X_{10} + 0,089 * X_4 * X_{10} - 0,017 * X_1^2 - 0,030 * X_2^2 + 0,061 * X_4^2 + 0,11 * X_{10}^2$$

A falta de ajuste no modelo novamente não apresentou significância. Porém, o R² = 0,77 está abaixo do preconizado de 0,85. Nesse momento, visando o melhoramento da produção, foi proposto um planejamento fatorial 2⁴ com base nos valores obtidos.

Foram realizadas 19 corridas com planejamento fatorial 2⁴ (16 pontos fatoriais, 3 pontos centrais). Obteve a melhor resposta no ponto central do planejamento (corrida 17, 2,33 UI/mL) onde observou-se que a relação C:N era próxima da relação proposta para esta enzima pela literatura. A atividade de L-asparaginase encontrada no planejamento fatorial foi de aproximadamente 1,6 vezes maior quando comparada com a maior atividade encontrada no design do composto central (Tabela 16).

Tabela 16: Matriz do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central para produção de L-asparaginase. Resultados da atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo.

Corrida	X ₁ (% p/v)	X ₂ (% p/v)	X ₄ (% p/v)	X ₁₀ (% p/v)	Relação C:N	Atividade L- asparaginase Experimental	Atividade L- asparaginase Prevista
1	1,4	3,0	0,5	0,0	3,73	0,06	0,20
2	4,2	3,0	0,5	0,0	2,85	0,70	0,72
3	1,4	5,0	0,5	0,0	3,86	0,91	0,80
4	4,2	5,0	0,5	0,0	3,08	1,05	0,98
5	1,4	3,0	1,0	0,0	3,88	0,75	0,77
6	4,2	3,0	1,0	0,0	2,18	1,48	1,28
7	1,4	5,0	1,0	0,0	3,87	1,18	1,11
8	4,2	5,0	1,0	0,0	3,22	1,04	1,27
9	1,4	3,0	0,5	0,2	3,82	0,91	0,89
10	4,2	3,0	0,5	0,2	2,91	1,87	1,72
11	1,4	5,0	0,5	0,2	3,94	1,36	1,33
12	4,2	5,0	0,5	0,2	3,13	1,64	1,83
13	1,4	3,0	1,0	0,2	3,99	1,17	1,02
14	4,2	3,0	1,0	0,2	3,01	1,52	1,84
15	1,4	5,0	1,0	0,2	3,93	1,01	1,20
16	4,2	5,0	1,0	0,2	3,27	2,05	1,68
17	2,8	4,0	0,75	0,1	3,37	2,33	2,07
18	2,8	4,0	0,75	0,1	3,37	2,05	2,07
19	2,8	4,0	0,75	0,1	3,37	1,83	2,07

X₁: L-asparagina (%); X₂: L-Prolina (%); X₄: Caldo Batata Dextrose (%); X₁₀: Sacarose (%).

A análise de variância (Tabela 17) revelou significância para L-asparagina e sacarose. Entretanto, pode-se observar a ausência de significância para as variáveis L-prolina e caldo batata dextrose. O valor do coeficiente de correlação ($R^2 = 0,9915$) indica grande possibilidades de os valores apresentados corresponderem ao predito pelo modelo.

Tabela 17: Análise de variância (ANOVA) para o segundo CCD da produção de L-asparaginase em farelo de trigo. Incluindo as variáveis independentes.

Fonte	SQ	GL	MQ	F-value	p-value
Modelo	25,2	11	2,29	5,20	0,0191
X₁: L-asparagina	3,19	1	3,19	7,23	0,0312
X₂: L-prolina	1,42	1	1,42	3,22	0,1160
X₄: Caldo Batata Dextrose	1,34	1	1,34	3,03	0,1253
X₁₀: Sacarose	6,38	1	6,38	14,5	0,0067
X₁X₂	0,18	1	0,18	0,40	0,5464
X₁X₄	0,07	1	0,07	0,15	0,7136
X₁X₁₀	0,84	1	0,84	1,89	0,2113
X₂X₄	0,63	1	0,63	1,57	0,2509
X₂X₁₀	0,33	1	0,33	0,74	0,4182
X₄X₁₀	1,41	1	1,41	3,19	0,1173
X₁²	9,40	1	9,40	21,3	0,0024
X₂²		0			
X₄²		0			
X₁₀²		0			
Falta de Ajuste	2,57	5			0,3707
Erro puro	0,52	2			

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; MQ= meia do quadrado; R²= 0,9915. Nível de significância de 95%.

$$\text{Atividade Asparaginase} = - 0.36782 + 0.37783 \cdot X_1 + 0.15767 \cdot X_2 - 0.080542 \cdot X_3 + 0.028875 \cdot X_4 + 0.032917 \cdot X_5 + 0.010350 \cdot X_6 - 1.75347E-003 \cdot X_7 + 0.020375 \cdot X_8 - 0.14183 \cdot X_9 + 0.15117 \cdot X_{10} - 0.064167 \cdot X_{11}$$

O gráfico de superfície de resposta (Figura 8) em função das variáveis significativas, L-asparagina e sacarose, apresenta uma região ótima para a atividade de L-asparaginase.

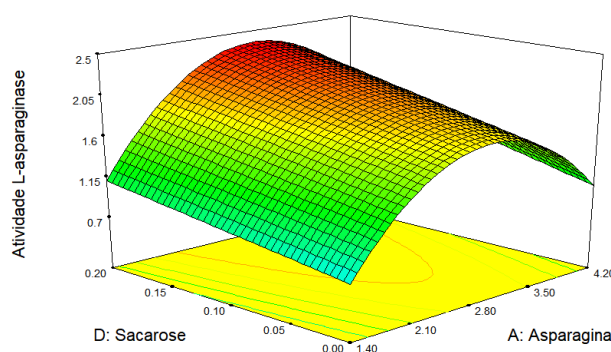


Figura 8: Gráfico de superfície resposta para atividade de L-asparaginase utilizando farelo de trigo como resíduo em função das variáveis X1 (L-asparagina) e X10 (Sacarose).

Baskar e Renganathan (2012) determinaram uma atividade de 40,86 UI/mL com uma cepa de *Aspergillus terreus* através de um delineamento do composto central onde identificou-se a relação positiva da concentração de L-asparagina e L-prolina, esses resultados se assemelham com os que foram apresentados neste trabalho.

