

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**  
**Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas**

**Jorge Andrés Rueda Ardila**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTI-LEUCÊMICA L-  
ASPARAGINASE POR *Penicillium sp.***

**Diamantina - MG**  
**2017**

**Jorge Andrés Rueda Ardila**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA ENZIMA ANTI-LEUCÊMICA L-  
ASPARAGINASE POR *Penicillium sp.***

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha  
e Mucuri, como requisito parcial para obtenção  
do título de “Mestre”.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula de  
Figueiredo Conte Vanzela**

**Diamantina - MG  
2017**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

A676o      Ardila, Jorge Andrés Rueda  
              Otimização da produção da enzima anti-leucêmica L-asparaginase  
              por *Penicillium* sp. / Jorge Andrés Rueda Ardila. – Diamantina, 2017.  
              86 p. : il.

Orientador: Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
Mucuri.

1. Estatística multivariável. 2. Atividade enzimática. 3. Leucemia  
linfoblástica aguda. 4. Biotecnologia. 5. Fungos filamentosos.

I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
Mucuri.

**CDD 615**

JORGE ANDRES RUEDA ARDILA

**Otimização da produção da enzima anti-leucêmica L-asparaginase  
por *Penicillium sp.***

Dissertação apresentada ao  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS -  
STRICTO SENSU, nível de  
MESTRADO como parte dos requisitos  
para obtenção do título de MAGISTER  
SCIENTIAE EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

Orientador : Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula De  
Figueiredo Conte Vanzéla

Data da aprovação : 09/06/2017



Prof.Dr. PAULO HENRIQUE GRAZZIOTTI - UFVJM



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> VALÉRIA MACEDO CARDOSO - UFVJM



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> ANA PAULA DE FIGUEIREDO CONTE VANZÉLA - UFVJM

## AGRADECIMENTOS

Cronologicamente, quero agradecer aos meus pais e meu irmão, quem sempre estiveram prontos na hora de responder a maioria das minhas perguntas, e os quais nunca me fecharam uma porta para eu aprender mais. Além deles, ao meu tio Mauricio Peña, quem me sugeriu fazer minha pós-graduação no Brasil e me contatou com o Prof. Paulo Vitor Farago na UEPG, a quem também agradeço porque me deu a indicação de como participar no programa de bolsistas PAEC da OEA.

Aos colegas da engenharia química UIS espalhados pelo mundo! Os M. Sc. Jesús, José, Yatte, Jimmy, Victor e o futuro Ph.D Fernando Fajardo. Parecem tão importantes com o título que até disfarça que foram estudantes e músicos que trabalharam do meu lado desde calouros. Muitas experiências vividas que só eles e os outros *Caciques* podem entender. Vocês fizeram a horrorosa graduação mais amena. Valeu galera!

Ao grupo Coimbra de Universidades Brasileiras e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri por me adotar como gringo temporário na linda cidade de Diamantina, MG. Agradeço a todos os grupos envolvidos dentro da faculdade que colaboraram com este projeto de pesquisa: a PRPPG, a DRI, e *last, but not least*, ao laboratório de Biologia Molecular sob a direção da Prof. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela que foi uma mãe durante o curso do mestrado e seus afilhados Tiago, Ana Carolina, Aline, Nahyara, e Su. Ensinarão de mais! Foi um time ótimo de trabalho. Aos estudantes do grupo de Biocombustíveis que também estiveram ali (e em Viçosa) para apoiar este mestrando.

À República Pé de Cana, seus ex-moradores que também me adotaram temporariamente para morar na casa mais doida onde ocorreram eventos inexplicáveis; e aos amigos da república. Aos outros visitantes temporários IV que vieram dos outros cantos da América latina para sermos melhores profissionais Todos únicos. Todos incríveis. A todos: Valeu, senhores!

A todas as pessoas que conheci desde que entrei no avião para Belo Horizonte e em todos os cantos deste gigantesco e lindo país: viageiros, surfers, estudantes, músicos, filósofos de boteco, e outros estrangeiros no Brasil: se cruzou palavra comigo, obrigado mesmo.

*Os amigos são a família que você escolhe.*

*“L'arte non è mai finita, solo abbandonata”*

(Uma verdadeira obra de arte nunca se termina; só é abandonada)

Leonardo da Vinci

*“Lo bueno, si breve, dos veces mejor”*

(O bom, se conciso for, é duas vezes bom)

Baltasar Gracián

## RESUMO

A enzima L-asparaginase é atualmente utilizada na indústria de alimentos e na indústria farmacêutica devido à facilidade de catalisar a reação de hidrólise da L-asparagina em aspartato e amônia. Esta propriedade tem aplicação na indústria dos alimentos, pois evita a produção de compostos carcinogênicos como as acrilamidas. Por outro lado, na indústria farmacêutica, esta reação enzimática detém o crescimento de células leucêmicas devido à falta de L-asparagina que estas células devem afrontar. Conforme as células leucêmicas têm pouca ou nenhuma asparagina sintetase, as rotas metabólicas dependem exclusivamente da absorção desse aminoácido do meio fisiológico. Várias pesquisas foram feitas desde que a L-asparaginase mostrou a habilidade de reduzir alguns cânceres na década de 50. Estas pesquisas incluem a triagem de micro-organismos produtores, a otimização de meios de cultura para melhorar a produção e a procura de uma metodologia que consiga purificar a enzima a partir do estrato bruto. Tais pesquisas se intensificaram recentemente no Brasil devido a uma crise de abastecimento gerada pela interrupção da importação pelo fornecedor. A L-asparaginase é um princípio ativo de alta demanda para tratar a leucemia linfoblástica aguda e por isso deve ser produzida no Brasil. Este estudo foi realizado utilizando a linhagem *Penicillium sp.* T8.3 e teve como objetivo aprimorar a produção da enzima ajustando as condições de cultivo, usando glicerol e L-asparagina (como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente) e pH como as três variáveis de entrada. Os experimentos foram desenvolvidos aplicando ferramentas da estatística multivariável como planejamento fatorial, desenho composto central para gerar um modelo matemático empírico. Foram analisadas a concentração de amônio e a atividade enzimática produzida nos bioprocessos. A atividade enzimática foi determinada em reação conduzida a 37 °C e pH 7,0, condições semelhantes à do meio fisiológico. Todos os dados estatísticos foram gerados com o programa *Statistica 7.0* ©. Foi produzida uma atividade máxima de 12,7 U por bioprocessos estacionário conduzido em meio ajustado com 15,5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, 5,6 g.L<sup>-1</sup> de L-asparagina e pH 4,8. Desse modo, o ajuste das condições de cultivo permitiu elevar a produção em mais de 30 vezes e alcançar uma atividade enzimática superior à maioria dos relatos da literatura que tratam da produção da enzima fúngica. O modelo estatístico previu a produção enzimática com 77% de acerto, mostrando sua validade experimental e o potencial da linhagem T8.3 para a produção de L-asparaginase eucarionte.

**Palavras chave:** Estatística multivariável, atividade enzimática, Leucemia linfoblástica aguda, Biotecnologia, Fungos filamentosos.

## RESUMEN

La enzima L-asparaginasa es usada actualmente en la industria de alimentos y en la industria farmacéutica debido a su facilidad para catalizar la reacción de degradación de L-asparagina en amoníaco y aspartato. Esta característica es útil en la industria de alimentos puesto a que evita la producción de compuestos cancerígenos como la acrilamida. Por otro lado, en la industria farmacéutica, esta reacción detiene el crecimiento de células leucémicas debido al desabastecimiento de L-asparagina al que las células se enfrentan. Ya que estas células tienen poca o ninguna asparagina sintetasa, sus rutas metabólicas dependen exclusivamente de la absorción de aminoácidos desde el medio fisiológico. Varias investigaciones se han llevado a cabo desde que la L-asparaginasa mostró su capacidad para reducir algunos cánceres en los años 50. Estas investigaciones incluyen la clasificación de microorganismos como productores de esta enzima, la mejora de los medios de cultivo para optimizar la producción, y la búsqueda de una metodología para purificarla desde el extracto celular. Estos temas de investigación han ganado interés en Brasil debido a que el proveedor de este fármaco detuvo sus servicios. La L-asparaginasa presenta una alta demanda para tratar la leucemia linfoblástica aguda y por lo tanto debe ahora producirse en Brasil. Este estudio se llevó a cabo utilizando una cepa *Penicillium sp.* T8.3 cuyo objetivo fue optimizar la producción de la enzima mediante ajustes en las condiciones de cultivo usando glicerol y L-asparagina (como fuentes de carbono y de nitrógeno, respectivamente) y pH como las tres variables de entrada. Los experimentos fueron desarrollados utilizando herramientas de estadística multivariable como un planeamiento factorial y un diseño de compuesto central para obtener un modelo matemático empírico. Se analizaron la concentración de amoníaco y la actividad enzimática en los procesos biotecnológicos. La actividad enzimática fue determinada en una reacción a 37 °C y pH 7.0, condiciones similares al medio fisiológico. Todos los datos estadísticos fueron obtenidos del programa *Statistica 7.0* ©. Se obtuvo una actividad máxima de 12.7 U en proceso biotecnológico estacionario en un medio ajustado con 15.5 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, 5.6 g.L<sup>-1</sup> de L-asparagina y pH 4.8. Este ajuste de las condiciones de cultivo logró aumentar la producción en más de 30 veces, bien como alcanzar una actividad enzimática superior a la mayoría de los relatos de literatura que tratan de la producción de la enzima de hongos. El modelo estadístico predijo la producción enzimática en 77% de acierto, mostrando su validez experimental y el potencial de la cepa T8.3 para la producción de la L-asparaginasa eucariota.

Palabras clave: Estadística multivariable, actividad enzimática, Leucemia linfoblástica aguda, Biotecnología, Hongos filamentosos

## ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase is nowadays used in both pharmaceuticals and food industry because of its ability to catalyze the reaction of hydrolysis of L-asparaginase into ammonia and aspartate. This feature is useful in the food industry because it hinders the formation of carcinogenic compounds such as acrylamide. On the other hand, in the pharmaceutical industry, this enzymatic reaction prevents some leukemic cells from growing due to asparagine depletion. Since these cells have low levels or no asparagine synthase, their metabolic routes depend on amino acid absorption from physiological medium. Several researches have been carried out since L-asparaginase showed to reduce some cancers in the 50's. These researches include the screening of producing-microorganisms, optimization of the culture media to increase enzyme production, and development of methodology to purify the enzyme from crude extracts. Such researches have recently been intensified in Brazil due to a supply crisis resulting from interruption of the importer activities. L-asparaginase is a pharmaceutical of high demand to treat acute lymphoblastic leukemia, and therefore, it must be produced by Brazil. This study was carried out with the strain *Penicillium sp.* T8.3, and aimed to improve enzyme production by adjusting culture conditions, and by evaluating glycerol and L-asparagine – as carbon and nitrogen sources, respectively – and pH as input variables. The experiments were developed by using multivariable statistic tools such as factorial planning and central composite design to generate an empirical mathematical model. It was analyzed the ammonium concentration and the enzymatic activity produced in the bioprocesses. L-asparaginase activity was determined in reactions conducted at 37 °C and at pH 7.0, similar to the physiological conditions. All statistical data were obtained with the software Statistica 7.0 ©. A maximum activity of 12.7 U was produced by stationary bioprocess in media adjusted with 15.5 g.L<sup>-1</sup> glycerol, 5.6 g.L<sup>-1</sup> L-asparagine, and pH 4.8. Thus, adjustment of culture conditions allowed to increase production by 30 times, and to reach an enzyme activity higher than those reported by most of the literature that deals with production of the fungal enzyme. The statistical model predicted enzyme production with 77% of accuracy, showing its experimental validity and the potential of strain T8.3 to produce the eukaryote L-asparaginase.

Keywords: Multivariable statistics, enzymatic activity, acute lymphoblastic leukemia,  
Biotechnology, Filamentous Fungi

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1–Transaminação do aspartato por meio da enzima transaminase após hidrólise do grupo amino por meio da enzima L-asparaginase .....	17
Figura 2–Hidrólise da L-asparagina sob catálise da L-asparaginase.....	18
Figura 3– Reação de formação da acrilamida .....	19
Figura 4– Ciclo celular .....	26
Figura 5 – Mortalidade no Brasil entre os anos 1930 e 2004 .....	33
Figura 6 - Distribuição das taxas de incidência de leucemias infantis .....	34
Figura 7 - Taxa de mortandade por leucemias no Brasil em crianças entre os anos 2009 e 2013 .....	35
Figura 8 - Fungos filamentosos e leveduras .....	39
Figura 9 - Exemplo de planejamento fatorial genérico com três variáveis: pH, concentração de carbono e concentração de nitrogênio .....	45
Figura 10 - Diagrama de um desenho composto central genérico .....	45
Figura 11– Superfície de nível para três variáveis de entrada. ....	47
Figura 12 - Linhagem T8.3 após cultivo de 72 horas em meio Czapek-Dox a 30°C.....	49
Figura 13 - Coloração do reagente de Nessler em diferentes concentrações de amônio.....	54
Figura 14 - Diagrama de Pareto para análise do efeito das variáveis de entrada sobre a atividade de L-asparaginase produzida por <i>Penicillium sp.</i> T8.3 em cultivo de 48 horas .....	59
Figura 15 - Diagrama de Pareto para análise do efeito das variáveis de entrada sobre a atividade de L-asparaginase produzida por <i>Penicillium sp.</i> T8.3 em cultivo de 72 horas .....	59
Figura 16 - Superfícies de resposta da atividade enzimática de L-asparaginase após 120 horas em função das variáveis de entrada, concentração de glicerol, de L-asparagina e pH.....	64
Figura 17 - Robustez da produção de L-asparaginase de <i>Penicillium sp.</i> T8.3 em função das variáveis concentração de asparagina x concentração de glicerol, pH x concentração de asparagina e pH x concentração de glicerol. ....	65
Gráfico 1 - Liberação de amônio nas culturas com baixa suplementação de L-asparagina .....	57
Gráfico 2–Liberação de amônio nas culturas com alta suplementação de L-asparagina .....	57
Gráfico 3 - Queda na concentração de L-asparagina nos meios em condições de otimização .....	68
Gráfico 4 - Produção de L-asparaginase por <i>Penicillium sp.</i> T8.3 em bioprocesso melhorado .....	70

Gráfico 5 - Curva de calibração do espectrofotômetro: absorvância vs. concentração de amônia .....	83
Quadro 1 – Bactérias e fungos produtores de L-asparaginase .....	25
Quadro 2 – Diferenças entre tumores benignos e malignos .....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de leucemias no Brasil no ano 2012 separados por região e por gênero .....	34
Tabela 2–Variáveis e níveis para elaboração de planejamento fatorial $2^3$ .....	52
Tabela 3–Bioprocessos gerados por planejamento fatorial para seleção de variáveis com efeito na produção de L-asparaginase por <i>Penicillium sp.</i> T8.3.....	52
Tabela 4 – Variáveis e níveis para elaboração de Desenho Composto Central .....	53
Tabela 5 - Bioprocessos gerados por Desenho Composto Central para ajuste da produção de L-asparaginase por <i>Penicillium sp.</i> T8.3 .....	53
Tabela 6 - Atividade enzimática produzida nos bioprocessos delineados por planejamento fatorial.....	58
Tabela 7 - Atividade enzimática produzida nos bioprocessos delineados por desenho composto central entre 24 e 120 horas de incubação. ....	63
Tabela 8 - Sumário dos coeficientes e suas significâncias determinados no modelo matemático.....	67
Tabela 9 - Comparação entre o modelo matemático e o resultado experimental.....	70
Tabela 10 - ABS. dos padrões para a curva de calibração .....	83
Tabela 11 - Meio sólido Czapek-DOX.....	84
Tabela 12 - Padrões da curva analítica de amônio .....	85

## ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>apud</i>	Citado por
atm	atmósfera (unidade de pressão)
ATP	Adenosina Trifosfato (do inglês <i>Adenosine Tri-Phosphate</i> )
DCC	Desenho de Composto Central
<i>e.g.</i>	Por exemplo (do latim <i>exempli gratia</i> )
<i>et al.</i>	E outros (do latim <i>Et alii</i> )
FDA	do inglês <i>Food Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>i.e.</i>	Em outras palavras (do latim <i>id est</i> )
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfoblástica Crônica
min.	minutos
PEG	Polietileno Glicol
PF	Planejamento Fatorial
rpm	Revoluções por minuto
SD	Desvio padrão (do inglês <i>Standard Deviation</i> )
SNC	Serviço Nacional de Câncer
SOBOPE	Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica
TCA	Acido tricloroacético
UICC	União Internacional do Controle do Câncer

## SÍMBOLOS

%	por cento
±	Mais ou menos
@	Nas condições
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µg	micrograma
C	Carbono
<i>g</i>	aceleração de gravidade
g	grama
h	horas
L	litro
M	Molar
mL	mililitros
N	Nitrogênio
nm	nanómetro
pH	Potencial de Hidrogênio
R \$	Real brasileiro
T <sub>0</sub>	Tempo 0 de reação
T <sub>30</sub>	Tempo 30 de reação
U	Unidade Internacional de atividade enzimática
US \$	Dólar americano
α	Alfa
β	Beta

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	17
2.1	A enzima L-asparaginase .....	17
2.2	Histórico: descobrimento, pesquisa e produção da L-asparaginase.....	20
2.3	Câncer, leucemias e tratamento .....	25
2.4	História e atualidade da luta contra o câncer no Brasil.....	31
2.5	Desafios e perspectivas do uso de L-asparaginase .....	36
2.6	Os fungos, sua nutrição e estado da arte no cultivo biotecnológico .....	38
2.7	Estatística multivariada.....	43
3	OBJETIVOS.....	48
3.1	Objetivo geral .....	48
3.2	Objetivos Específicos .....	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	49
4.1	Linhagem produtora e manutenção.....	49
4.2	Produção de inóculo.....	49
4.3	Meio e condições para a produção de L-asparaginase.....	50
4.4	Planejamento fatorial .....	51
4.5	Desenho composto central (DCC) .....	52
4.6	Determinação de amônio e atividade enzimática.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
5.1	Resultados do Planejamento fatorial.....	56
5.2	Resultados do Desenho composto central (DCC).....	62
5.3	Avaliação experimental do modelo matemático.....	67
6	CONCLUSÕES.....	71
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHO FUTURO.....	72
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	73
	APÊNDICE .....	82
	APÊNDICE A - MATEMÁTICA DETALHADA .....	82
	ANEXOS .....	84
	ANEXO A - MEIO SÓLIDO CZAPEK-DOX .....	84
	ANEXO B - REAGENTES DE LABORATÓRIO.....	85



## 1 INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase (EC.3.5.1.1), também denominada L-asparagina amido-hidrolase, é uma enzima de amplo interesse nas indústrias farmacêutica e de alimentos devido às suas aplicações terapêuticas e utilidade para o processamento de alimentos.