Outra espécie do gênero *Aspergillus* também foi estudada por Dias e Sato (2016). O estudo apresentou um prévio desing Plackett-Burman para seleção de variáveis significativas com a variação de temperatura, agitação, concentração de inóculo, pH inicial, concentração de L-prolina, concentração de L-asparagina, concentração de glicose e concentração de extrato de levedura e concentração de aveia. No entanto, somente a temperatura, concentração de inóculo, e o pH do meio de cultivo apresentaram significância e efeito positivo para o modelo proposto. O autor então propôs um design do composto central com a variação do pH e da concentração de inóculo. Não houve a inclusão da temperatura no segundo planejamento. Apesar do efeito positivo a temperatura foi mantida em 30°C, ao contrário deste trabalho que apresentou um cultivo a 35°C. Apesar de ser uma temperatura incomum para o cultivo de micro-organismos, outros estudos já apresentaram a produção de L-asparaginase através de fungos a partir de 30°C (Gurunathan e Sahadevan, 2012; Huang *et al.*, 2014; Farag *et al.*, 2015; Shafei *et al.*, 2015)

A análise de variância inicial para o PBD (tabela 13) apontou significância para o resíduo ($p = 0,0033$), no entanto o efeito apresentado para essa variável foi negativo (-0,32) indicando que, em menores concentrações de resíduos tende-se a haver um aumento na atividade de L-asparaginase. Considerando que ainda há resíduo presente em todas as etapas de produção, entende-se que assim como apresentado para o cultivo em meio sólido, o resíduo ainda apresenta interferência negativa na produção de L-asparaginase.

Entretanto, observando todas as etapas da otimização observa-se que a utilização de farelo de trigo pode ser uma alternativa viável para a produção de L-asparaginase. O planejamento apresentado contou com a utilização de 7 reagentes, 1 resíduo agroindustrial e 3 fatores externos facilmente controlados, o uso desse tipo de metodologia pode reduzir os custos de produção desta enzima.

5.6. Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

5.6.1. Curva de coexistência

Foi construída uma curva de coexistência variando as concentrações de Triton X-114 e a temperatura do sistema (Figura 9). Foi avaliado a interferência do extrato bruto quanto a diminuição ou o aumento da temperatura para a partição do sistema. A interferência foi determinada a partir da adição de diferentes concentrações de extrato bruto à sistemas contendo 4 e 8% de Triton X-114. A presente tem semelhança com a curva Triton X-114/tampão apresentada por Lopes (2010).

:

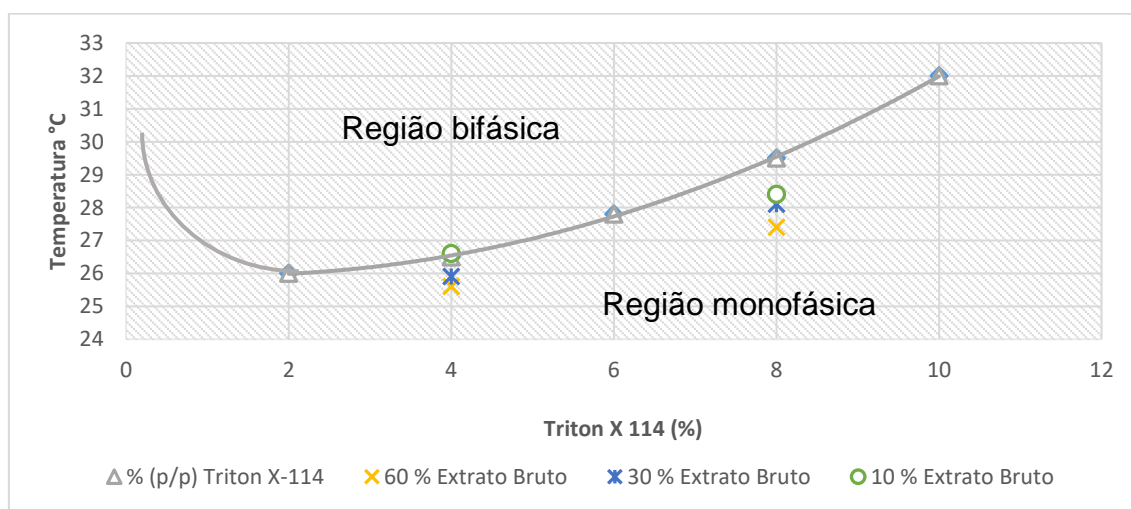


Figura 9: Curva de coexistência obtida experimentalmente para o SMDFA Triton X-114/ Tampão Tris/HCl 0,05M pH 8,6.

Pode-se observar que com o aumento da concentração do extrato bruto existe uma tendência na diminuição da temperatura que irá provocar a partição do sistema. Todos os sistemas realizados na otimização da partição líquido-líquido estavam acima da curva proposta e, portanto, atingiram a estabilidade em duas fases. Para o planejamento experimental determinou-se as temperaturas de 28°C a 32°C.

5.6.2 Aplicação do sistema micelar de duas fases aquosas na purificação de L-asparaginase

O coeficiente de partição (K) da L-asparaginase foi considerado como a variável dependente (resposta) do planejamento experimental. Os valores obtidos no desenho experimental para o coeficiente de partição de enzima (K), o coeficiente de partição de proteínas totais (K_p), o balanço de massa (BM), razão volumétrica (R), rendimento (η), fator de purificação (Pf) e seletividade (S) estão mostrados na Tabela 18.

A razão volumétrica é inversamente proporcional à concentração de Triton X-114. Para o modelo observado obteve-se uma otimização no coeficiente de partição no ponto central do planejamento ($K= 0,05$). No entanto, ainda observa-se valores de K próximos ao ponto central para sistemas com 6 % de triton X-114 (Sistemas: 7 e 8). Esses valores são dependentes da concentração de extrato bruto presente no sistema.

O coeficiente de partição de todos sistemas foi menor que 1 o que indica a migração preferencial da ASNase para a fase pobre em micelas, ou seja, fase superior do sistema. No entanto, o coeficiente de partição de proteínas totais (K_p) também foi menor que um para a maioria dos sistemas indicando que a maiorias das proteínas presente na amostra possuem maior afinidade pela fase pobre em micelas.

O sistema 8 apresentou um fator de purificação (Pf) de 1,4, além de um coeficiente de partição baixo (K), demonstrando que a L-asparaginase migrou preferencialmente para a fase pobre em micelas. O valor de rendimento para esse sistema indica que não houve perda enzimática. Entretanto, o coeficiente de partição de proteínas totais ($K_p = 0,4$) estabelece uma maior preferência de todas as proteínas presentes na amostra migrarem para a fase hidrofílica do sistema.

Tabela 18: Resultados obtidos para o Design de composto central para a extração líquido-líquido com variação dos parâmetros como temperatura, concentração de triton X-114 e concentração de extrato bruto de L-asparaginase.

Sistemas	Valores reais			Valores codificados			K	BM	RV	η	Kp	Pf	S
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃							
1	29	2	20	-1	-1	-1	0,31	78,9	2,2	60	0,9	0,2	0,3
2	31	2	20	1	-1	-1	0,33	75,4	1,5	57	0,9	0,3	0,3
3	29	6	20	-1	1	-1	0,21	0,4	0,8	38	1,0	0,6	0,2
4	31	6	20	1	1	-1	0,32	56,8	0,8	43	2,6	1,0	0,1
5	29	2	60	-1	-1	1	0,37	88,2	1,2	64	1,0	0,7	0,4
6	31	2	60	1	-1	1	0,21	104	3,8	85	1,1	0,7	0,2
7	29	6	60	-1	1	1	0,09	70,2	0,7	64	0,8	0,8	0,1
8	31	6	60	1	1	1	0,07	146,5	1	100	0,4	1,4	0,2
9	28	4	40	-1,68	0	0	0,57	2,9	1,1	2	0,4	0	1,3
10	32	4	40	1,68	0	0	0,60	1,2	1,1	1	0,1	0	3,7
11	30	7,4	40	0	1,68	0	0,19	1,7	0,7	1	0,5	0	0,4
12	30	4	6,3	0	0	-1,68	0	-	1	0	0,7	-	0
13	30	4	73,6	0	0	1,68	0,09	52,7	1,2	48	0,5	0,7	0,2
14	30	4	40	0	0	0	0,06	10	1,1	10	0,9	0,1	0,1
15	30	4	40	0	0	0	0,05	10,4	1,1	10	0,9	0,1	0,1
16	30	4	40	0	0	0	0,05	9,6	1,6	9	0,9	0	0,1

X₁: Temperatura (°C); X₂: Triton X-114 (% p/p); X₃: Extrato bruto (% p/p);

K: coeficiente de partição da enzima; BM: balanço de massa; RV: razão volumétrica; η : rendimento; Kp: coeficiente de partição de proteínas totais; Pf: fator de purificação; S: Seletividade. *Pontos axiais.

A ANOVA para a resposta (coeficiente de partição da enzima, K) revelou significância para o modelo em nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). A tabela abaixo apresenta os valores de p calculados para cada variável, além dos valores estabelecidos para a interação entre as variáveis e interações quadráticas (Tabela 19).

Tabela 19: Análise de variância (ANOVA) para Design do composto central do coeficiente de partição da enzima (K).

Fonte	SQ	GL	MQ	F- Value	p-value
Modelo	0,46	9	0,051	8,29	0,0091
X₁: Temperatura	1,01*10 ⁻⁴	1	1,01*10 ⁻⁴	0,016	0,9021
X₂: Triton	0,023	1	0,023	3,79	0,0994
X₃: Extrato Bruto	5,55*10 ⁻³	1	5,55*10 ⁻³	0,90	0,3795
X₁ X₂	5,51*10 ⁻³	1	5,51*10 ⁻³	0,89	0,3812
X₁ X₃	0,012	1	0,012	1,95	0,2125
X₂ X₃	0,011	1	0,011	1,70	0,2398
X₁²	0,32	1	0,32	51,57	0,0004
X₂²	0,017	1	0,017	2,74	0,1492
X₃²	3,97*10 ⁻³	1	3,97*10 ⁻³	0,64	0,4531
Falta de Ajuste	0,037	4	9,26*10 ⁻³	3968,75	0,0003
Erro puro	4,66*10 ⁻⁶	2	2,33*10 ⁻³		

SQ= soma dos quadrados; GL= grau de liberdade; MQ= meia do quadrado; R² = 0,98; R² ajustado = 0,95. Nível de significância de 95%.

$$K = 18.09 + 0.24*X_1 + 2.08*X_2 + 2.70*X_3 - 3.750*10^{-3}*X_1*X_2 + 0.91*X_1*X_3 + 1.97*X_2*X_3 - 5.54*X_1^2 - 3.09*X_2^2 - 4.16*X_3^2$$

Nenhuma variável avaliada demonstrou significância para o modelo proposto. Do mesmo modo a ANOVA não verificou efeito significativo na interação entre as variáveis. No entanto, a avaliação quadrática da temperatura foi significativa ($p = 0,0004$) o que implica que o modelo deve ser reajustado para variações maiores do fator temperatura.

A falta de ajuste no modelo foi significativa, o que é representado pela Figura 10. Quando a falta de ajuste é significativa não é possível afirmar que o modelo descreve bem os dados. No entanto, a variação aleatória em torno da reta é pequena visto que a média dos quadrados do erro puro é de $4,66*10^{-6}$. Sabendo que a soma dos quadrados total é igual a soma dos quadrados do modelo mais a soma dos quadrados dos resíduos, isto é, falta de ajuste e erro puro. Pode-se afirmar que o erro está na falta de ajuste do modelo, por isso não

pode-se rejeitar a hipótese de que os dados não se ajustam ao modelo. (Rodrigues e Lemma, 2014)