A enzima é utilizada para evitar a produção de acrilamida, uma molécula carcinogênica (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013) formada em frituras e em produtos de panificação que contenham amido e sejam submetidos a altas temperaturas. Vários estudos relatam a presença de acrilamida em alimentos não só no Brasil, mas também ao redor do planeta. Isso sugere que a presença deste composto não tem ligação com um fator cultural ou culinário nem com a natureza dos ingredientes usados em diferentes partes do mundo (ARISSETO, 2007) e sim com os processos universais na cozinha.

Os processos de fritar e cozinhar ingredientes com alto conteúdo de polissacarídeos e baixos níveis de proteínas são os responsáveis por criar tais acrilamidas perigosas, pois essas condições são as necessárias para induzir a reação de Maillard em altas temperaturas (DERGAL, 2006). Uma alternativa para melhorar a segurança desse tipo de alimento é reduzir ou eliminar a presença das acrilamidas na sua composição.

Vários micro-organismos têm mostrado que possuem o gene codificador da L-asparaginase. Bactérias como *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio succinogenes* (BUNPO *et al.*, 2008; EL-BESSOUMY; SARHAN; MANSOUR, 2004; ROBERTS; BURSON; HILL, 1968) e algumas espécies de fungos dos gêneros *Phoma*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladusporium*, *Scytalidium*, *Thielavia*, *Malloranchea* (CHOW; TING, 2015; PATRO; GUPTA, 2014; RADHIKA TIPPANI, 2012; SHRIVASTAVA *et al.*, 2012; SURESH; RAJU, 2013) expressam L-asparaginase durante suas atividades metabólicas.

As pesquisas sobre a L-asparaginase foram conduzidas não só pelo interesse industrial na área dos alimentos, mas também pelo interesse farmacêutico da enzima, que atua inibindo o crescimento de alguns tipos de linfomas. Alguns estudos sobre leucemia linfoblástica aguda (ou linfocítica aguda) (LLA) reportam que a L-asparagina é um aminoácido essencial para as células leucêmicas, as quais são incapazes de produzi-la e dependem de sua disponibilidade no sangue (LOUREIRO, 2010).

O mecanismo usado pela enzima L-asparaginase é catalisar a reação irreversível de degradação da L-asparagina em L-aspartato e amônia em ambientes aquosos (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). As células normais expressam a enzima L-asparagina sintetase e, assim, conseguem produzir doses pequenas deste aminoácido (GRAHAM, 2003; MÜLLER; BOOS, 1998; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007; SARQUIS *et al.*, 2004). Desse modo, a L-asparaginase se converte em um princípio ativo seletivo para as células leucêmicas, uma vez que, quando administrada por via intravenosa, atua hidrolisando a L-asparagina sanguínea. E, como a LLA é responsável por 0,5 e 3 % da morbidade pediátrica nacional (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008), é necessário investir em pesquisas focadas na produção desta enzima no país.

O interesse para a produção de L-asparaginase no Brasil decorre de uma crise de abastecimento que fez o governo federal investir R\$ 17,6 milhões no ano de 2014 para atender a demanda nacional para 3.000 crianças (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2014). Lamentavelmente, o fornecedor suspendeu a produção do medicamento (PALMER, 2012) e a L-asparaginase é atualmente obtida através de importação a um custo mais elevado, quando o país deveria implementar condições biotecnológicas para sua produção interna (MILA, 2014). Isto não só representa uma oportunidade científica para o país, mas também é um desafio econômico, onde a redução de custos deve ser avaliada no sentido de sanar a falta de uma indústria enzimática brasileira bem estabelecida (ZIMMER *et al.*, 2009).

A busca por novas linhagens produtoras de L-asparaginase, principalmente entre os organismos eucariontes, bem como o melhoramento do processo biotecnológico pelo ajuste das variáveis, é uma premissa para impulsionar o desenvolvimento da produção no mercado brasileiro e para encontrar novas formas da enzima com melhores propriedades terapêuticas e menos efeitos colaterais. O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de ajustar as condições de produção para aprimorar a produção de L-asparaginase por um isolado de *Penicillium sp.* que em estudos anteriores foi selecionado como potencial produtor da enzima.

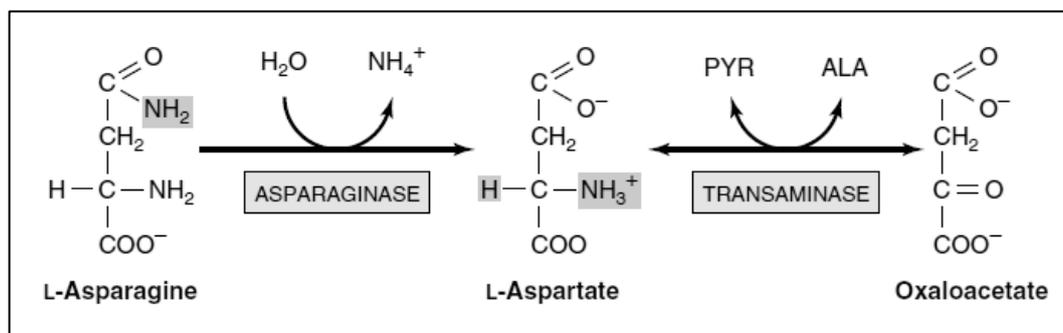
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A enzima L-asparaginase

A L-asparaginase é uma hidrolase, ou seja, em ambiente aquoso, a enzima catalisa uma reação de hidrólise. A enzima atua sobre seu substrato, o aminoácido L-asparagina, mediante um ataque nucleofílico, provocando uma dissociação do radical amida e liberação de amônia, bem como resultando na formação de um intermediário acil-enzima. Na segunda etapa da reação, o intermediário acil-enzima é hidrolisado e forma-se uma molécula de L-aspartato (SANSOM; JASKOLSKI, 2004). Esse mecanismo usado para gerar o íon L-aspartato é quem dá o outro nome à enzima: L-asparagina amido-hidrolase, cujo número de identificação é EC 3.5.1.1 (*Enzyme Commission Number*). O número EC da L-asparaginase indica a classificação como enzima hidrolase (3), que ataca as ligações C-N não peptídicas (5), em substratos lineares (1), mais especificamente a L-asparagina(1) (MOSS, 2016).

No metabolismo celular, a L-asparaginase tem por função converter a L-asparagina em L-aspartato, que deve em seguida sofrer reação de transaminação com uma molécula de piruvato durante o catabolismo de aminoácidos como se vê na Figura 1. O objetivo da reação é transformar o L-aspartato em outra molécula sem nitrogênio, o oxaloacetato, para ser oxidada no ciclo do ácido cítrico (MURRAY *et al.*, 2010). Em outros cenários naturais, alguns autores reportam que a L-asparaginase ajuda na mineralização de nitrogênio em solos (DODOR; TABATABAI, 2003).

**Figura 1–Transaminação do aspartato por meio da enzima transaminase após hidrólise do grupo amino por meio da enzima L-asparaginase**



Fonte: MURRAY *et al.* (2010)

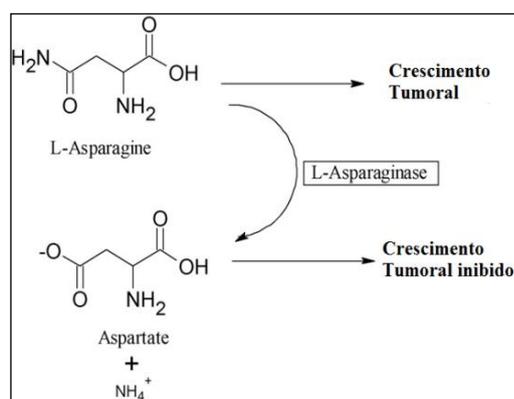
Devido à sua atividade hidrolítica sobre o grupo amida, a L-asparaginase possui aplicações industriais e farmacêuticas. É ideal para evitar o crescimento de células dependentes do aminoácido L-asparagina e também para evitar a formação de acrilamida. No

primeiro caso, fala-se de L-asparaginase como enzima farmacêutica, já que a L-asparagina é um aminoácido essencial para as células leucêmicas, que são incapazes de sintetizá-lo. As células normais conseguem sintetizar a L-asparagina mediante o seguinte mecanismo: uma transaminase converte uma molécula de oxaloacetato em um intermediário L-aspartato, através da transferência de um grupo amino do aminoácido glutamato formando  $\alpha$ -cetoglutarato e L-aspartato (BATOOL *et al.*, 2016). Finalmente, a molécula de L-aspartato é convertida em L-asparagina sob catálise da enzima L-asparagina sintetase.

A deficiência de L-asparagina sintetase diferencia as células normais e as neoplásicas da LLA (FERNANDEZ *et al.*, 2014; GRAHAM, 2003; SARQUIS *et al.*, 2004). Aparentemente, a regulação de asparagina sintetase está ligada à capacidade de metilação dos resíduos de citosina no DNA (GRECO *et al.*, 1989).

A eliminação de L-asparagina do meio fisiológico bloqueia o ciclo celular das células neoplásicas na fase G1, fase de crescimento, enquanto que as células normais conseguem subsistir devido à síntese intracelular do aminoácido (BATOOL *et al.*, 2016; DE ALMEIDA *et al.*, 2005). A deficiência de L-asparagina prejudica a síntese proteica e leva as células do câncer à morte por apoptose (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). Na Figura 2 se apresenta uma ilustração do mecanismo de ação da enzima L-asparaginase. Fazer um rastreamento destes fenômenos em tempo real no corpo humano é relativamente simples, pois ambas, L-asparagina e L-asparaginase, são facilmente determinadas no plasma e no fluido cerebrospinal (RIZZARI *et al.*, 2013).

**Figura 2–Hidrólise da L-asparagina sob catálise da L-asparaginase.**



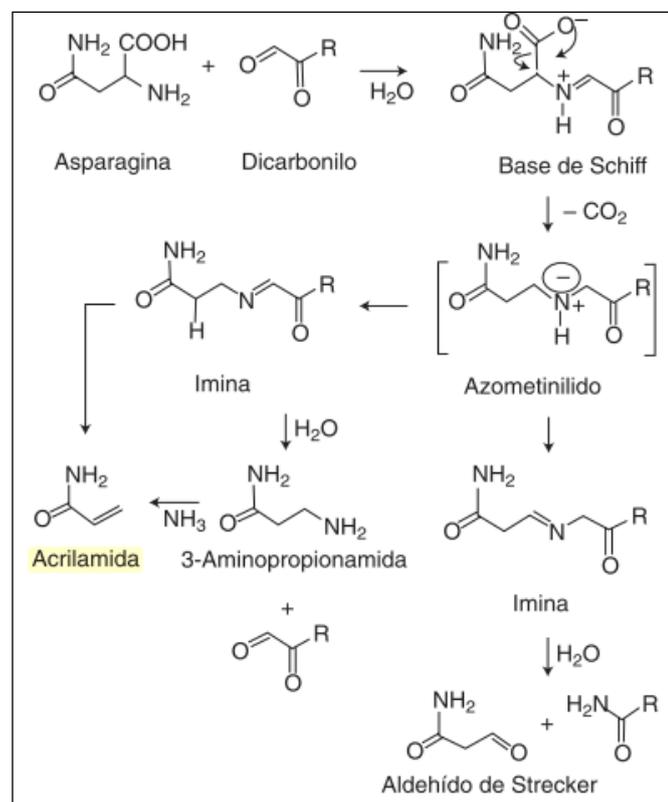
Fonte: Modificado de LOUREIRO (2010)

Num segundo panorama, na indústria de alimentos, a L-asparaginase é utilizada para evitar a produção de acrilamidas, compostos sólidos, cristalinos, incolores e inodoros

(BATOOL *et al.*, 2016). A aplicação dessa enzima na indústria de alimentos também é devida à sua ação na reação de degradação de L-asparagina. Dergal (2006) afirma que a L-asparagina está envolvida na reação de Maillard onde se formam produtos de Amadori, os quais reagem com terminais redutores do amido para finalmente produzir a acrilamida. A sequência de reações de conversão de L-asparagina a acrilamida estão ilustradas na Figura 3. Portanto, diminuir a L-asparagina em alimentos reduz em 90% a formação de acrilamidas, compostos carcinogênicos de alto risco, sem alterar os procedimentos culinários tradicionais, nem comprometer o sabor ou a qualidade dos alimentos (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

No Brasil, as enzimas especiais, as de uso diagnóstico, terapêutico, de química fina e pesquisa, são predominantemente importadas enquanto que a exportação é muito menos expressiva (ZIMMER *et al.*, 2009). No período de 1998-2005 o Brasil importou o equivalente a US\$ 516 milhões e exportou US\$ 24,5 milhões, o que corresponde a 84% de importação e 16% de exportação. Esses autores descrevem a necessidade do investimento para expandir o aumento da produção enzimática no Brasil.

**Figura 3– Reação de formação da acrilamida**



Fonte: DERGAL (2006)

## 2.2 Histórico: descobrimento, pesquisa e produção da L-asparaginase

Os primeiros experimentos que relatam tratamento de LLA com uma proteína obtida de outro organismo datam do ano de 1953, quando Kidd utilizou soro de suíno para combater a doença em camundongos de laboratório (KIDD, 1953). Os resultados mostraram que os camundongos morriam devido aos carcinomas quando não recebiam o tratamento com o soro, enquanto que camundongos tratados apresentavam regressão do carcinoma. Um estudo contemporâneo feito por McCoy (1956) sugeria que o crescimento de certos tumores era dependente de aminoácidos obtidos do meio extracelular. A tecnologia disponível e as técnicas usadas naquele momento não permitiram que Kidd reconhecesse no soro o princípio ativo responsável pela regressão do linfoma. Contudo, o autor descreveu muito bem suas suspeitas de que se tratava de uma proteína, incluindo a observação de que era precipitável com sulfato de amônio em grandes concentrações. O autor afirmou que o constituinte era resistente a uma temperatura aproximada de 56 °C, porém, era inativado acima dos 60 °C. Dez anos depois, no mesmo local, o Hospital de Nova Iorque, continuando os estudos de Kidd, Broome sustentou a hipótese de que a L-asparaginase era o constituinte responsável pelo efeito anti-linfoma (BROOME, 1963). Em seus experimentos, este autor separou frações do soro e testou a atividade de cada uma delas comparando-as com a atividade da L-asparaginase. Seus resultados confirmaram a estabilidade térmica do soro, com redução de 20% da atividade quando da exposição a 56 °C, e perda de 80% da atividade da enzima na temperatura de 66 °C. Outro aporte experimental feito por Broome foi analisar a estabilidade do soro quando exposto a diferentes valores de acidez. Esse autor concluiu que embora a máxima estabilidade (e também, máxima atividade anti-linfoma) era mantida em pH neutro, um meio alcalino era menos agressivo do que um meio ácido.

Mashburn e Wriston (1964) conseguiram isolar a enzima L-asparaginase produzida por *E. coli* e avaliaram sua atividade enzimática. A partir daí, tornou-se crescente o interesse em encontrar outras fontes microbianas de L-asparaginase.

A L-asparaginase foi a primeira enzima utilizada em humanos com fins terapêuticos (BATOOL *et al.*, 2016). A suposição de que poderia ser utilizada para tratamento da LLA em crianças foi feita por Clementi em 1922 (*apud* SAVITRI; ASTHANA; AZMI, 2003). No ano de 1966 foi relatado o primeiro caso de tratamento de LLA em um paciente pelo uso da L-asparaginase (DOLOWY *et al.*, 1966). Na mesma época, se desenvolvia uma pesquisa onde se conseguiu demonstrar a eficácia terapêutica da L-asparaginase (OETTGEN

*et al. apud LOUREIRO, 2010*). Na época, a busca por fontes alternativas da enzima não proveniente de mamíferos ainda estava em andamento e no caso descrito por Dolowy foi aplicada L-asparaginase parcialmente purificada do soro de suíno. Dolowy alcançara uma redução parcial do tumor, mas os sintomas posteriores ao tratamento mostraram que o uso desta L-asparaginase tinha consequências tóxicas. Algumas dessas reações colaterais da L-asparaginase, como a encefalopatia e a hepatotoxicidade, estão associadas à presença de  $\text{NH}_4^+$  no sangue (*KURTZBERG apud LOUREIRO, 2010*).

Efeitos similares relacionados a respostas imunológicas e toxicológicas foram observados em tratamentos nos quais foi ministrada L-asparaginase produzida por *E. coli* isolada segundo procedimento desenvolvido por Wriston e Mashburn (1964). Ohnuma *et al.* (1970) descreveram que urticária, edema, febre e erupções cutâneas eram outros sintomas decorrentes do tratamento com a L-asparaginase, além da formação de anticorpos contra a enzima, que eventualmente reduziriam seu tempo de meia-vida.

Algumas consequências indesejadas a mais foram descritas por outros pesquisadores: casos de anormalidades relacionadas à má coagulação (hemóstase) ocorreram no tratamento com L-asparaginase de origem bacteriana (*ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014*). Aparentemente, este fenômeno é decorrente da redução da concentração dos inibidores de proteases de serina, causada pela administração da L-asparaginase (*SHRIVASTAVA et al., 2016*). Outro autor sugeriu que a presença de aspartato e glutamato gera toxicidade ligada a distúrbios no sistema nervoso central como depressão, fadiga, sonolência, confusão e irritabilidade (*POCHEDLY, 1977*). Pancreatite, trombose e complexas reações de hipersensibilidade (alergias clínicas) foram observadas em pacientes que receberam L-asparaginase comercial (*ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014*). Há um longo tempo se sabe que a atividade alternativa de L-glutaminase, presente nas L-asparaginases comumente utilizadas, podem causar tais efeitos secundários (*HOWARD; CARPENTER, 1972*).

Embora exista clinicamente uma forma de minimizar os efeitos já descritos, há mais um problema associado ao tratamento com L-asparaginase: a inativação silenciosa. O uso frequente e alternado desta enzima farmacêutica resultou, em alguns pacientes, na sua inativação, anulando por completo a ação terapêutica de qualquer das formas comerciais disponíveis (*ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014; RIZZARI et al., 2013*). Tal inativação é grave não só pelo fato de não apresentar sinais clínicos que poderiam alertar para sua ocorrência e ineficácia do tratamento (*RIZZARI et al., 2013*), mas também porque leva ao

gasto inútil de um composto com alto valor agregado (ANDRADE; BORGES; SILVEIRA, 2014).

Posteriormente, na busca pela diminuição das respostas imunológicas, conseguiu-se alterar quimicamente a estrutura da L-asparaginase de *E. coli*, adicionando-se uma cadeia de polietileno-glicol (PEG) (ABUCHOWSKI *et al.*, 1977). A conjugação da enzima com PEG permitiu diminuir quase por completo as respostas alérgicas. Essa alteração encobre alguns sítios superficiais, resultando em impedimentos estéricos como consequência do incremento do tamanho molecular (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016). Consequentemente, a cobertura desses sítios da enzima diminui o poder farmacêutico do complexo. Porém, as respostas alérgicas foram menores e os tempos de meia-vida foram consideravelmente melhorados: a enzima conjugada com PEG tem um tempo cinco vezes maior de vida do que a enzima nativa, e aproximadamente nove vezes maior do que a L-asparaginase produzida por *Erwinia* (SHRIVASTAVA *et al.*, 2016).

A L-asparaginase de *E. coli* conjugada com PEG tornou-se uma alternativa aos problemas dos pacientes hipersensíveis às formas nativas da L-asparaginase (HAK *et al.*, 2004). Outra maneira encontrada para melhorar o tratamento da LLA foi administrar conjuntamente L-asparaginase e metotrexato (AGUAYO *et al.*, 1999), um fármaco utilizado comumente em tratamento de doenças autoimunes por sua capacidade de diminuir a liberação do ácido fólico. A forma de administração destes fármacos sempre foi preferencialmente intramuscular (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; TSURUSAWA *et al.*, 2004), devido à necessidade de proteger a enzima da ação das proteases do trato digestivo (SAID; PIETRO, 2010).

Os esforços empenhados durante a década de 70 para reduzir respostas imunológicas da L-asparaginase resultaram na aceitação pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 1994 do uso da enzima de *E. coli* conjugada com PEG, sob o nome comercial de ONCASPAR<sup>®</sup> (FDA, 2006). Todavia, o complexo PEG-L-asparaginase comprometia a qualidade terapêutica da enzima. Assim, uma nova fonte de L-asparaginase surgiu: o gênero *Erwinia*. De fato, o uso da L-asparaginase oriunda de *E. chrysanthemi* ainda é uma opção para pacientes que já reagiram contra a L-asparaginase produzida por *E. coli*. A L-asparaginase de *E. chrysanthemi* também foi aprovada pela FDA em 2011 (BATOOL *et al.*, 2016). Contudo, essa enzima também apresentou efeitos relacionados a respostas imunológicas e toxicológicas

como dificuldade para respirar, olhos inflamados, bronco-aspiração e pancreatite (FERNANDEZ *et al.*, 2014).

Em 2014 foi feita uma comparação entre as três L-asparaginases comercialmente disponíveis, ou seja, a enzima nativa de *E.coli*, a enzima de *E. coli* conjugada com PEG e a enzima proveniente de *E. chrysanthemi* (FERNANDEZ *et al.*, 2014). O estudo demonstrou que era possível substituir temporariamente as formas de L-asparaginases para pacientes que apresentassem respostas imunogênicas. Contudo, não dava uma resposta definitiva aos problemas de hipersensibilidade e toxicidade da enzima bacteriana. A não resolução de tais problemas compromete a eficácia do tratamento, já que pacientes com altos graus de anticorpos mostram os mais altos níveis de L-asparagina (HAK *et al.*, 2004).

A nanotecnologia também foi avaliada como alternativa para diminuir os efeitos secundários da administração de L-asparaginase. Lipossomas da escala dos 100 nm foram usados para encapsular a enzima, reduzindo sua detecção pelo sistema imune e as respostas imunológicas (GASPAR; PEREZ-SOLER; CRUZ, 1996). Em geral, a maioria das encapsulações atuais são utilizadas para permitir a passagem através da barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *Brain Blood Barrier*). Entretanto, tais encapsulações são tão eficazes nesse sentido que por vezes resultam na perda da atividade desejada (BANKS, 2009). Por isso, é fundamental usar complexos que alterem minimamente as propriedades químicas de ligação dos fármacos (SILVA, 2008). Contudo, o custo da nanotecnologia dificulta a pesquisa e a produção industrial.

Em resumo, até o momento, são utilizadas formulações comerciais da enzima produzida por bactérias que geram vários efeitos secundários e uma forma enzimática conjugada com um polímero que reduz seus efeitos tóxicos e aumenta o tempo de meia-vida, mas que lamentavelmente não é tão eficiente como a nativa (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014). Assim, esses dois micro-organismos, *E. coli* e *E. chrysanthemi*, representam as fontes principais de L-asparaginase há um longo tempo (BONETTI *et al.*, 1969).

Os tratamentos que envolvem o uso da L-asparaginase são um foco de pesquisa da oncologia moderna, não só pela quantidade de micro-organismos produtores que vêm sendo reconhecidos, como pela eficácia do tratamento, que permite alcançar a remissão completa da doença em 90% das crianças tratadas, bem como pela mínima aparição de efeitos secundários

quando comparado com a quimioterapia tradicional (HOWLADER *et al.*, 2016; SAVITRI; ASTHANA; AZMI, 2003). Embora a L-asparaginase não seja utilizada como fármaco único no tratamento da LLA, é um princípio ativo indispensável complementar a outros agentes terapêuticos (VERMA *et al.*, 2007).

Assim, a descoberta e produção de L-asparaginase microbiana foram fundamentais para a terapêutica da LLA. Entretanto, a maioria dos micro-organismos produz uma forma de L-asparaginase intracelular, o que dificulta a obtenção da enzima devido à necessidade de se incluir no processo produtivo a etapa de ruptura celular para a recuperação do produto, gerando perdas e diminuindo o rendimento (KIL; KIM; PARK, 1995). Além disso, outros autores relatam que os rendimentos obtidos também são muito baixos no que diz respeito à atividade enzimática (KENARI *et al. apud* MAHAJAN *et al.*, 2012).

Os fungos filamentosos são um recurso biológico muito interessante para a busca de novos produtores de L-asparaginase, como alternativa à L-asparaginase bacteriana atualmente disponível no mercado, uma vez que diversas espécies são capazes de produzir elevadas quantidades da enzima extracelular. Assim sendo, a produção da enzima fúngica pode trazer como vantagem uma maior facilidade no procedimento de purificação.

A pesquisa sobre a produção de L-asparaginase de origem fúngica é mais recente e há relatos com resultados positivos sobre sua eficácia para o combate às células malignas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2010). No Quadro 1 se listam alguns organismos produtores desta enzima, incluindo espécies de fungos que foram descritas como produtores de L-asparaginase.

**Quadro 1 – Bactérias e fungos produtores de L-asparaginase**

Comparação entre bactérias e fungos produtores de L-asparaginase

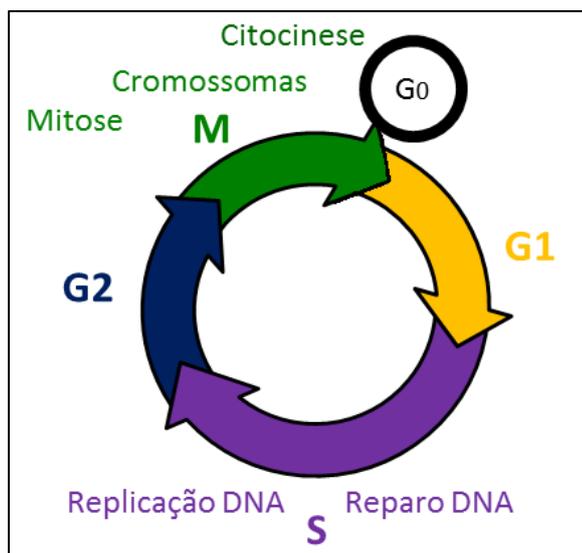
Bactérias gram-negativas	Bactérias gram-positivas	Fungos
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Alternaria sp.</i>
<i>Azotobacter agilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Brevibacillus brevis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>A. niger</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>B. mesentericus</i>	<i>A. oryzae</i>
<i>Citrobacter sp.</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>A. tamarii</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. terreus</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>B. circulans MTCC 8574</i>	<i>C. bombicola</i>
<i>Erwinia aroideae</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>E. cartovora</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Cylindrocapsa obtusisporum</i>
<i>E. chrysanthemi</i>	<i>M. phlei</i>	<i>Fusarium roseum</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Mucor sp.</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Pichia polymorpha</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Streptococcus albus</i>	<i>Rhodospiridium toruloides</i>
<i>Pseudomonas sp.</i>		<i>Rhodotorula sp.</i>
<i>P. fluorescens AG</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>P. geniculata</i>		
<i>P. ovalis</i>		
<i>P. stutzeri</i>		
<i>Proteus vulgaris</i>		
<i>Pyrococcus horikoshii</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Thermus thermophiles</i>		
<i>T. aquaticus</i>		
<i>Vibrio succinogenes</i>		
<i>Zymomonas mobilis</i>		

Fonte: (BATOOL *et al.*, 2016)

### 2.3 Câncer, leucemias e tratamento

Todas as células dos organismos vivos existem em uma harmonia cíclica orientada a manter a vida. Essa harmonia cíclica envolve processos como aumento de massa celular, síntese de DNA e divisão diploide da célula. Esse ciclo se conhece como ciclo G1-S-G2-M ou simplesmente ciclo celular (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008) onde estão incluídas fases como duplicação de DNA, síntese de proteínas e mitose (FIG. 4). Às vezes, há fatores que interrompem os mecanismos que regulam a multiplicação celular e, portanto, começa-se a ver uma reprodução descontrolada de uma célula: esse fenômeno é conhecido como neoplasia.

Figura 4– Ciclo celular



Fonte: modificado de DE ALMEIDA *et al.* (2005). M, fase de divisão celular; G1, fase de crescimento 1 (do inglês *growth*); S, fase de síntese; G2, fase de crescimento 2.

A definição de neoplasia, segundo Pérez-Tamayo e Robbins, citados pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008), é “uma proliferação anormal de tecido que foge parcialmente ou totalmente ao controle do organismo tendendo à autonomia e à perpetuação com efeitos agressivos no hospedeiro.”. Assim, nem toda neoplasia é maligna, ou seja, nem toda neoplasia é um câncer.

Habitualmente, o conceito de neoplasia é confundido com o de câncer e esse último com o de tumor. Entretanto, câncer é uma palavra que associa mais de 100 doenças, não apenas uma. Hoje existem quase 200 tipos de cânceres e todos se constituem em neoplasia maligna responsáveis por 13% das mortes no mundo, o que significa mais de 7 milhões de óbitos globais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008). Estima-se que em 2020 o número de pacientes com alguma destas doenças será maior que 15 milhões (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006).

Outro erro na linguagem coloquial tem a ver com a palavra tumor. Um tumor não está sempre associado a uma neoplasia maligna, bem como há diversos cânceres que não chegam a formar um tumor. A leucemia, por exemplo, é um tipo de câncer que se expande sem gerar protuberâncias (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No estudo dos tumores, é fundamental estabelecer as diferenças entre as formas benignas e as formas malignas. Entre os critérios para a diferenciação de tumores está incluído o critério da encapsulação, segundo o qual os tumores benignos não possuem

cápsulas e sim pseudocápsulas como consequência da acumulação de tecidos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008). Segundo o critério do crescimento, os tumores benignos com frequência crescem lentamente, exibindo um bom suprimento vascular e quase nunca necrose e hemorragia. Segundo o critério da morfologia, um tumor benigno consegue imitar o aspecto do tecido de origem, enquanto o tumor maligno se reproduz formando atípicas neoplásicas, com caracteres que se afastam da célula proveniente. Segundo o critério de mitoses, nos tumores malignos observa-se um maior número de processos reprodutivos e de caráter atípico, enquanto nos tumores benignos as figuras de mitoses são raras, porém típicas. Segundo o critério da antigenicidade, os tumores malignos apresentam uma alta capacidade produtiva de antígenos; que traz como consequência uma recente detecção destas células mediante o uso de biomarcadores. Finalmente, segundo o critério da metástase, só os tumores malignos têm a capacidade de migrar a outros locais e dessa maneira invadir tecidos distantes (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008). A diferenciação de tumores quanto aos critérios descritos é apresentada resumidamente no Quadro 2.