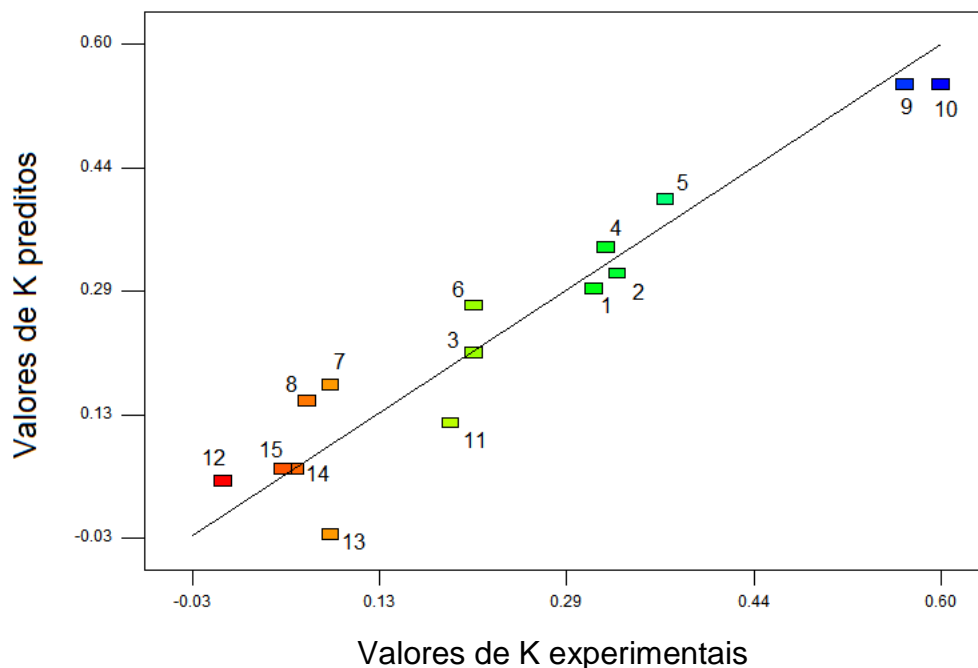


Figura 10: Gráfico de Tendência. Resultados dos valores experimentais (eixo x) x valores preditos pelo modelo (eixo y), para cada corrida numerada.

Onde, os números indicados são os sistemas propostos pelo planejamento do Composto Central.

O gráfico de superfície de resposta (Figura 11) para o coeficiente de partição em função da concentração de extrato bruto e triton X-114 mostra a melhor região com resposta para o modelo proposto.

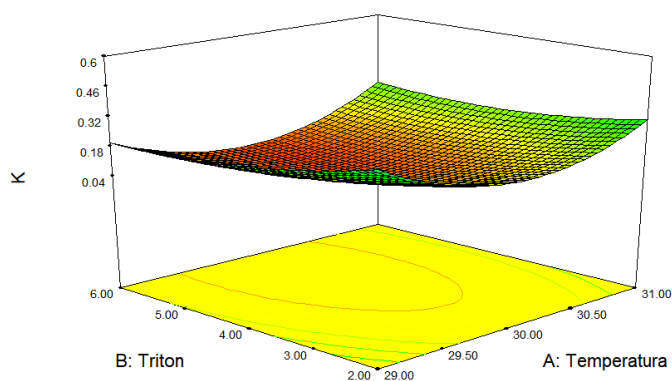


Figura 11: Gráfico de superfície de resposta em função das variáveis Triton X-114 e Temperatura para a resposta K.

Não há relatos na literatura de sistemas micelares de duas fases aquosas para a partição líquido-líquido de L-asparaginase. Porém, este sistema vem sendo aplicado para purificação da enzima já há alguns anos, conforme mostra revisão do estado da arte (Rangel-Yagui *et al.*, 2004; Mazzola *et al.*, 2008).

Duarte e colaboradores (2015) verificaram que a utilização de um SMDFA foi mais eficiente de que um SDFA quanto a purificação de uma lipase produzida por *L. scottii* L117. Nesse estudo, observou-se um rendimento de 93.85% e um coeficiente de partição de 7,76 indicando que a enzima se encontrava majoritariamente na porção rica em micelas do sistema, isto porque lipases possuem muitos resíduos hidrofóbicos em sua estrutura. Esses resultados foram obtidos a 25°C com cerca de 10% de Triton X-114. Duarte e colaboradores (2015) em um planejamento experimental, variaram a temperatura dos experimentos de 23 a 33 °C, isto por que, a curva de coexistência utilizada com tampão McIlvaine possui uma temperatura da linha de amarração menor do que foi a utilizada no presente trabalho. Esse estudo corrobora a avaliação de que poderiam ser utilizadas maiores variações de temperatura (Duarte *et al.*, 2015).

Jaramillo e colaboradores aplicaram um SMDFA Triton X-114/Tampão fosfato de sódio para a purificação de uma pectinase produzida por *Aspergillus oryzae*. Neste trabalho, foi produzido um planejamento fatorial 2³ que demonstrou um sistema com rendimento de 375% a 30°C, 6% Triton X-114 e 15% de extrato bruto. Os autores ainda definem que os coeficientes de partição foram todos menores que 1, o que indica que a pectinase migrou preferencialmente para a fase pobre em micelas do sistema. O SMDFA foi capaz de extrair pigmentos para a fase rica em micelas e a biomolécula alvo para a fase oposta. A temperatura utilizada e a concentração de tensoativo se assemelham a utilizada para a purificação de L-asparaginase no sistema 8 (Tabela 18), no qual obteve-se o melhor rendimento (Jaramillo *et al.*, 2013).

Considerando estes resultados e o baixo custo do processo de purificação utilizando SMDFA, entendemos ser relevante para a ciência o estudo da purificação da enzima L-asparaginase através de técnicas não cromatográficas como parte do processo.

6. Conclusão

O presente trabalho apresentou a otimização da produção de L-asparaginase em cultivo submerso utilizando farelo de trigo como resíduo. A atividade máxima encontrada foi realizada em um meio composto de 0,15% K_2HPO_4 ; 0,052% KCl; 0,052% $MgSO_4$; 0,001% $FeSO_4$; 0,001% $ZnSO_4$; 0,001% $CuSO_4$, 0,5% Glicose; 0,2% Extrato de levedura, 0,5% de resíduo e 2,8% L-asparagina, 4,0% L-Prolina, 0,75% caldo batata dextrose, 0,1% sacarose (p/v). A melhor produção enzimática foi encontrada em 48 horas de cultivo a 35°C. Pode-se concluir que a utilização do farelo de trigo como resíduo é uma boa estratégia para a produção desta enzima e ainda precisa ser mais estudada. Outros estudos necessitam ser realizados afim de obter melhores atividades com a utilização de outros resíduos.