**Quadro 2 – Diferenças entre tumores benignos e malignos**

Critério	BENIGNOS	MALIGNOS
Encapsulação	Presença frequente	Geralmente ausente
Crescimento	Lento, expansivo e delimitado.	Rápido, infiltrativo pouco delimitado.
Morfologia	Reproduz o aspecto do tecido de origem	Caracteres diferentes ao tecido de origem
Mitoses	Raras e típicas	Frequentes e atípicas
Antigenicidade	Ausentes	Presente - embora geralmente fraco
Metástases	Não acontece	Frequentes

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2008)

Todos os tipos de cânceres se diferenciam segundo sua origem tecidual, porém todos apresentam um crescimento desmesurado de células transformadas (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Para o diagnóstico, é necessário fazer uma biópsia, que em poucas palavras significa coletar uma amostra do tecido para a condução de análises laboratoriais. A transformação maligna que ocorre em tais células é resultado progressivo e cumulativo da expressão de oncogenes que foram modificados a partir de proto-oncogenes, ou pela perda da função de genes supressores de tumor. Algumas vezes o crescimento de células tumorais está relacionado a fatores genéticos, espontâneos, mas também a fatores de risco. Os fatores de risco incrementam a possibilidade de proliferação de células neoplásicas, pois são

normalmente hábitos que expõem às células a danos irreparáveis, entre eles o fumo, a exposição desmesurada ao sol, dieta pouco balanceada. Inclusive, o INCA afirma que o crescimento alarmante dos cânceres em adultos está mais relacionado com a dita exposição aos fatores de risco (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008).

Duas consequências críticas seguem o crescimento do câncer: a primeira, é que as células de um tecido vão sendo progressivamente substituídas por células tumorais trazendo como consequência a ocupação de células disfuncionais no lugar das células funcionais; a segunda é que ocorre saturação de vasos sanguíneos para alimentar o crescimento maligno. Portanto, o processo de angiogênese é acelerado até o ponto em que o grupo de células neoplásicas não consegue se nutrir de oxigênio suficiente e deve migrar a outro local. Este último fenômeno é a metástase (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006).

Embora a proliferação geral de células no reino animal ocorra de forma programada, a maior parte dos tumores malignos apresenta crescimento descontrolado. Uma característica fundamental do câncer é o crescimento contínuo indefinido. Todas as células animais possuem um terminal nos cromossomos chamado telômero composto por várias sequências TTAGGG cuja função é proteger o cromossomo (SHAY; WRIGHT, 2011). Com o passar do tempo (medido em divisões celulares) tais terminais vão se desgastando aos poucos até gerar cromossomos diminuídos em tamanho, o que é traduzido fenotipicamente em envelhecimento. Contudo, 90% dos tipos de câncer consegue expressar a enzima telomerase, *i.e.*, uma ribonucleoproteína que consegue aderir terminais ao telômero alimentando o cromossomo e permitindo a divisão celular por tempo indefinido (KIM *et al.*, 1994). Em outras palavras, 90 % dos cânceres não envelhecem e não morrem naturalmente.

As leucemias são os tipos de cânceres mais frequentes em crianças entre os 2 e os 10 anos de idade (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2008). A LLA é uma das formas de câncer que se originam nos linfócitos, um dos tipos de células que compõem o grupo dos glóbulos brancos. O termo leucemia “linfocítica” faz referência à natureza das células que ainda não amadureceram por completo e estão nas primeiras etapas da diferenciação celular, enquanto o termo “agudo” sugere que a leucemia pode crescer rapidamente e que tende a piorar se não se submeter a tratamento. Além disso, no caso da LLA os linfócitos ainda não desenvolveram atividade imunológica alguma, o que significa que se vê um bloqueio total na produção de linfócitos normais (HAMERSCHLAK,

2012). Ao contrário, na leucemia linfoblástica crônica (LLC), as células não são tão eficientes quanto os linfócitos normais, porém ainda têm atividade imunológica.

Os outros tipos de câncer que têm relação com os linfócitos se chamam linfomas. A principal diferença entre eles é que as leucemias se desenvolvem principalmente na medula e no sangue, enquanto os linfomas danificam gânglios linfáticos e outros órgãos, embora também possam atingir a medula (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). O INCA, citado por Mila (2014), resume os sintomas da seguinte forma: “Em geral, os sintomas da leucemia decorrem do acúmulo dessas células na medula óssea, prejudicando ou impedindo a produção dos glóbulos vermelhos (causando anemia), dos glóbulos brancos (causando infecções) e das plaquetas (causando hemorragia).”.

Para o tratamento dos cânceres em geral, existem alternativas tradicionais como a remoção cirúrgica, na qual se extrai um órgão (ou parte do órgão) como ocorre no câncer de mama ou de próstata (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Outro método, a quimioterapia, se baseia na administração de um fármaco que deve percorrer o organismo como um todo a fim de diminuir o crescimento celular. A radioterapia, irradiação de altas frequências do espectro eletromagnético, também é um método para evitar o crescimento celular oncológico (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Para o tratamento quimioterápico das leucemias no Brasil, na maioria das vezes são utilizados fármacos como fludarabina, ciclofosfamida, rituximabe, e cloramubucilo (HAMERSCHLAK, 2012), os quais atacam o crescimento celular em células hematológicas. Lamentavelmente, e segundo Hamerschlak (2012), o Sistema Único de Saúde (SUS) não contempla o fornecimento de todos esses fármacos.

Além desses tratamentos tradicionais, existem outras técnicas em desenvolvimento um pouco mais inovadoras, como a inclusão de nanotubos de carbono acoplados ao peptídeo F3, que localiza tecidos com forte produção de nucleolina (característica destacada das células neoplásicas) para serem posteriormente irradiados e destruídos com luz infravermelha (I.V.) sem lesionar as células normais, pois a capacidade de absorção de luz I.V. dos nanotubos é elevada, enquanto as células sem os nanotubos não são afetadas (PRICKETT *et al.*, 2011).

O problema que os tratamentos tradicionais apresentam é a ocorrência de danos colaterais que atingem as células normais. Porém, permanece sua utilização clínica, uma vez

que muitas metodologias alternativas ainda estão sendo estudadas *in vitro*. Por consequência, a aplicação da L-asparaginase como terapia complementar fornece excelentes resultados e seu uso é imprescindível para o tratamento da LLA (DOUER, 2008; MÜLLER; BOOS, 1998; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

A avaliação da atuação da L-asparaginase como fármaco em várias neoplasias e em doenças parasitárias, como leishmaniose (SINGH *et al.*, 2015), tem sido foco de pesquisas recentes. Essa enzima foi administrada em pacientes com doenças como linfoma não-Hodgkin (KOBINSKY *et al.*, 2001), LLC, alguns tipos de leucemia mielóide (WILLEMS *et al.*, 2013) e linfossarcoma (BANSAL *et al.*, 2012). No caso da leucemia mielóide crônica (LMC), a L-asparaginase consegue estimular autofagia nas células neoplásicas além de apoptose (SONG *et al.*, 2015). Em outros experimentos, a L-asparaginase conseguiu reduzir cerca de 70% das amostras de leucemia mielóide aguda (AGRAWAL *et al.*, 2003). Contudo, vários efeitos adversos são observados quando se usa a L-asparaginase nestas doenças. Em geral, se afirma que a causa destes eventos é a atividade glutaminásica secundária exercida por algumas isoformas de L-asparaginase (BATOOL *et al.*, 2016; HOWARD; CARPENTER, 1972; MAHAJAN *et al.*, 2014).

Estudos recentes apontam que a L-glutaminase pode atuar como enzima terapêutica adjuvante da L-asparaginase porque também atua reduzindo a produção de acrilamidas (ELSHAFEI *et al.*, 2014). Além disso, pode ser considerada uma droga com potencial efeito anti-linfoma para doenças como a LMC (GREENBERG; BLUMENTHAL; RAMADAN, 1964). O motivo é que a L-glutaminase, ao hidrolisar o aminoácido L-glutamina e impedir sua conversão a L-asparagina via transaminação, diminui a síntese desse último (EMADI; ZOKAEE; SAUSVILLE, 2014). Willems *et al.* (2013) sugerem que a expressão de glutamina-sintetase de algumas células leucêmicas pode representar um mecanismo de resistência à ação anti-leucêmica da L-asparaginase. Aliás, a diminuição da atividade de glutamina sintetase concomitante à administração de L-asparaginase dispara uma forte apoptose leucêmica, segundo Rotoli *et al.* (2005) citado por Verma (2007). Entretanto, devido aos efeitos tóxicos relacionados à atividade glutaminásica, para o tratamento de células leucêmicas deficientes na síntese de L-asparagina, pode ser preferível a aplicação de L-asparaginase sem atividade de L-glutaminase.

Em virtude da sua importância como fármaco, a procura por outras fontes de L-asparaginase tem sido alvo de muitas pesquisas, com o objetivo de se obter a produção de

enzimas microbianas extracelulares que apresentem menos efeitos adversos. Os fungos filamentosos apresentam uma proximidade evolutiva maior com os seres humanos do que as bactérias e, aparentemente, isso minimiza os efeitos secundários da L-asparaginase fúngica (HUANG *et al.*, 2014) e as respostas imunológicas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2012). Da mesma forma, a L-asparaginase de origem suína não apresentava atividade de glutaminase e, portanto, poderia resultar em diminuição dos danos colaterais (MEISTER *et al.*, 1955)(*apud* EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014). Por exemplo, a L-asparaginase produzida por *A. niger* não causa toxicidade às células humanas normais e sim às células neoplásicas da linhagem RS4 e HL60 (LOUREIRO *et al.*, 2012).

Diante do panorama apresentado, é possível concluir que as leucemias são sensíveis ao esgotamento de aminoácidos que resulta da atividade enzimática da L-asparaginase, ou da atividade secundária glutaminásica. Também é possível inferir que, provavelmente, os resíduos metabólicos da ação glutaminásica são parte importante da origem dos efeitos secundários indesejados.

Dessa maneira, a procura de novas fontes de L-asparaginase e a melhoria da produção são etapas essenciais para fornecer subsídios às pesquisas clínicas, que objetivam encontrar formas mais viáveis da enzima, tanto no sentido do custo do tratamento, quanto da redução dos efeitos colaterais e do aumento da sua resistência ao sistema imunológico (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014; MAHAJAN *et al.*, 2012).

#### **2.4 História e atualidade da luta contra o câncer no Brasil**

A luta contra o câncer no Brasil remonta ao ano de 1907, quando Álvaro Alvim, pioneiro em radioterapia, adquiriu a primeira máquina de raios X no país e a instalou no Rio de Janeiro. Depois de pesquisar e desenvolver muitos tratamentos, a maioria gratuitos, tornou-se o primeiro mártir da radioterapia por causa de má manipulação dos aparelhos e morreu em 1928 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007). Posteriormente, em 10 de abril de 1919, o Instituto de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) começou a trabalhar com brometo de rádio. Similarmente, o Instituto de Rádio em Belo Horizonte/ MG foi inaugurado em 1921 e visitado por Marie Curie em 1926 (FENELON; ALMEIDA, 2001). Esse instituto adquiriu 35,5 mg de rádio em 1921, 400 mg em 1937 e 500 mg em 1945. Hoje, essa instituição conta com três aparelhos de radioterapia profunda, um de radioterapia superficial e um voltado à pesquisa.

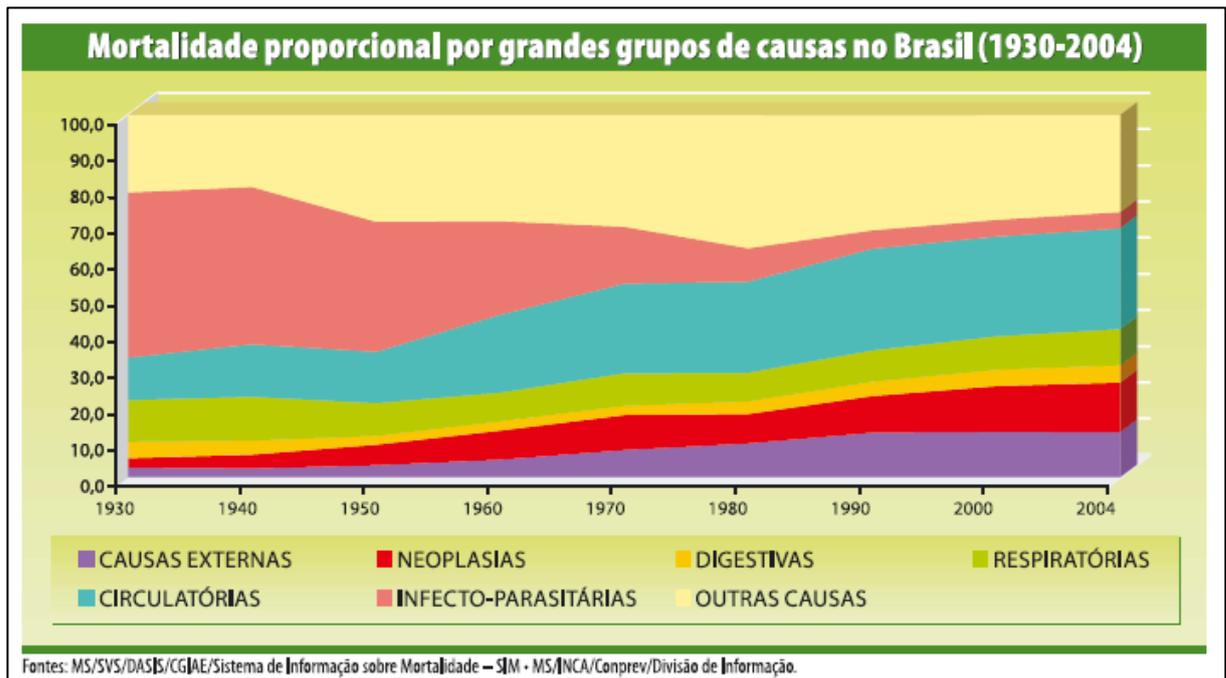
Em 1937, Mario Kroeff, Sérgio Barros e Eduardo Rabello assumiram que o tratamento do câncer deveria ser financiado pelo governo (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006). Em consequência, o presidente Getúlio Vargas assinou o decreto Lei No. 378 e um ano mais tarde foi criado o Centro de Cancerologia, que posteriormente passou a se chamar Instituto Nacional do Câncer (INCA) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2007). O INCA publicou uma resenha resumindo o trabalho feito pelo Ministério da Saúde e os centros de pesquisa até então existentes.

Os projetos contra o câncer começaram a ter impacto nacional em 1941, quando foi criado o Serviço Nacional de Câncer (SNC), destinado a orientar, difundir e controlar a campanha contra o câncer no Brasil, como previa o Decreto-Lei nº 3.643 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006). Todas essas ações foram vistas por organismos internacionais, o que trouxe a decisão da União Internacional de Controle do Câncer (UICC) de organizar no Brasil, em 1954, o 6º Congresso Internacional de Câncer, que ocorreu em São Paulo organizado por um dos integrantes do então diretor do SNC, Antônio Prudente.

No ano de 1957 o presidente Juscelino Kubitschek inaugurou o Hospital-Instituto do INCA, sede central do SNC. Um conjunto de ações políticas posteriores, como o Decreto No. 61.968 de 1967, o Decreto No. 66.623 de 1976 e a Lei Orgânica da Saúde No. 8.080 de 1990, inclui o câncer nos planos nacionais de saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006), que foi denominado Sistema Único de Saúde (SUS) em 1988. Apesar de todo esse histórico, o câncer tornou-se atualmente um problema de saúde pública (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006).

A Figura 5 mostra um resumo histórico das causas de morte no Brasil entre os anos 1930 e 2004. Aqui cabe ressaltar que as neoplasias não foram apenas uma das grandes causas de mortalidade, mas também que nos últimos 74 anos o número de mortes por câncer foi aumentando. Embora os números estejam ligados ao crescimento exponencial da população no último século e, estatisticamente, o quantitativo de pessoas doentes tenha aumentado, pode-se observar que nem todas as doenças mostram esse incremento. Aliás, as doenças infecciosas e parasitárias diminuíram ao longo do tempo, certamente devido às pesquisas e ao desenvolvimento de antibióticos e afins pela indústria farmacêutica.

Figura 5 – Mortalidade no Brasil entre os anos 1930 e 2004



Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2006)

As leucemias estão entre as principais doenças no Brasil. Na Tabela 1 está resumida a informação acerca dos casos diagnosticados no país em 2012 segundo as regiões. Aqui, excluindo o câncer de pele, Hamerschlak descreve a posição que tem as leucemias para cada região separadas por gênero. Nesse ano foram relatados 8510 pacientes com este tipo de doenças, sendo 4.570 homens e 3.940 mulheres, significando em média, 5 casos por cada 100.000 habitantes (homens) e 4 por cada 100.000 mulheres (HAMERSCHLAK, 2012). Contudo, a situação está piorando. Para o ano 2016-2017 se estima que 5.530 homens e 4.530 mulheres sejam diagnosticados com leucemias, o que aumenta a proporção para 5,63 casos por cada 100.000 homens e 4,38 por cada 100.000 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2015).

Todavia, os tratamentos disponíveis no país atingem um índice de cura de 70% das crianças e 50% dos adultos com os tratamentos disponíveis desde 2012. Flávio Luisi, que foi diretor clínico do Grupo de Apoio ao Adolescente e à Criança com Câncer (GRAAC) em 2014, ressaltou a importância do uso terapêutico da L-asparaginase, ao afirmar que “o medicamento é imprescindível. A gente não tem substituto para esse remédio. Ou você dá L-Asparaginase ou você dá L-Asparaginase, seja ela em que forma for. Não poder curar a criança por falta de um medicamento é uma situação desesperadora.” (MILA, 2014).

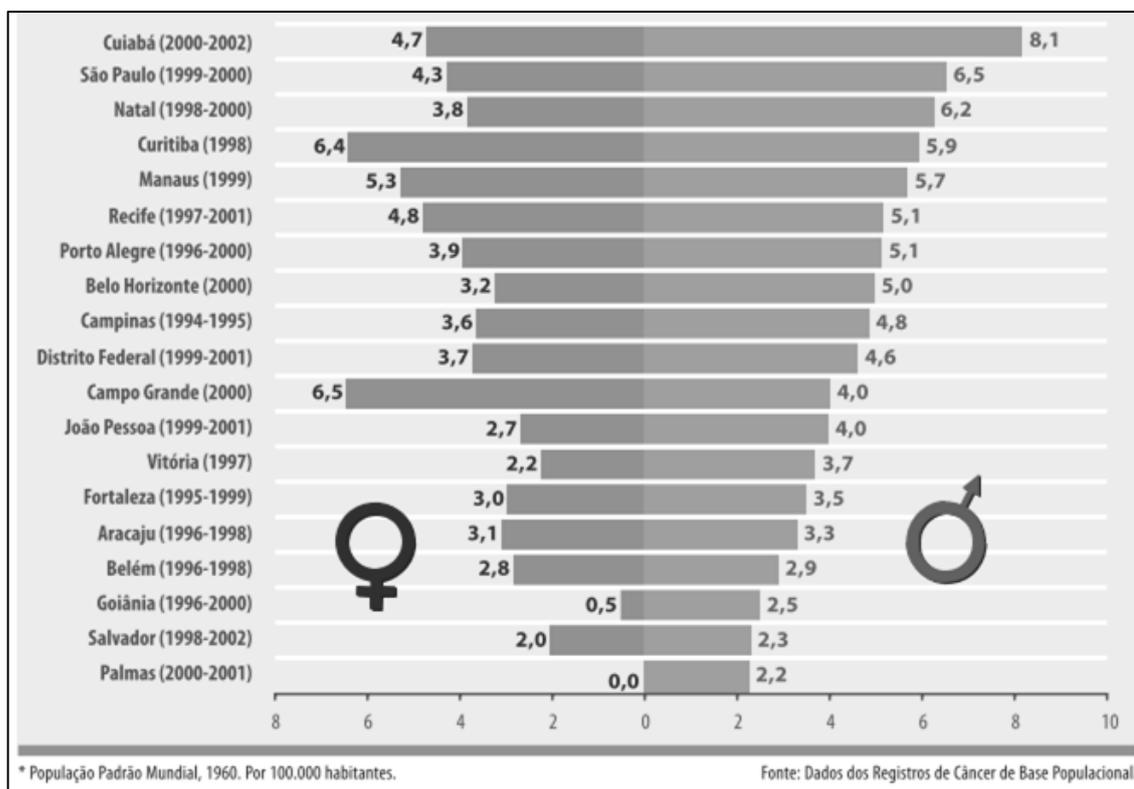
**Tabela 1 - Frequência de leucemias no Brasil no ano 2012 separados por região e por gênero**  
Frequência das leucemias no Brasil (2012)

Região	Homens		Mulheres	
	Posição	casos / 100 mil habitantes	Posição	casos / 100 mil habitantes
Norte	5	3	7	3
C. Oeste	10	5	10	3
Sudeste	11	5	12	4
Sul	11	6	13	5
Nordeste	8	4	10	4

Fonte: próprio autor baseado nos dados de HAMERSCHLAK (2012).

Os últimos anos não trouxeram os melhores índices quanto ao tratamento das leucemias infantis. Na Figura 6 é possível observar que houve um aumento dos casos de leucemia em pacientes menores de cinco anos em todos os estados. Por exemplo, em cidades como São Paulo ou Natal, de cada 100.000 habitantes, aproximadamente 6 crianças masculinas e 4 femininas padecem algum tipo de leucemia. O maior aumento dessas doenças foi de 45% (Manaus) e 15% (Belo Horizonte) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006).

**Figura 6 - Distribuição das taxas de incidência de leucemias infantis**



Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (2006).

Além da morbidade do câncer, um fator importante e, mais crítico, é a sua mortalidade na população brasileira. Como visto na Figura 7, os índices de mortalidade entre 0 e 19 anos oscilam de 9 a 18 mortes por cada 100.000 habitantes no território nacional. A taxa total de morte para este tipo de doença resultou em um total de 14,94 óbitos por cada cem mil habitantes entre 2009 e 2013.

**Figura 7 - Taxa de mortalidade por leucemias no Brasil em crianças entre os anos 2009 e 2013**

Brasil e Regiões	Faixa etária	Sexo	Brasil	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
Taxas específicas	0	Total	11,52	12,92	12,96	11,84	10,83	10,70
		Masculino	9,74	11,44	11,38	3,58	9,33	11,06
		Feminino	13,37	14,46	14,59	20,38	12,37	10,33
	1-4	Total	16,09	21,17	16,68	18,60	14,79	16,24
		Masculino	17,55	24,64	18,82	17,81	15,98	16,89
		Feminino	14,57	17,58	14,47	19,41	13,56	15,57
	5-9	Total	14,42	18,33	14,30	15,51	13,92	14,71
		Masculino	17,86	24,05	17,50	21,94	16,78	17,27
		Feminino	10,86	12,38	10,98	8,80	10,95	12,04
	10-14	Total	14,55	16,94	12,94	14,60	14,44	15,47
		Masculino	16,14	17,89	14,50	18,10	16,06	16,38
		Feminino	12,90	15,97	11,33	10,98	12,77	14,53
	15-19	Total	15,58	15,19	13,97	17,67	15,55	17,83
		Masculino	18,84	18,41	16,21	19,60	19,09	23,36
		Feminino	12,24	11,92	11,70	15,73	11,95	12,15
Taxas por milhão	Bruta	Total	14,94	17,48	14,22	16,25	14,52	15,88
		Masculino	17,25	20,56	16,33	18,71	16,74	18,40
		Feminino	12,55	14,30	12,05	13,71	12,23	13,28
	*Ajustada	Total	14,94	17,67	14,41	16,31	14,43	15,71
		Masculino	17,13	20,78	16,49	18,46	16,50	17,98
		Feminino	12,67	14,46	12,27	14,09	12,30	13,37

\*População Padrão Mundial, modificada por Doll et al. (1966).  
 Fontes: Ministério da Saúde / SVS / CGIAE / SIM  
 INCA / Conprev / DVAS  
 IBGE

Fonte: DE CAMARGO *et al.* (2016), Tabela 203.

Agravando esse cenário, em 2014 se estabeleceu uma crise pela falta de L-asparaginase no Brasil, em decorrência da descontinuação da importação dessa enzima, considerada um medicamento fundamental no tratamento da LLA (SOBOPE, 2014), pelo Laboratório Bagó®. O custo de abastecimento para o país foi de R\$17,6 milhões por 52,3 mil frascos adquiridos nesse mesmo ano (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2014). Isso significa que embora o país esteja tomando medidas para a aquisição do medicamento, é preciso levar em consideração a clara necessidade de se tornar um produtor na América. Uma parceria entre a FIOCRUZ e os laboratórios privados NT Pharma e United Biotec, com

subsídio do Ministério da Saúde, tem como objetivo estabelecer essa inovação na indústria enzimática e biotecnológica no Brasil. Normalmente, os medicamentos biológicos custam para o Ministério da Saúde um montante de R\$ 4 bilhões por ano, o que representa 43% do seu orçamento anual (AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS, 2014).

Aparentemente, segundo o INCA, as razões políticas estão entre as causas do desabastecimento. Similarmente ao que ocorreu nos Estados Unidos, uma suposta restrição ou falta do medicamento implica em pouca oferta, ao passo que a demanda ainda se mantém, ou melhor, aumenta. Por consequência, o preço desse medicamento aumenta absurdamente. Em conclusão, um problema político-econômico interfere nos recursos de saúde pública, pois, em decorrência do custo, finalmente o Estado decide que não é viável fornecer esse tratamento (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2012). Cláudio Galvão, presidente da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE), informou a falta do medicamento por quase 10 meses, de julho de 2010 a abril de 2011.

## **2.5 Desafios e perspectivas do uso de L-asparaginase**

A partir do referencial histórico do descobrimento e da produção de L-asparaginase, é evidente que muitos desafios permanecem, incluindo a busca por novas enzimas com menos potencial imunogênico, menos efeitos colaterais, maior tempo de meia-vida, atividade mais eficiente e menor custo.

Nos estudos de Dinndorf *et al.* (2007), Asselin *et al.* (1993) e Muller (1998); citados por Fernandez (2014), se relata que o tempo de meia-vida das três formas comerciais de L-asparaginase são de 1 semana, 1,3 dias e de 0,65 dias para Oncaspar<sup>®</sup>, Elspar<sup>®</sup>, e Erwinase<sup>®</sup>, formulados respectivamente com a L-asparaginase de *E. coli* conjugada com PEG, a forma nativa da enzima de *E. coli* e a forma nativa da enzima de *Erwinia sp.* Esse estudo demonstra que a conjugação da L-asparaginase com PEG resulta na formação de um complexo com meia vida aumentada, porém, sua eficiência não é a mesma da enzima nativa (HAK *et al.*, 2004).

Os experimentos de Riccardi *et al.*, conseguiram demonstrar que 0,1 U/mL no plasma sanguíneo é a quantidade mínima de enzima necessária para eliminar por completo os níveis de L-asparagina do líquido cefalorraquidiano (RICCARDI *et al.*, 1981). Outros pesquisadores afirmam que os níveis de L-asparaginase devem ser mantidos em cerca de 0,5

U/mL para reduzir os níveis de L-asparagina abaixo dos limites de detecção (TSURUSAWA *et al.*, 2004).

A química e a engenharia se integram à biotecnologia nesse panorama da busca pela melhoria das formulações de L-asparaginase. Existem estudos no sentido de desenvolver alternativas para evitar efeitos secundários por parte das enzimas de origem procarionte. Também se está trabalhando na produção de enzimas de origem eucarionte. Uma vez que a extração da enzima de origem animal é complicada (SAVITRI; ASTHANA; AZMI, 2003), os micro-organismos tornaram-se a fonte de L-asparaginase mais atrativa, porém, apesar do potencial biotecnológico microbiano comparado às fontes animais, a produção desta enzima não é suficiente para abastecer a demanda farmacêutica atual nem as demais aplicações industriais (MAHAJAN *et al.*, 2013). Somando a esse cenário, a produção em escala industrial torna-se um desafio ainda maior porque o mercado, embora globalizado, está restrito a poucos produtores como ONCASPAR®, ERWINASE®, e KIDROLASE® (VERMA *et al.*, 2007).

Muitas vezes, os processos produtivos não são eficientemente melhorados não apenas pelo erro na escolha das variáveis, mas por obstáculos ignorados ou problemas não resolvidos. Muitos processos biotecnológicos com fungos são gerados desconhecendo-se a fisiologia e o crescimento dos micélios. Por vezes, o emaranhado das hifas em processos aeróbios limita a transferência de oxigênio ao interior da célula. O próprio oxigênio tem uma solubilidade limitada (7,52 mg.L<sup>-1</sup> a 55 °C) (DORAN, 1995) e essa solubilidade é diminuída na presença de mais compostos e macromoléculas presentes no meio de cultura. Segundo Gibbs *et al.* (2000), a morfologia da cultura é crítica para culturas submersas e inclusive para fermentações contínuas, pois está fortemente vinculada à viscosidade do meio, variável que também vai interferir com a transferência de massa, embora seja possível a adição de surfactantes para controlar este fenômeno.

No campo da indústria de alimentos ainda há necessidade de muita informação científica e da condução de pesquisas, a fim de se encontrar, por exemplo, uma L-asparaginase termo-resistente, já que nos processos que levam à produção da acrilamida a temperatura pode alcançar até 120 °C (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). As pesquisas atuais não avaliaram a atividade enzimática da L-asparaginase em elevada temperatura e, por consequência, a enzima é adicionada ao final dos processos culinários descritos anteriormente.

Assim como as enzimas termo-resistentes, as que permanecem ativas quando submetidas a temperaturas negativas são de grande interesse comercial, pois o processo de liofilização é fundamental no processo de purificação. Por exemplo, Mesas, Gil e Margín (1990) relatam que a L-asparaginase extraída de *Corynebacterium glutamicum* mantém sua atividade quando congelada a -80 °C, porém é inativada em 50% depois de cinco dias, se mantida a 4°C.

Finalmente, a L-asparaginase foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como essencial dentro da lista dos medicamentos mais importantes (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), o que sugere que qualquer país deve manter um estoque desse medicamento e que provavelmente deve se incluir nos serviços e orçamento de saúde pública. Em dezembro de 2012, ELSPAR ® deixou de ser disponível nos Estados Unidos (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016). Quando potências mundiais enfrentam crise de abastecimento de um produto essencial, se abrem perspectivas e oportunidades. Esta é uma grande oportunidade para o Brasil entrar no mercado farmacêutico aproveitando sua vasta biodiversidade.

## **2.6 Os fungos, sua nutrição e estado da arte no cultivo biotecnológico**

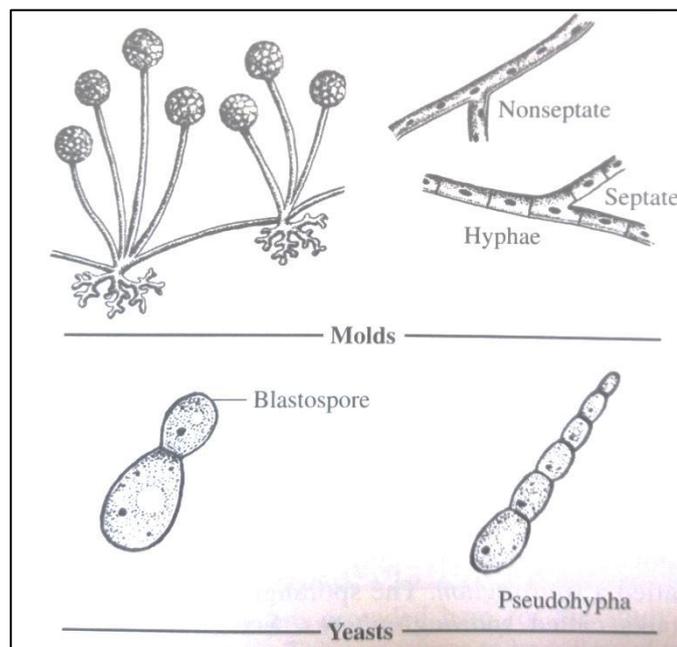
É chamado de fungo qualquer organismo que seja eucarionte, não fotossintético, *i.e.* heterótrofo, que possua parede celular de quitina ou outro polissacarídeo, e que possa propagar seu material genético com esporos (BROWN, 2007). Os fungos podem extrair energia da molécula de glicose pela via glicolítica, em condições aeróbias ou anaeróbias (RIBEIRO; STELATO, 2011). Diversos outros carboidratos e substratos podem ser hidrolisados e oxidados para a extração de energia e obtenção de carbono.

A micologia, ciência que estuda os fungos, separa-os em dois tipos segundo sua estrutura celular. Fungos unicelulares são chamados de leveduras e os demais são chamados de fungos filamentosos. Leveduras podem se reproduzir por divisão celular simples ou por brotamento e, quando os brotos não se separam da célula mãe, passam a formar estruturas alongadas, também conhecidas como pseudo-hifas (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001). Esporos assexuais que saem da célula parental, porém menores, são denominados blastóforos (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001) e quando permanecem aderidos resultam na formação de pseudo-hifa (FIG. 8).