O SMDFA apresentou ótimo rendimento e fator de purificação razoável. Essa metodologia pode ser utilizada como um pré tratamento para a redução de contaminantes e eliminação de uma das etapas do processo de purificação. Novos sistemas precisam ser estudados com diferentes tensoativos e diferentes temperaturas de separação visando um aumento no fator de purificação da enzima.

A produção da enzima em estado sólido apresentou resultados inferiores aos relatados na literatura. A utilização de metodologias para a quantificação de amônia livre no meio reacional pode alterar os resultados. No entanto, entende-se que utilizando a metodologia para a quantificação de β -hidroxamato aspártico pode-se obter valores mais reais de atividade nesse tipo de cultivo. No presente trabalho, não foi possível a otimização da produção em estado sólido visto que os resíduos utilizados interferiram na metodologia proposta e não houve a possibilidade de retirar-los do contato com o micélio anteriormente.

Porém, entende-se que a utilização dos resíduos agroindustriais como o farelo de trigo na suplementação de meios de cultivo, e a utilização de metodologias alternativas para a purificação de biomoléculas, assim como o SMDFA e o SDFa, podem reduzir os custos de produção da L-asparaginase comercial.

7. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, R. C. *et al.* Production of antileukemic L-asparaginase by filamentous fungi isolated from Brazilian Savanna. **Febs Journal**, v. 282, p. 272-272, Jul 2015. ISSN 1742-464X.

ALMEIDA, R. P. C. D. Avaliação da produção de l-asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado. 2015.

ANDERSON, N.; LOKICH, J. J.; TULLIS, J. L. L-asparaginase effect on antithrombin-III levels. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 7, n. 4, p. 335-340, 1979. ISSN 1096-911X.

ANVISA. **RDC 55/10: resolução número 55 de 16 de dezembro de 2010.** Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2011.

ANVISA. **Relatório 2016 - Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos** 2017.

APPEL, I. M.; HOP, W. C.; PIETERS, R. Changes in hypercoagulability by asparaginase: a randomized study between two asparaginases. **Blood coagulation & fibrinolysis**, v. 17, n. 2, p. 139-146, 2006. ISSN 0957-5235.

ARBER, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, p. blood-2016-03-643544, 2016. ISSN 0006-4971.

ASENJO, J. A. **Separation processes in biotechnology.** CRC Press, 1990. ISBN 0824782704.

THALE, U. H. *et al.* Thromboembolism in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on Dana-Farber Cancer Institute protocols: effect of age and risk stratification of disease. **British journal of haematology**, v. 129, n. 6, p. 803-810, 2005. ISSN 1365-2141.

BADOEI-DALFARD, A. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: Production optimization by statistical methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 388-397, 2015. ISSN 1878-8181.

BARBOSA, P. D. P. M. *et al.* Fungi from Brazilian Savannah and Atlantic rainforest show high antibacterial and antifungal activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 1-8, 2017. ISSN 1878-8181.

BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Statistical screening of process variables for the production of L-asparaginase from cornflour by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 in submerged fermentation. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 45-48, 2009. ISSN 0974-5645.

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

BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol**, Nov 7 2015. ISSN 1559-0291 (Electronic) 0273-2289 (Linking).

BECKER, J.; THOMAS, O.; FRANZREB, M. Protein separation with magnetic adsorbents in micellar aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 46-53, 2009. ISSN 1383-5866.

BEINART, G.; DAMON, L. Thrombosis associated with L-asparaginase therapy and low fibrinogen levels in adult acute lymphoblastic leukemia. **Am J Hematol**, v. 77, n. 4, p. 331-5, Dec 2004. ISSN 0361-8609 (Print) 0361-8609 (Linking).

BEINART, G.; DAMON, L. Thrombosis associated with l-asparaginase therapy and low fibrinogen levels in adult acute lymphoblastic leukemia. **American journal of hematology**, v. 77, n. 4, p. 331-335, 2004. ISSN 1096-8652.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environmental health perspectives**, p. 138-145, 2007. ISSN 0091-6765.

BODMER, M. *et al.* Fatal liver failure in an adult patient with acute lymphoblastic leukemia following treatment with L-asparaginase. **Digestion**, v. 74, n. 1, p. 28-32, 2006. ISSN 0012-2823.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604-1607, 1981. ISSN 0021-9258.

BOREK, D. *et al.* Crystal structure of active site mutant of antileukemic l-asparaginase reveals conserved zinc-binding site. **The FEBS journal**, v. 281, n. 18, p. 4097-4111, 2014. ISSN 1742-4658.

BORUTA, T.; BIZUKOJC, M. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 34, 2017. ISSN 0959-3993.

BOTELLA, C. *et al.* Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2, p. 100-106, 2005. ISSN 1369-703X.

BRASIL. AliceWeb2: Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços 2018.

BROCK, T. *et al.* Biology of Microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. 1994.

BROOME, J. Evidence that the L-asparaginase activity of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**, v. 191, n. 4793, p. 1114-1115, 1961. ISSN 0028-0836.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012. ISBN 858055117X.

CANABARRO, N. I. *et al.* Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, v. 102, p. 9-14, 2017. ISSN 0960-1481.

CAPRARA, C. D. S. C. Processo de obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum*. 2016.

CARDOSO, B. B. *et al.* β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 2017. ISSN 0168-1605.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Localization of the two L-asparaginases in anaerobically grown *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 16, p. 3753-3755, 1967. ISSN 0021-9258.

CERDA, A. *et al.* Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1059-1068, 2017. ISSN 0960-8524.

CHUO, S. C. *et al.* A new method of extraction of amoxicillin using mixed reverse micelles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 460, p. 137-144, 2014. ISSN 0927-7757.

COURI, S. *et al.* Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 3, p. 255-261, 2000. ISSN 1359-5113.

DE CASTRO, R. J. S. *et al.* A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 678-684, 2015. ISSN 1878-8181.

DE SOUSA BRANDÃO, C. Z. G.; DE SOUZA, J. N. Biofármacos: da pesquisa ao mercado: uma revisão da literatura. **SAÚDE & CIÊNCIA EM AÇÃO**, v. 1, n. 1, p. 105-118, 2016. ISSN 2447-9330.

DIAS, F. F.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum l-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 2016. ISSN 1878-8181.

DIAS, F. F. G. *et al.* Simplex centroid mixture design to improve l-asparaginase production in solid-state fermentation using agroindustrial wastes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 528-534, 2015. ISSN 1878-8181.