Os fungos filamentosos são micro-organismos que crescem de maneira apical, ou seja, através da extensão dos ápices de filamentos tubulares denominados hifas. O emaranhado de hifas que compõe o crescimento vegetativo pode crescer de modo tão contínuo que se torna macroscopicamente visível. Esse emaranhado é denominado micélio.

Há fungos cujas hifas apresentam septos intercalares, os quais separam compartimentos individuais contendo núcleo e demais organelas, ao passo que fungos pertencentes aos grupos taxonômicos mais antigos são asseptados (FIG. 8) (RIBEIRO; STELATO, 2011). Embora os fungos filamentosos sejam considerados seres pluricelulares, a migração de organelas e a troca de material citoplasmático que ocorre através dos poros dos septos impedem a definição de seus compartimentos como células individuais (LOGUERCIO-LEITE *et al.*, 2006; RIBEIRO; STELATO, 2011).

**Figura 8 - Fungos filamentosos e leveduras**



Fonte: (BROWN, 2007).

Superior: *Molds*, Fungos filamentosos. Inferior: *Yeasts*, Leveduras.

Mesmo que as leveduras e os fungos filamentosos sejam estruturalmente diferentes, existem espécies de fungos que apresentam um fenômeno chamado dimorfismo. O dimorfismo é a característica de crescimento que pode alternar-se entre as formas leveduriforme e filamentosa em condições diferentes. Por exemplo, *Paracoccidioides brasiliensis*, descoberto no Brasil em 1908, se comporta como fungo filamentosos a 25 °C e

como levedura a 37 °C (RIBEIRO; STELATO, 2011). O dimorfismo é um fenômeno característico de diversos fungos patogênicos.

O comportamento celular do fungo é parte da informação fundamental que precisa ser considerada na elaboração dos meios de cultura em escala industrial. No exterior da célula, em meio aquoso, quem governa a transferência de massa é a reologia influenciada pela presença de *pellets* e micélios. Para entender o comportamento reológico da cultura, é preciso conhecer a fisiologia e tipo de crescimento do micro-organismo cultivado. Como os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* possuem numerosas aplicações industriais, não é surpreendente que estejam entre os fungos melhor estudados e caracterizados. Contudo, há que se observar que o conhecimento de alguns gêneros ou mesmo de espécies relacionadas não é suficiente para prever o comportamento geral dos milhões de fungos filamentosos que as estimativas apontam (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000).

Globalmente, o cultivo industrial de fungos é usado principalmente para a produção de penicilinas e cefalosporinas (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Mas, a biotecnologia fúngica não se esgota em suas aplicações para a produção de antibióticos. Os fungos são estudados e aplicados em processos que vão desde a produção de biocombustíveis por fungos filamentosos que produzem etanol, amilases e outras enzimas industriais (DA SILVA, 2011), corantes (DUFOSSE *et al.*, 2014), antioxidantes naturais (SMITH; DOYLE; MURPHY, 2015) até a remediação de mercúrio em solos (KURNIATI *et al.*, 2014). Além dos antibióticos, diversos fármacos importantes como hipolipemiantes e imunossupressores são de origem fúngica, bem como uma série de insumos, dentre eles vitaminas e ácidos orgânicos. Em conclusão, os fungos filamentosos contribuem substancialmente à economia global.

Diante da riqueza do metabolismo fúngico e da diversidade de proteínas e metabólitos que produzem e/ou secretam, o processo produtivo com fungos filamentosos requer conhecimento acerca de sua fisiologia e aspectos nutricionais, como base para a elaboração de meios que permitam o direcionamento do metabolismo para o acúmulo de um produto em particular. A chave para o êxito de um processo produtivo consiste na correta elaboração dos meios e demais condições de cultivo, a fim de balancear o crescimento, sem que haja detrimento da produção.

Os vários relatos na literatura que tratam da produção de L-asparaginase por fungos filamentosos abordam diversas variáveis que influenciam o melhoramento da atividade enzimática. Algumas delas são a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio, a temperatura do meio, o tempo de incubação, o pH do meio, a agitação e a aeração artificial. A maioria dos relatos se limita a avaliar apenas as fontes de carbono e o pH. Sarquis *et al.* (2004) observaram uma atividade enzimática de  $0,058 \text{ U.mL}^{-1}$  produzida por *A. terreus* quando o meio de cultura era suplementado com 2% de prolina,  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glicose e  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de L-asparagina como substrato indutor.

Shrivastava (2012) relatou a produção de atividade de L-asparaginase de 20 U/mL por *Penicillium digitatum* cultivado em meio contendo  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de L-asparagina como fonte de nitrogênio e pH 7. Patro *et al.* (2011) relataram que frutose era melhor utilizada por *Aspergillus flavus* do que outros sacarídeos adicionados ao meio de cultura como fonte de carbono e que xantina e ácido glutâmico foram melhores fontes de nitrogênio do que extrato de levedura, prolina, triptofano e outros aminoácidos para a produção de L-asparaginase. Após isolar a enzima de *A. flavus*, os autores relataram que a atividade de L-asparaginase atingiu  $10 \text{ U.mg}^{-1}$ . Shanthipriya (2015) publicou um estudo no qual três fungos filamentosos produziram atividade enzimática entre 40 e 70 U/mL após 8 dias de cultivo em meio suplementado com  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de asparagina e de glicose, em pH 6 a 8.

Não existe maneira teórica de conhecer a composição correta do meio de cultura ideal para cada micro-organismo (EL-NAGGA; EL-EWASY; EL-SHWEIHY, 2014). Contudo, existem parâmetros que podem ser seguidos e componentes mínimos que devem ser utilizados na formulação dos meios de cultivo e produção (BROWN, 2007). A seleção de nutrientes, bem como sua concentração, é um trabalho que, apesar de contar com dados de referência na literatura os quais podem servir como ponto de partida, depende de estudos dedicados a cada nova linhagem produtora.

A maioria dos fungos filamentosos são aeróbios ou anaeróbios facultativos e também mesófilos (SAID; PIETRO, 2010), *i.e.*, apresentam intervalo de temperatura ideal para o crescimento entre 25 e 30 °C (RIBEIRO; STELATO, 2011). Quando cultivados em meio sólido, tendem a crescer de maneira radial formando círculos ou discos de micélio. Quando cultivados em meio líquido em cultura submersa, tendem a gerar pequenos agregados de micélio denominados *pellets*.

Os fungos são organismos heterótrofos e, por isso, o meio de cultivo deve conter uma fonte de carbono orgânica. Devido ao papel decompositor que os fungos exercem nos ecossistemas (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), nos ciclos do carbono e nitrogênio, é natural inferir que seus genomas estejam repletos de genes codificadores de enzimas que atuam sobre uma variada gama de substratos complexos, o que, de fato, é realidade. Esses micro-organismos são capazes de converter biomassas poliméricas constituídas de carboidratos, como pectinas, amido, celuloses e hemiceluloses, dentre outros, convertendo-os a produtos de baixa massa molecular, que absorvem em seu processo nutricional (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Há fungos, como os basidiomicetos, popularmente conhecidos como cogumelos, que são extremamente eficientes para a decomposição da estrutura recalcitrante da madeira, os quais desenvolvem papel primordial nos ecossistemas em florestas (BIANCHINI, 2011; MADIGAN, 2010). Sua versatilidade bioquímica encoraja a busca por fontes alternativas de substratos biotecnológicos entre resíduos e co-produtos, a um custo menor. Em conclusão, variados carboidratos, de alto ou baixo peso molecular, além de muitas outras biomoléculas podem ser utilizadas pelos fungos como fontes de carbono, enquanto que as mesmas enzimas que expressam também apresentam por vezes numerosas aplicações e elevado valor.

O nitrogênio é outro nutriente extremamente importante para o crescimento dos fungos, uma vez que é constituinte dos aminoácidos, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas nitrogenadas. Os fungos filamentosos são capazes de degradar moléculas orgânicas nitrogenadas como aminoácidos e vitaminas para obter nitrogênio e usá-lo na produção de ácidos nucleicos e proteínas (BROWN, 2007). Entretanto, os fungos possuem vias metabólicas para a assimilação de nitrogênio inorgânico, incluindo nitratos, nitritos e amônio, bem como formas mais simples de nitrogênio orgânico, como a ureia.

Metais e outros minerais são também compostos essenciais, pois são cofatores de reações enzimáticas e parte de muitas moléculas como citocromos, ATP, e compostos organometálicos. Portanto, potássio, sódio, magnésio, ferro, zinco, cálcio e fósforo (entre outros) são necessários ao crescimento.

As células são compostas por 70% de água, o que equivale a dizer que a água é o solvente do meio biológico, no qual ocorrem as reações enzimáticas. Além disso, o transporte de íons e compostos através da membrana só ocorre na sua presença (BROWN, 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A preparação de meios quimicamente definidos ocorre

preferencialmente com o uso de água destilada, pois a composição da água de torneira pode variar e, inclusive, conter compostos que podem interferir no metabolismo e no crescimento. Além da variação natural que pode ocorrer no teor de impurezas, a localização geográfica altera a composição da água de torneira, dificultando a padronização de processos extrapoláveis para várias regiões.

Não apenas os nutrientes disponíveis no meio, mas, também a faixa de pH e a temperatura alteram o crescimento fúngico, bem como seu metabolismo e morfologia, constituindo-se importantes variáveis em um processo produtivo.

O meio de cultivo é um dos quatro pontos fundamentais de um processo biotecnológico, sendo os demais, a própria linhagem produtora, a forma de condução do bioprocessamento e as operações unitárias para recuperação do produto. Diante das considerações acerca da versatilidade de substratos de carbono, nitrogênio, fosfatos e outros nutrientes que os fungos são capazes de utilizar, bem como dos intervalos de pH e temperatura nos quais crescem e produzem, torna-se evidente a complexidade da elaboração de meios e condições destinados a promover seu crescimento controlado, tendo em vista uma tal interferência nos processos metabólicos que resulte em acúmulo de um produto desejado.

Assim, para a elaboração de novos processos produtivos os estudos tradicionalmente realizam a seleção de variáveis que interferem positivamente para o acúmulo do produto, seja através dos métodos convencionais de análise univariada, ou pelo emprego de métodos de estatística multivariada. Entretanto, ambos os procedimentos convergem para a busca das melhores condições de cultivo, nas quais a produção seja máxima, preferencialmente mais rápida e com menor custo.

## **2.7 Estatística multivariada**

Tradicionalmente, os métodos de investigação para a busca das melhores condições de um processo produtivo, pela determinação da melhor combinação dos valores das variáveis envolvidas, utilizam a análise univariada. Nesse tipo de abordagem, a resposta de interesse do processo, que pode ser a concentração de um determinado produto, é medida em função da variação de um único fator, enquanto que os demais fatores permanecem constantes, sob valores fixos. Ao se determinar o valor do fator estudado que resulta em máxima resposta, esse é selecionado para os experimentos seguintes, nos quais é mantido,

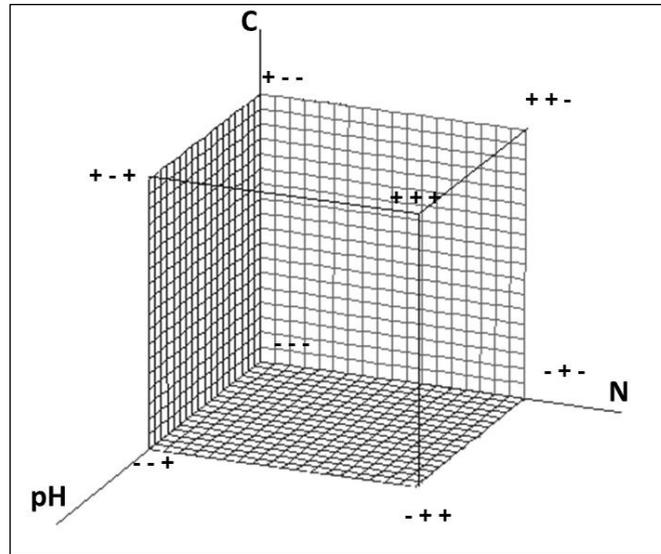
enquanto que novo fator passa a ser variado. Assim, progressivamente, os melhores níveis de cada fator são encontrados e utilizados para compor as condições do processo final.

No caso da análise univariada, portanto, a melhor combinação de valores é obtida depois de conferir, por exemplo, qual o melhor substrato em um experimento, assim como sua concentração em outro, a melhor temperatura em um terceiro, o melhor tempo de incubação em um quarto e daí por diante. Entretanto, a desvantagem principal dessa abordagem, para além do número elevado de experimentos e do tempo demandado até o ajuste, consiste em que não são verificados os efeitos entre as variáveis, ou seja, suas interações que interferem positiva ou negativamente na resposta desejada, pois cada variável é observada individualmente e não como um conjunto de fatores interdependentes.

A estatística multivariada é uma ferramenta poderosa que não mede apenas a influência de cada variável de entrada (fator) na variável de saída (resposta). Mede também as interações entre as variáveis e permite avaliar a sua significância. Nos experimentos multivariados, são aplicados “níveis” de valores para cada fator investigado, que vão de um mínimo a um máximo, sendo a combinação de níveis de cada fator utilizada para gerar um planejamento fatorial de experimentos nos quais uma variável é estudada segundo o comportamento de outras que são investigadas ao mesmo tempo. Como resultado, a estatística multivariada economiza uma grande quantidade de tempo, permitindo chegar à condição de ajuste mais rapidamente (MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013).

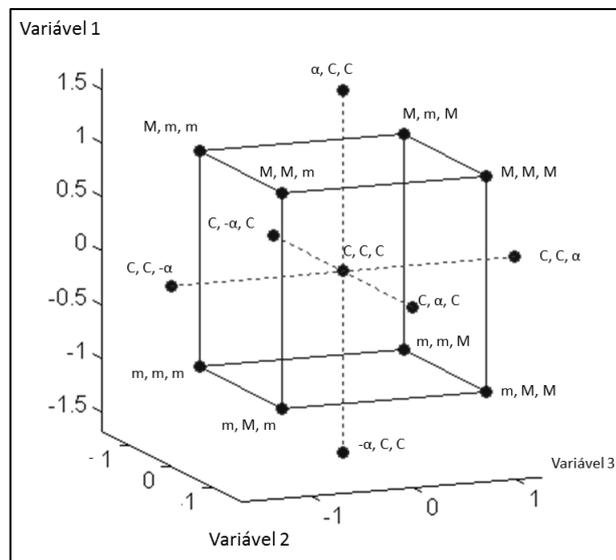
O termo planejamento fatorial vem da multiplicação do número de variáveis independentes, ou fatores, e do número de níveis de cada variável. Nos planejamentos fatoriais, os valores das variáveis de entrada vão comumente de um nível menor, designado com a simbologia (-) ou (-1), a um nível maior, designado (+) ou (+1). Existe uma relação geométrica presente nos planejamentos fatoriais. A combinação, por exemplo, de três variáveis com dois níveis cada uma, daria um total de  $2^3$  experimentos, equivalente ao número de vértices de um cubo, ou seja oito, que são ilustrados na Figura 9. O resultado de um planejamento fatorial é um diagrama de quantificação da influência de cada variável de entrada e das suas interações em relação à variável de saída. Dessa maneira, pode-se conhecer quais variáveis têm um impacto positivo ou negativo e qual é a intensidade desse impacto. Por isso, os planejamentos fatoriais permitem selecionar as variáveis que efetivamente possuem significância e devem ser consideradas para a melhoria do processo.

**Figura 9 - Exemplo de planejamento fatorial genérico com três variáveis: pH, concentração de carbono e concentração de nitrogênio**



Fonte: próprio autor. C, concentração da fonte de carbono; N, concentração da fonte de nitrogênio. Os sinais +/- representam o nível de cada variável. O processo correspondente ao vértice (-/-/+) contém o nível baixo de C e N e o nível alto de pH.

**Figura 10 - Diagrama de um desenho composto central genérico**



Fonte: próprio autor. As letras m, M e C representam o ponto mínimo, máximo e central de cada variável. O valor  $\pm \alpha$  é o valor axial. O ponto  $CC\alpha$  é o ponto central para as variáveis 1 e 2, e o ponto axial superior para a variável 3.

Um desenho composto central (DCC) é outra ferramenta útil para a melhoria de processos, cujo objetivo é gerar um modelo de otimização de variáveis, ou seja, aquele em que se encontra a melhor combinação de valores das variáveis de entrada para gerar a máxima resposta da variável de saída. Nesse tipo de experimento, cada variável de entrada é avaliada

em cinco pontos: os dois limites do intervalo (- e +), um ponto central (C ou 0), também denominado de ponto médio, e mais dois extremos axiais. Os valores axiais são determinados através da constante de rotatabilidade ( $\alpha$ ), que descontada do limite inferior (-) e acrescida ao limite superior (+), gera os extremos de valores que permitem expandir a análise para além da superfície da figura geométrica gerada no planejamento fatorial. O valor  $\alpha$  é uma função do número de tratamentos e do número de variáveis. Quando três variáveis são investigadas em um DCC, o diagrama torna-se similar a um cubo estendido, como ilustrado na Figura 10.

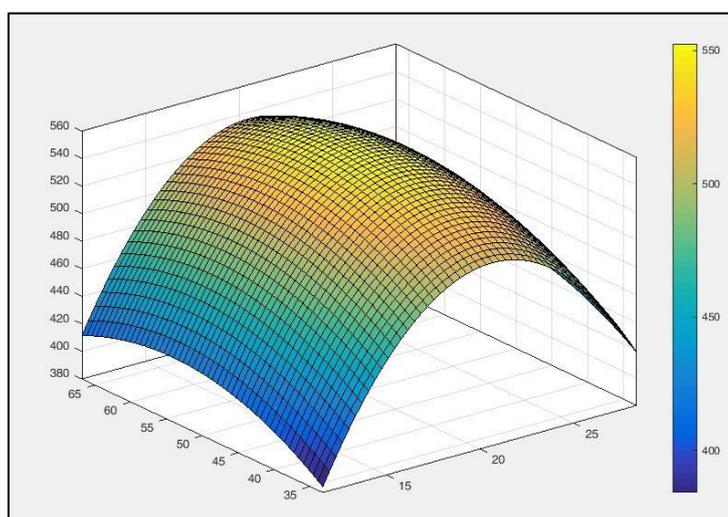
Assim como o resultado de um planejamento fatorial é um relatório dos impactos das variáveis, um dos resultados mais úteis de um DCC é um modelo matemático de segunda ordem e preditivo. Além de descrever matematicamente o comportamento entre variáveis de maneira que a magnitude de uma resposta ( $W$ ) possa ser prevista em função dos níveis aplicados para as variáveis de entrada, ou seja,  $W = f(x, y, z)$ , esse modelo também sugere a melhor combinação das variáveis para obter um resultado otimizado da variável de saída. É preciso enfatizar que a “otimização” de um processo nem sempre significa a busca pela resposta máxima da variável de saída, pois é possível que o objetivo de determinados experimentos seja minimizar a resposta, ou seja, quando ( $W$ ) corresponda, por exemplo, à concentração de um príon, de uma toxina indesejável, de um inibidor do processo produtivo, ou de um produto secundário que compete com o produto principal. Dessa maneira, uma série de cálculos estatísticos é feita com o único objetivo de gerar um modelo matemático quadrático, como descrito na Equação (1).

$$W = \beta_0 + \sum_{i=0}^n \beta_i x_i + \sum_{i=0}^n \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{\substack{i=0 \\ j=0}}^n \beta_{ij} x_{ij} \quad (1)$$

Onde  $W$  é a variável de saída,  $\beta_0$  é o termo constante;  $\beta_i$  são os coeficientes lineares de cada variável independente;  $\beta_{ii}$  os coeficientes quadráticos de cada variável independente;  $\beta_{ij}$  os coeficientes da interação de cada duas variáveis; e  $x_i$  e  $x_{ij}$  são, respectivamente, as variáveis lineares e a interação como produto de cada duas dessas variáveis.

Outro resultado importante do DCC é um denominado diagrama de superfícies. Este gráfico tem a estrutura de um parabolóide hiperbólico (devido a sua natureza multivariável) tonificado ou colorido com superfícies de diferentes níveis que representam como os intervalos das variáveis de entrada vão alterando o valor da variável de saída. A interpretação permite observar qual é a faixa de valores de cada fator/variável de entrada que resulta e mantém uma condição particular da variável de saída, o que se denomina robustez do processo. A Figura 11 é um exemplo de superfície onde as três variáveis independentes representam uma curva cujas cores representam os intervalos de resposta para a variável de saída.

**Figura 11– Superfície de nível para três variáveis de entrada.**



Fonte: <https://www.mathworks.com/matlabcentral/answers/278789-drawing-contour-under-a-fitted-surface-curve-in-matlab?requestedDomain=www.mathworks.com>

Assim, os planejamentos fatoriais permitem conhecer os efeitos positivos ou negativos de variáveis de entrada, bem como de suas interações, sobre uma ou mais respostas de interesse, a fim de selecionar as variáveis que devem ser consideradas para o melhoramento de um processo. Nesse sentido, compõem uma etapa anterior aos DCC, nos quais as variáveis selecionadas são estudadas através da metodologia de superfície de resposta, permitindo encontrar a melhor combinação de valores e ajustar o processo, ou seja, otimizá-lo, bem como construir um modelo matemático preditivo do comportamento de tal processo em vista das variáveis estudadas. A união dessas duas metodologias é um avanço considerável aos métodos tradicionais univariados de ajuste.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Apontar variáveis com efeitos significativos para a produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3 e melhorar o processo produtivo.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar e avaliar estatisticamente o efeito das variáveis concentração de glicerol, de L-asparagina e do pH sobre a produção biotecnológica de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3;
- ✓ Selecionar as variáveis de interesse para compor um desenho composto central rotacional (DCC) e otimizar a produção de L-asparaginase fúngica;
- ✓ Elaborar um modelo matemático preditivo da produção de L-asparaginase e analisar sua validade experimental.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Linhagem produtora e manutenção

A linhagem *Penicillium sp.*T8.3 pertence ao estoque de linhagens do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Fungos Filamentosos. A linhagem T8.3 (SILVA, 2011) foi cultivada em ágar Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004) durante 7 dias a 30 °C e, após formação do micélio maduro e esporulado, as culturas foram conservadas a  $6 \pm 4$  °C. Repiques periódicos foram preparados a cada 4-6 meses para manutenção e semanalmente para os experimentos (FIG.12). A manutenção por períodos maiores foi realizada pela imersão de blocos de micélio maduro em água destilada estéril contida em micro-tubos (CASTELLANI, 1964) e armazenando-se a  $6 \pm 4$  °C. Estudos anteriores mostraram que a linhagem T8.3 foi capaz de expressar atividade de L-asparaginase durante procedimento de triagem (BACELAR, 2016). Embora a atividade produzida em meio líquido tenha sido menor do que a de outras linhagens estudadas (BACELAR *et al.*, 2016), o crescimento confluyente e a abundante produção de conídios pela linhagem T8.3 são características importantes para o desenvolvimento de processos produtivos, justificando sua escolha no presente trabalho.

**Figura 12 - Linhagem T8.3 após cultivo de 72 horas em meio Czapek-Dox a 30°C.**



Fonte: próprio autor

### 4.2 Produção de inóculo

Os fungos são capazes de formar estruturas reprodutivas e esporos, através dos quais se propagam. Tais esporos, sejam oriundos da reprodução sexual ou assexual, podem ser utilizados para inocular meios de cultivo e produção.

O gênero *Penicillium*, assim como outros gêneros de fungos conhecidos, é capaz de se reproduzir assexuadamente pela formação de conidióforos e conídios. A produção de conídios da maioria dos fungos filamentosos ocorre em maior intensidade após sete dias em incubação a 30 °C (CHOW; TING, 2015; ELSHAFEI *et al.*, 2012; SARQUIS *et al.*, 2004). O tempo e a temperatura podem variar entre as espécies, assim como o meio de cultivo, de modo que, uma etapa importante na elaboração de processos produtivos é determinar o tipo de inóculo mais conveniente, bem como as condições ideais para sua produção. Em estudos prévios verificou-se que a linhagem T8.3 apresenta formação abundante de conídios cultivada em ágar Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004) durante 7 dias a 30 °C.

A linhagem T8.3 foi cultivada nas condições acima descritas e, após crescimento confluyente da colônia, os conídios foram coletados em água destilada estéril (SHANTHIPRIYA *et al.*, 2015). Para padronizar a quantidade de conídios inoculados nos meios produtivos, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, após preparo serial das diluições necessárias 1:10 e 1:100, conforme cálculos exemplificados no Apêndice A1. Os conídios coletados foram inoculados nos meios produtivos (descritos posteriormente) a uma concentração  $10^5$  conídios  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>. Os volumes de inóculo variaram entre 50 e 200  $\mu$ L adicionados a um volume de meio de 60 mL.

### **4.3 Meio e condições para a produção de L-asparaginase**

A produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.*T8.3 foi conduzida por processo estacionário em batelada. Os meios produtivos líquidos foram preparados segundo a formulação básica descrita anteriormente por Bacelar *et al.* (2016): 2,0 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> de NaCl e 0,2 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. A concentração de sais inorgânicos foi mantida em todos os bioprocessos. As fontes de carbono, nitrogênio e o pH foram variados segundo determinado por planejamento fatorial e DCC. Após preparo de cada meio, 60 mL foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 125 mL, os quais foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C e 1,1 atm. Após resfriamento a temperatura ambiente, os meios foram inoculados com conídios recém coletados, a uma concentração final de  $10^5$   $\cdot$  mL<sup>-1</sup> de meio. As culturas foram incubadas em estufa a 30 °C durante três dias sem agitação para os experimentos do Planejamento Fatorial e durante 5 dias para o Desenho de Composto Central, também sem agitação. Amostras do caldo das culturas foram coletadas em intervalos de 24 horas para determinação da atividade enzimática produzida, bem como da concentração de amônio liberada no meio.

#### 4.4 Planejamento fatorial

Bacelar *et al.* (2016) demonstraram que a fonte de carbono glicerol pode resultar em maior produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.*T8.3 do que a suplementação do meio com glicose, embora essa última tenha induzido expressão mais rápida da atividade enzimática. Considerando o potencial uso do glicerol como substrato de menor custo e o benefício para a futura aplicação em produção comercial, no presente estudo, glicerol foi escolhido como fonte de carbono para compor uma das variáveis de entrada do planejamento fatorial dos bioprocessos.

A fonte de nitrogênio, além de influenciar o metabolismo e o crescimento fúngico, é de especial interesse para a produção de L-asparaginase, visto que essa enzima está envolvida no metabolismo de nitrogênio, pelo qual é regulada, segundo relatos anteriores (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977; SARQUIS *et al.*, 2004). Desse modo, o aminoácido L-asparagina foi selecionado como fonte de nitrogênio por ser indutor da produção de L-asparaginase pela linhagem T8.3, constituindo a segunda variável de entrada do planejamento fatorial conduzido no presente estudo.

O pH foi escolhido como terceira variável de entrada do planejamento fatorial, uma vez que influencia o crescimento e o metabolismo fúngico, afetando a expressão gênica (SELVIG; ALSPAUGH, 2011; SHARMA; SHARMA; SETH, 2016) e a produção biotecnológica dos produtos fúngicos.

Um planejamento fatorial completo do tipo  $n^k$  foi elaborado, onde  $k$  indica o número de variáveis independentes (variáveis de entrada ou fatores, iguais a três) e  $n$  o número de níveis aplicados, iguais a dois, sendo o mínimo (-) e o máximo (+). Dessa forma, o planejamento foi composto por  $2^3$  condições experimentais, pela combinação dos níveis máximo e mínimo das três variáveis independentes: concentração de glicerol, concentração de L-asparagina e pH. A atividade de L-asparaginase foi determinada como variável de saída, ou resposta, em cada um dos oito bioprocessos planejados.

A Tabela 2 mostra as variáveis e os níveis que foram aplicados para gerar o planejamento fatorial, com auxílio do programa *Statistica 7.0* (Statsoft®). Os oito bioprocessos resultantes da combinação de variáveis e seus níveis são mostrados na Tabela 3.

**Tabela 2–Variáveis e níveis para elaboração de planejamento fatorial 2<sup>3</sup>**

Fator	Variável	Níveis	
		-	+
X	glicerol [g . L <sup>-1</sup> ]	0,5	20
Y	L-asparagina [g . L <sup>-1</sup> ]	0,5	10
Z	pH	5,5	6,5

Fonte: próprio autor

**Tabela 3–Bioprocessos gerados por planejamento fatorial para seleção de variáveis com efeito na produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3**

Meio	Variável		
	[glicerol] (g . L <sup>-1</sup> )	[L-asparagina] (g . L <sup>-1</sup> )	pH
1 (---)	0,5	0,5	5,5
2 (+--)	20	0,5	5,5
3 (-+-)	0,5	10	5,5
4 (++-)	20	10	5,5
5 (--+)	0,5	0,5	6,5
6 (+++)	20	0,5	6,5
7 (-++)	0,5	10	6,5
8 (++++)	20	10	6,5

Fonte: próprio autor. A simbologia da combinação dos sinais entre parênteses, negativos e/ou positivos, denota o mínimo ou máximo nível para as variáveis fonte de carbono, fonte de nitrogênio e pH, respectivamente. Os níveis mínimo (-) e máximo (+) para as variáveis concentração de glicerol (0,5 e 20 g . L<sup>-1</sup>), concentração de L-asparagina (05 e 10 g . L<sup>-1</sup>) e pH (5,5 e 6,5) nos meios 1 a 8 são mostradas na tabela.

Todos os bioprocessos gerados por planejamento fatorial mostrados na Tabela 3 foram conduzidos em triplicata.

#### 4.5 Desenho composto central (DCC)

Os bioprocessos gerados por DCC foram construídos com base na análise dos resultados do planejamento fatorial, segundo a qual foi possível selecionar as variáveis e modificar seus níveis em busca da máxima atividade enzimática de L-asparaginase, ou seja, do ajuste da resposta. As três variáveis, concentração de glicerol, concentração de L-asparagina e pH foram mantidas para elaboração do DCC, entretanto seus níveis foram modificados, como mostra a Tabela 4.

Através da aplicação das variáveis e níveis mostrados na Tabela 4, foram gerados 15 condições de bioprocessos, sendo oito combinações dos níveis máximo e mínimo das

variáveis de entrada, mais seis combinações correspondentes aos dois pontos axiais (menor e maior) das três variáveis e um ponto central do experimento, gerado pela combinação dos valores médios das variáveis de entrada (TAB 5). Ao todo, no DCC foram conduzidos 18 bioprocessos, uma vez que o ponto central foi conduzido pela elaboração de quatro replicatas para controle estatístico. A atividade de L-asparaginase foi determinada como variável de resposta.

**Tabela 4 – Variáveis e níveis para elaboração de Desenho Composto Central**

Variáveis	Unidade	Níveis				
		Axial (- $\alpha$ )	Min(-1)	Central	Max(+1)	Axial(+ $\alpha$ )
Glicerol	[g . L <sup>-1</sup> ]	3,2	8,0	15,0	22,0	26,8
L-asparagina	[g . L <sup>-1</sup> ]	0,8	2,5	5,0	7,5	9,2
pH		3,3	4	5	6	6,7

Fonte: próprio autor.

**Tabela 5 - Bioprocessos gerados por Desenho Composto Central para ajuste da produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3**

	C [g . L <sup>-1</sup> ]	N [g . L <sup>-1</sup> ]	pH
1	8	2,5	4
2	8	2,5	6
3	8	7,5	4
4	8	7,5	6
5	22	2,5	4
6	22	2,5	6
7	22	7,5	4
8	22	7,5	6
9	3,2	5	5
10	26,8	5	5
11	15	0,8	5
12	15	9,2	5
13	15	5	3,3
14	15	5	6,7
15	15	5	5
16	15	5	5
17	15	5	5
18	15	5	5

Fonte: próprio autor

#### 4.6 Determinação de amônio e atividade enzimática

A concentração de amônio e a atividade de L-asparaginase foram monitoradas a cada 24 horas. Para a determinação da atividade enzimática produzida em cada bioprocessos, alíquotas de 10 mL foram coletadas assepticamente dos filtrados das culturas, as quais foram transferidas para tubos de polipropileno de 15 mL e centrifugadas por 10 minutos a 8.000 g.

A determinação da concentração de amônio no filtrado das culturas permite um acompanhamento indireto da hidrólise do substrato L-asparagina e sugere a expressão da atividade enzimática. Para a dosagem de amônio, foi utilizado o método de Nessler. O reagente de Nessler é uma solução de iodeto de mercúrio em meio alcalino que, em contato com íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ), forma um complexo amarelo de óxido de mercúrio-amidoiodeto de mercúrio. A semi-reação é descrita na equação (2).