DIAS, F. F. G. *et al.* Purification, characterization and antiproliferative activity of l-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940 with no glutaminase activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 9, p. 785-794, 2016. ISSN 2221-1691.

DIVATE, R. D. *et al.* Using wheat bran and soybean meal as solid state fermentation substances for the production of *Xylaria nigripes* with bioactivities. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 127-133, 2017. ISSN 1876-1070.

DRAINAS, C.; KINGHORN, J.; PATEMAN, J. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493-501, 1977. ISSN 1465-2080.

DUARTE, A. W. F. *et al.* Liquid-liquid extraction of lipase produced by psychrotrophic yeast *Leucosporidium scottii* L117 using aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 156, p. 215-225, 2015. ISSN 1383-5866.

EISELE, N. *et al.* The first characterized asparaginase from a basidiomycete, *Flammulina velutipes*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3316-3321, 2011. ISSN 0960-8524.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous fungal cultures—process characteristics, products, and applications. **Bioprocess Value Added Prod Renew Resour New Technol Appl**, v. 9, p. 225-261, 2007.

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S1081-S1085, 2012. ISSN 2221-1691.

ELBA, P. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Interciência, 2008. ISBN 8571931895.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. D. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Caxias do Sul: Educs**, v. 11, p. 146, 2004.

EVIDENTE, A. *et al.* Fungal metabolites with anticancer activity. **Natural product reports**, v. 31, n. 5, p. 617-627, 2014.

FADILAH, S.; FARIDAH, I.; CHEONG, S. Transient hyperthyroidism following L-asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Medical Journal of Malaysia**, v. 55, n. 4, p. 513-515, 2000. ISSN 0300-5283.

FARAG, A. M. *et al.* Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015. ISSN 1687-4285.

GIFONI, M. A.; FERNANDES, G. S.; CHAMMAS, R. Biosimilar Drugs: What Would Be a Reasonable Extrapolation? **Journal of Global Oncology**, p. JGO. 2016.008342, 2017. ISSN 2378-9506.

GUEDES DE ANDRADE, E. *et al.* Extraction of clavulanic acid using aqueous two-phase micellar system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 103-108, 2011. ISSN 1470-8744.

GUGLIOTTA, L. *et al.* Hypercoagulability during L-asparaginase treatment: the effect of antithrombin III supplementation in vivo. **British journal of haematology**, v. 74, n. 4, p. 465-470, 1990. ISSN 1365-2141.

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

HAGA, R. B. *et al.* Clavulanic acid partitioning in charged aqueous two-phase micellar systems. **Separation and purification technology**, v. 103, p. 273-278, 2013. ISSN 1383-5866.

HEBA, A. *et al.* Statistical Optimization of Anti-leukemic Enzyme L-Asparaginase Production by *Penicillium cyclopium*. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, p. 130, 2014.

HEIDEMANN, P.; STUBBE, P.; BECK, W. Transient secondary hypothyroidism and thyroxine binding globulin deficiency in leukemic children during polychemotherapy: an effect of L-asparaginase. **European Journal of Pediatrics**, v. 136, n. 3, p. 291-295, 1981. ISSN 0340-6199.

HERTZBERG, L. *et al.* Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. **Blood**, v. 115, n. 5, p. 1006-1017, 2010. ISSN 0006-4971.

HU, T. *et al.* Enhanced cellulase production by solid state fermentation with polyurethane foam as inert supports. **Procedia Engineering**, v. 18, p. 335-340, 2011. ISSN 1877-7058.

HUANG, L. *et al.* 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**, v. 80, n. 5, p. 1561-1569, 2014. ISSN 0099-2240.

HUANG, L. *et al.* Comparative Study of L-Asparaginase-Based LOP Regimen Over CHOP Regimen Before Radiotherapy for Stage IIE Extranodal Nasal Type NK/T Cell Lymphoma: A Study of 2 Centers. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 152-158, 3// 2017a. ISSN 2152-2650. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2152265016305304>>.

IAPO. **Guia rápido sobre Medicamentos biológicos e biossimilares** 2013.

IDRIS, A. S. O. *et al.* Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. **Bioresource Technology**, 2017. ISSN 0960-8524.

IMADA, A. *et al.* Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-99, 1973. ISSN 1465-2080.

INCA. Leucemia. 2016. Acesso em: 09/01/2016.

ISMAIEL, A. A. Production of the immunosuppressant cyclosporin A by a new soil isolate, *Aspergillus fumigatus*, in submerged culture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3305-3317, 2017. ISSN 0175-7598.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. Academic press, 2011. ISBN 0123919339.

JARAMILLO, P. M. D. *et al.* Liquid-liquid extraction of pectinase produced by *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, v. 120, p. 452-457, 2013. ISSN 1383-5866.

JOHNSTON, P. *et al.* Myelosuppressive effect of colaspase (L-asparaginase) in initial treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **British Medical Journal**, v. 3, n. 5923, p. 81-83, 1974. ISSN 1468-5833.

JOZALA, A. F. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, p. 51-63, 2016. ISSN 1517-8382.

KANAGAWA, A. L. N., M. A. **Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas**. Ciências Biológicas - Cadernos Cb Virtual 2,, 2011.

KAVANAGH, K. **Fungi: biology and applications**. John Wiley & Sons, 2017. ISBN 1119374324.

KEARNEY, S. L. *et al.* Clinical course and outcome in children with acute lymphoblastic leukemia and asparaginase-associated pancreatitis. **Pediatric blood & cancer**, v. 53, n. 2, p. 162-167, 2009. ISSN 1545-5017.

KEBRIAEI, P.; ANASTASI, J.; LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, n. 4, p. 597-621, 2002. ISSN 1521-6926.

KHUSHOO, A. *et al.* Extracellular expression and single step purification of recombinant *Escherichia coli* L-asparaginase II. **Protein expression and purification**, v. 38, n. 1, p. 29-36, 2004. ISSN 1046-5928.

KIRSCHKE, R. *et al.* Coagulation and fibrinolysis in children with acute lymphoblastic leukaemia treated according to the COALL-05-92-protocol. **Klinische Pädiatrie**, v. 210, n. 04, p. 285-290, 1998. ISSN 0300-8630.

KRASOTKINA, J. *et al.* One-step purification and kinetic properties of the recombinant l-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 215-221, 2004. ISSN 1470-8744.

KUMAR, N. M.; MANONMANI, H. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577-587, 2013. ISSN 0959-3993.

KUMAR, N. M.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. Production and optimization of L-asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial crops and products**, v. 43, p. 150-158, 2013. ISSN 0926-6690.

KUMAR, S.; VEERANKI, V. D.; PAKSHIRAJAN, K. Assessment of physical process conditions for enhanced production of novel glutaminase-free L-Asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 3, p. 327-337, 2011. ISSN 0273-2289.

LANG, S. Über desamidierung im Tierkörper. **Beitr chem Physiol Pathol**, v. 5, p. 321-345, 1904.

LIU, Y. *et al.* An affinity-based aqueous two-phase mixed micellar system and its purification of Yeast 3', 5'-bisphosphate nucleotidase. **Journal of Chromatography B**, 2017a. ISSN 1570-0232.

LOPES, A. *et al.* Influence of salts on the coexistence curve and protein partitioning in nonionic aqueous two-phase micellar systems. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 1057-1064, 2014. ISSN 0104-6632.

LOPES, A. M. **Remoção de endotoxina presente em meio fermentado contendo biomoléculas utilizando sistemas micelares de duas fases aquosas**. 2010. Universidade de São Paulo. Tese.

LOPES, A. M. *et al.* Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system. **Separation and purification technology**, v. 81, n. 3, p. 339-346, 2011. ISSN 1383-5866.

LU, Y.-H. *et al.* Phytotoxic, Antifungal and Immunosuppressive Metabolites from *Aspergillus terreus* QT122 Isolated from the Gut of Dragonfly. **Current microbiology**, v. 74, n. 1, p. 84-89, 2017. ISSN 0343-8651.

MALPIEDI, L. P. *et al.* Aqueous micellar systems containing Triton X-114 and *Pichia pastoris* fermentation supernatant: A novel alternative for single chain-antibody fragment purification. **Separation and Purification Technology**, v. 132, p. 295-301, 2014. ISSN 1383-5866.

MANNA, S. *et al.* Purification, characterization and antitumor activity of L-asparaginase isolated from *Pseudomonas stutzeri* MB-405. **Current Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 291-298, 1995. ISSN 0343-8651.

MARTARELLO, R. D. A. **Purificação de uma beta-galactosidase produzida por aspergillus foetidus através de técnicas cromatográficas.** 2016. Dissertação.

MAZZOLA, P. G. *et al.* Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 83, n. 2, p. 143-157, 2008. ISSN 1097-4660.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2017. ISSN 1878-8181.

MERLEN, C. *et al.* L-Asparaginase lowers plasma antithrombin and mannan-binding-lectin levels: Impact on thrombotic and infectious events in children with acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 62, n. 8, p. 1381-1387, 2015. ISSN 1545-5017.

MERRYMAN, R. *et al.* Asparaginase-associated myelosuppression and effects on dosing of other chemotherapeutic agents in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric blood & cancer**, v. 59, n. 5, p. 925-927, 2012. ISSN 1545-5017.

MISGAR, R. A. *et al.* L-asparaginase induced hypoglycemia in a case of acute lymphoblastic leukemia: a patient report. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 3-4, p. 439-441, 2015. ISSN 2191-0251.

MOGHRABI, A. *et al.* Results of the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium Protocol 95-01 for children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 896-904, 2007. ISSN 0006-4971.

MOUAFI, F. E.; IBRAHIM, G. S.; ELSOUD, M. M. A. Optimization of lovastatin production from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 253-259, 2016. ISSN 1687-157X.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent Advances in Enzyme Extraction Strategies: A Comprehensive Review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2017. ISSN 0141-8130.

NAKAHAMA, K. *et al.* Formation of L-asparaginase by *Fusarium* species. **Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 269-273, 1973. ISSN 1465-2080.

NIKAS, Y. *et al.* Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. **Macromolecules**, v. 25, n. 18, p. 4797-4806, 1992. ISSN 0024-9297.

NIU, D. *et al.* Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 37-43, 2017. ISSN 0717-3458.

NOVELLI, P. K.; BARROS, M. M.; FLEURI, L. F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. **Food chemistry**, v. 198, p. 119-124, 2016. ISSN 0308-8146.

OETTGEN, H. *et al.* Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**, v. 27, n. 12, p. 2619, 1967. ISSN 0008-5472.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655-674, 2009. ISSN 0889-8588.

PASSARGE, E. Bloom's syndrome: the German experience. *Annales de genetique*, 1991. p.179-197.

PAWAR, S. S.; REGUPATHI, I.; PRASANNA, B. Reverse micellar partitioning of Bovine Serum Albumin with novel system. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, n. 4, p. 491-494, 2017. ISSN 2405-6537.

PIETERS, R. *et al.* L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011. ISSN 1097-0142.

PRIEST, J. R. *et al.* The effect of L-asparaginase on antithrombin, plasminogen, and plasma coagulation during therapy for acute lymphoblastic leukemia. **The Journal of pediatrics**, v. 100, n. 6, p. 990-995, 1982. ISSN 0022-3476.

PRITSA, A. A.; KYRIAKIDIS, D. A. L-asparaginase of *Thermus thermophilus*: Purification, properties and identification of essential amino acids for its catalytic activity. **Molecular and cellular Biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 93-101, 2001. ISSN 0300-8177.

PUI, C.-H. *et al.* Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. **The Journal of pediatrics**, v. 99, n. 1, p. 46-50, 1981a. ISSN 0022-3476.

PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006. ISSN 0028-4793.

QIAO, W. *et al.* Enhancing taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. **Fungal Biology**, 2017. ISSN 1878-6146.

QUINTANILLA-FLORES, D. L. *et al.* Acute pancreatitis and diabetic ketoacidosis following l-asparaginase/prednisone therapy in acute lymphoblastic leukemia. **Case reports in oncological medicine**, v. 2014, 2014. ISSN 2090-6706.

RAHIM, M. H. A. *et al.* Growth and lovastatin production by *Aspergillus terreus* under different carbohydrates as carbon sources. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 379-385, 2017. ISSN 1878-8181.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998. ISSN 0717-3458.

RANGEL-YAGUI, C.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 4, p. 531-544, 2004. ISSN 0104-6632.

RANGEL-YAGUI, C. D. O. **Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à purificação de enzimas**. 2003. Universidade de São Paulo. Tese.

RISSEEUW-APPEL, I. M. *et al.* Minimal effects of *E. coli* and *Erwinia* asparaginase on the coagulation system in childhood acute lymphoblastic leukemia: a randomized study. **Med Pediatr Oncol**, v. 23, n. 4, p. 335-43, 1994. ISSN 0098-1532 (Print) 0098-1532 (Linking).

RISSEEUW-APPEL, I. M. *et al.* Minimal effects of *E. coli* and *Erwinia* asparaginase on the coagulation system in childhood acute lymphoblastic leukemia: a randomized study. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 23, n. 4, p. 335-343, 1994. ISSN 1096-911X.

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

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

RODRIGUES, P. D. O. *et al.* Xylanase and β -glucosidase production by *Aspergillus fumigatus* using commercial and lignocellulosic substrates submitted to chemical pre-treatments. **Industrial Crops and Products**, v. 95, p. 453-459, 2017. ISSN 0926-6690.

ROSSI, C. *et al.* Tensoativos: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universitária Rural, Série Ciências Exatas e da Terra, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 25, n. 1-2, p. 59-71, 2006.

RUNDLETT, K. L.; ARMSTRONG, D. W. Effect of micelles and mixed micelles on efficiency and selectivity of antibiotic-based capillary electrophoretic enantioseparations. **Analytical chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2088-2095, 1995. ISSN 0003-2700.

SABATH, D. E. Leukemia. In: HUGHES, S. M. (Ed.). **Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2013. p.226-227. ISBN 978-0-08-096156-9.

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

SAITOH, T.; HINZE, W. L. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of protein using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separations (cloud point extractions). **Analytical chemistry**, v. 63, n. 21, p. 2520-2525, 1991. ISSN 0003-2700.

SALIHI, A.; ASOODEH, A.; ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93. **International journal of biological macromolecules**, v. 94, p. 827-835, 2017. ISSN 0141-8130.

SANTOS, D. A. *et al.* Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 121, p. 66-78, 2017. ISSN 0964-8305.

SANTOS, V. C. *et al.* Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: a new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical engineering journal**, v. 56, n. 1, p. 75-83, 2011. ISSN 1369-703X.

SHAFEI, M. S. *et al.* Purification, Characterization and Kinetic Properties of *Penicillium cyclopium* L-Asparaginase: Impact of L-asparaginase on Acrylamide Content in Potato Products and its Cytotoxic Activity. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 9, n. 2, p. 132-140, 2015. ISSN 0973-8916.

SHARMA, K. M. *et al.* Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2017. ISSN 1687-157X.

SHIOMORI, K. *et al.* Extraction characteristic of bovine serum albumin using sodium bis (2-ethylhexyl) sulfosuccinate reverse micelles. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 86, n. 6, p. 581-587, 1998. ISSN 0922-338X.

SINDHU, R.; MANONMANI, H. Expression and characterization of recombinant L-asparaginase from *Pseudomonas fluorescens*. **Protein expression and purification**, v. 143, p. 83-91, 2018. ISSN 1046-5928.

SOTO, A.; ARCE, A.; KHOSHKBARCHI, M. K. Partitioning of antibiotics in a two-liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid. **Separation and Purification Technology**, v. 44, n. 3, p. 242-246, 2005. ISSN 1383-5866.

SOUZA, P. M. *et al.* Optimization and purification of L-asparaginase from fungi: A systematic review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 120, p. 194-202, 2017. ISSN 1040-8428.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Elsevier, 2013. ISBN 1483292916.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science-New York Then Washington-**, v. 260, p. 214-214, 1993. ISSN 0036-8075.

STILLER, C.; CHESSELLS, J.; FITCHETT, M. Neurofibromatosis and childhood leukaemia/lymphoma: a population-based UKCCSG study. **British Journal of Cancer**, v. 70, n. 5, p. 969-972, 1994. ISSN 0007-0920.

SUBHAN, M.; FARYAL, R.; MACREADIE, I. Production of statins by fungal fermentation. **Microbiology Australia**, v. 38, n. 2, p. 70-72, 2017. ISSN 2201-9189.

SUDHIR, A. P. *et al.* Characterization of a recombinant glutaminase-free L-asparaginase (ansa3) enzyme with high catalytic activity from *Bacillus licheniformis*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 7, p. 2504-2515, 2014. ISSN 0273-2289.

SVAHN, K. S. *et al.* *Penicillium nalgiovense* Laxa isolated from Antarctica is a new source of the antifungal metabolite amphotericin B. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1, 2015. ISSN 2054-3085.

SWAIN, A. L. *et al.* Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 4, p. 1474-1478, 1993. ISSN 0027-8424.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010. ISSN 0960-8524.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed Editora, 2009. ISBN 8536326980.

TUDZYNSKI, P. *et al.* Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 1, p. 133-141, 1999. ISSN 0026-8925.

VAN DER MEEREN, P. *et al.* Quantifying wetting and wicking phenomena in cotton terry as affected by fabric conditioner treatment. **Textile research journal**, v. 72, n. 5, p. 423-428, 2002. ISSN 0040-5175.

VAN DER SLUIS, I. *et al.* Efficacy and safety of recombinant *E. coli*-asparaginase in infants (less than one year of age) with acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, p. haematol. 2013.090563, 2013. ISSN 0390-6078.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. **Biomed J**, v. 37, n. 6, p. 345-56, Nov-Dec 2014. ISSN 2320-2890 (Electronic) 2319-4170 (Linking).

WATKINSON, S. C.; BODDY, L.; MONEY, N. **The fungi**. Academic Press, 2015. ISBN 0123820359.

YAHMED, N. B. *et al.* Enhancement of biogas production from *Ulva* sp. by using solid-state fermentation as biological pretreatment. **Algal Research**, v. 27, p. 206-214, 2017. ISSN 2211-9264.

YUN, M.-K. *et al.* Crystal Structure and Allosteric Regulation of the Cytoplasmic *Escherichia coli* L-Asparaginase I. **Journal of molecular biology**, v. 369, n. 3, p. 794-811, 2007. ISSN 0022-2836.

ZIEMONS, S. *et al.* Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. **BMC biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 16, 2017. ISSN 1472-6750.