A intensidade dada pela cor amarela deste complexo é proporcional à concentração inicial de amônio, gerando uma correlação entre o íon e a absorvância em 450 nm (FIG. 13).

**Figura 13 - Coloração do reagente de Nessler em diferentes concentrações de amônio.**



Fonte: próprio autor

Para a dosagem, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra centrifugada foram adicionados a uma mistura de 450  $\mu\text{L}$  de reagente de Nessler e 600  $\mu\text{L}$  de água destilada. As amostras foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C antes e a absorvância foi determinada em espectrofotômetro em 450 nm de comprimento de onda. A concentração de amônio foi determinada contra uma curva de calibração com padrões conhecidos. A curva e o preparo do reagente de Nessler estão descritas no Anexo B.

A atividade enzimática de L-asparaginase foi determinada através do método da hidrólise do substrato L-asparagina, quantificando-se a concentração de amônio liberado na reação com uso do reagente de Nessler (CHOW; TING, 2015; RADHIKA TIPPANI, 2012; SHAKAMBARI *et al.*, 2015). Esse método é de fácil execução e baixo custo, sendo utilizado por diversos autores.

Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma mistura de 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris.HCl pH = 7,0, mais 200  $\mu\text{L}$  de solução de L-asparagina 0,04 M e 100  $\mu\text{L}$  de água destilada. A mistura reacional foi pré-incubada a  $37 \pm 2$  °C e, em seguida, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras foram adicionados. A reação foi incubada por 30 minutos a  $37 \pm 2$  °C e interrompida com 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 1,5M (CHOW; TING, 2015; DESHPANDE; CHOUBEY; AGASHE, 2014; KIM *et al.*, 2001; KIRANMAYI *et al.*, 2014; MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; SARQUIS *et al.*, 2004; SHRIVASTAVA *et al.*, 2012). Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  dessa reação foi adicionada à mistura de reagente de Nessler e água, como acima descrito, e a concentração de amônio foi determinada da mesma maneira. A curva de calibração utilizada foi construída com as mesmas concentrações do analito de referência, porém preparada em mistura contendo TCA, Tris.HCl e L-asparagina nas mesmas proporções utilizadas na reação de dosagem. Uma vez que o produto da reação enzimática, amônio, também se encontra presente na amostra retirada do sobrenadante das culturas, as dosagens foram realizadas tanto no tempo inicial (Tempo zero, “ $T_0$ ”) quanto no tempo final, após 30 minutos de reação (“ $T_{30}$ ”). A absorbância determinada no tempo inicial foi descontada da absorbância final, sendo a diferença entre as duas absorbâncias utilizadas no cálculo para determinação da concentração de amônio liberado nos trinta minutos de reação enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de amônio por minuto por mL de amostra nas condições de reação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados do Planejamento fatorial

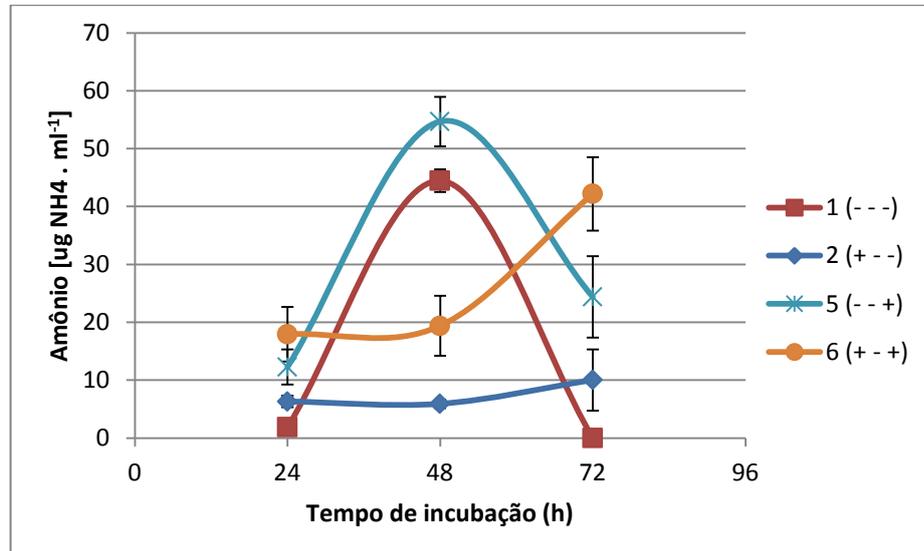
As curvas de liberação de amônio nos bioprocessos planejados é mostrada nos Gráficos 1 e 2. São mostrados os resultados como média de três triplicatas  $\pm$  o desvio padrão. Como é possível verificar no Gráfico 1, os processos 1, 2, 5 e 6, nos quais a variável concentração de L-asparagina foi ajustada em seu menor nível ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), apresentaram baixa liberação de amônio, como esperado. Entretanto, dentre eles, os processos 1 e 5, que também possuem em comum a concentração de glicerol ajustada no valor mínimo ( $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) apresentaram liberação de amônio mais rápida (48 horas) do que os processos 2 e 6, cuja concentração de glicerol foi ajustada inicialmente em  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Essa análise pode indicar que o excesso de glicerol diminui a hidrólise de L-asparagina e a consequente liberação de amônio no meio, indicativo de que a expressão da atividade enzimática foi diminuída. Há que se observar também que a liberação de amônio do bioprocessos 5 foi ligeiramente aumentada em relação à do bioprocessos 1, sendo que esses se diferenciam pelo pH, ajustado em 6,5 no primeiro e 5,5 no segundo. A comparação das curvas de liberação de amônio nos processos 2 (pH 5,5) e 6 (pH 6,5) também mostra que houve maior liberação de amônio nesse último. Assim, é passível de extrapolação que o pH mais neutro pode favorecer a atividade hidrolítica. É necessário notar, porém, que a liberação de amônio na cultura sofre também a interferência do processo de absorção pelo micélio, de modo que a concentração oscila, tornando imprescindível a determinação direta da atividade enzimática.

O Gráfico 2 mostra as curvas de liberação de amônio nos bioprocessos ajustados com o maior nível da variável concentração de L-asparagina, ou seja,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Coerentemente, ocorreu liberação de elevada concentração de amônio nesses processos, se comparada com a que se observa nos processos ajustados com apenas  $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  de L-asparagina (GRAF. 1).

Dentre os bioprocessos 3, 4, 7 e 8, o perfil do processo 4 foi diferente dos demais, com concentração de amônio no meio permanecendo inferior à observada nos processos 3, 7 e 8. Curiosamente, a atividade enzimática produzida no processo 4 foi a mais elevada ao longo do tempo (TAB. 6) o que mostra que a presença de amônio no meio pode não ser um indicador fiel para análise da atividade enzimática. Para a interpretação desse resultado é preciso levar em consideração a complexidade do crescimento fúngico e da assimilação de

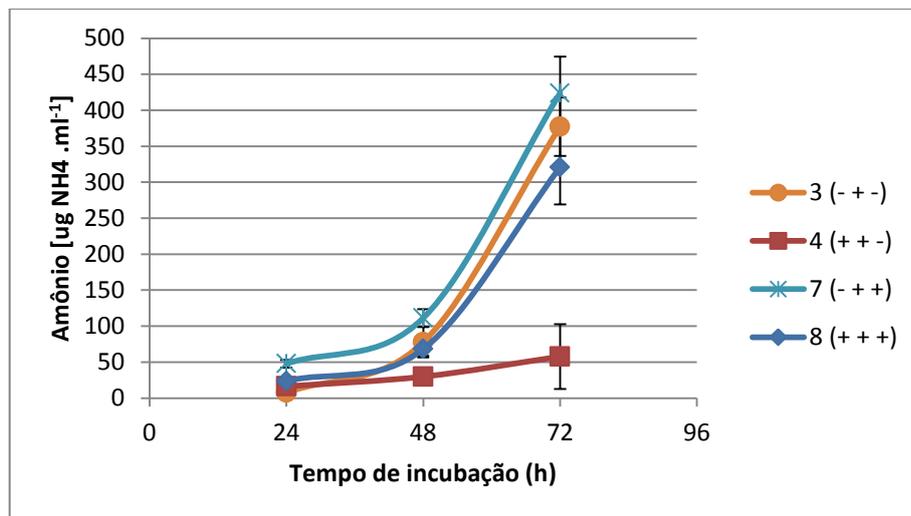
nutrientes. Uma vez que a cultura é dinâmica, a concentração dos nutrientes no meio, incluindo fontes de carbono e seus produtos de hidrólise, bem como as fontes de nitrogênio, não se acumulam indefinidamente, pois são absorvidas pelo micélio.

**Gráfico 1 - Liberação de amônio nas culturas com baixa suplementação de L-asparagina**



Fonte: próprio autor. Bioprocesso 1: Glicerol 0,5 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 0,5 g . L<sup>-1</sup> e pH 5,5. Bioprocesso 2: Glicerol 20 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 0,5 g . L<sup>-1</sup> e pH 5,5. Bioprocesso 5: Glicerol 0,5 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 0,5 g . L<sup>-1</sup> e pH 6,5. Bioprocesso 6: Glicerol 20 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina g . L<sup>-1</sup> e pH 6,5.

**Gráfico 2 – Liberação de amônio nas culturas com alta suplementação de L-asparagina**



Fonte: próprio autor. Bioprocesso 3: Glicerol 0,5 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 10 g . L<sup>-1</sup> e pH 5,5. Bioprocesso 4: Glicerol 20 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 10 g . L<sup>-1</sup> e pH 5,5. Bioprocesso 7: Glicerol 0,5 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 10 g . L<sup>-1</sup> e pH 6,5. Bioprocesso 8: Glicerol 20 g . L<sup>-1</sup>; L-asparagina 10 g . L<sup>-1</sup> e pH 6,5.

A Tabela 6 apresenta as atividades de L-asparaginase produzidas nos bioprocessos 1, 2, 4 e 8 em U. Nenhuma atividade detectável foi produzida nos processos 3, 5, 6 e 7. Mesmo nos processos nos quais foi verificada uma produção da atividade enzimática, essa foi muito baixa, evidenciando a necessidade de ajuste dos processos produtivos. Porém, se comparada com dados da literatura, mesmo ainda antes do ajuste, é possível perceber que a linhagem T8.3 possui potencial para o desenvolvimento de um processo produtivo. As atividades produzidas oscilaram entre 0,2 a 0,4 U em períodos de cultivo de 48 a 72 horas. Após triagem de 89 isolados fúngicos e seleção dos 25 melhores produtores Chow e Ting (2015) obtiveram uma atividade de 0,25 U/mL pelo isolado ODL4.

**Tabela 6 - Atividade enzimática produzida nos bioprocessos delineados por planejamento fatorial**

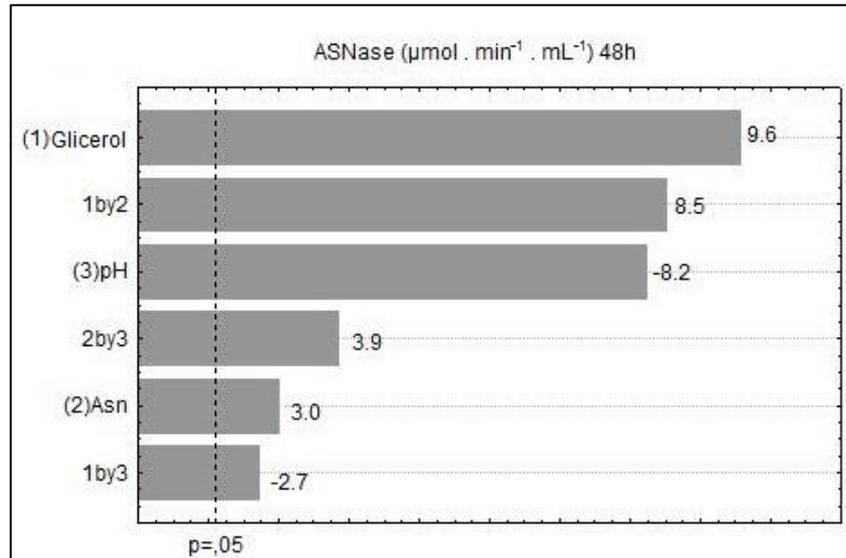
Bioprocesso	Atividades enzimáticas (U)		
	24 h	48 h	72 h
1 (- - -)	0,01 ± 0	0,19 ± 0	0 ± 0
2 (+ - -)	0 ± 0	0,15 ± 0,04	0,43 ± 0,03
4 (+ + -)	0 ± 0	0,39 ± 0,03	0,56 ± 0,06
8 (+ + +)	0 ± 0	0,12 ± 0,04	0 ± 0

Fonte: próprio autor. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de amônio por minuto por mL nas condições de reação (37 °C e pH 7,0).

Embora as atividades de L-asparaginase produzidas nos bioprocessos delineados por planejamento fatorial tenham sido baixas, a análise permitiu verificar quais variáveis apresentam efeito significativo sobre a resposta. Os diagramas de Pareto das Figuras 14 e 15 apresentam as análises realizadas acerca dos efeitos das variáveis de entrada (concentração de glicerol, concentração de L-asparaginase e pH) sobre a resposta produção de L-asparaginase após 48 e 72 horas, respectivamente. Os valores mostrados nos diagramas de Pareto são adimensionais e representam o impacto de cada variável de entrada na variável de saída.

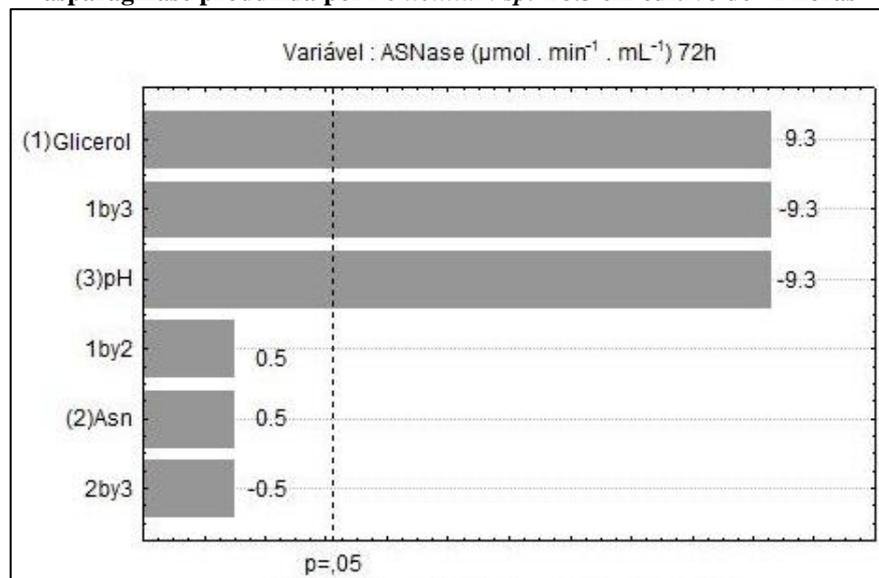
Através da análise estatística mostrada nos diagramas (FIG.14 e FIG.15) foram determinados efeitos fortemente positivos e significativos (9,6 e 9,3) da variável concentração de glicerol sobre a atividade enzimática presente no extrato após 48 horas. Os dados indicam que o aumento da concentração de glicerol, no intervalo de valores estudado, é benéfico para o aumento da atividade de L-asparaginase, tanto após 48 horas como após 72 horas de cultivo. Ou seja, o nível máximo da concentração de glicerol (20 g . L<sup>-1</sup>) induz aumento da produção da atividade enzimática em relação ao nível mínimo (0,5 g . L<sup>-1</sup>).

**Figura 14 - Diagrama de Pareto para análise do efeito das variáveis de entrada sobre a atividade de L-asparaginase produzida por *Penicillium sp.* T8.3 em cultivo de 48 horas**



Fonte: próprio autor

**Figura 15 - Diagrama de Pareto para análise do efeito das variáveis de entrada sobre a atividade de L-asparaginase produzida por *Penicillium sp.* T8.3 em cultivo de 72 horas**



Fonte: próprio autor

O pH também teve uma influência muito significativa, porém negativa, sobre a produção de atividade de L-asparaginase por *Penicillium sp.*T8.3. Ao contrário do efeito positivo da concentração de glicerol, a variável pH apresentou efeitos significativos e negativos sobre a produção de atividade enzimática de L-asparaginase após 48 horas e 72 horas, de - 8,2 e - 9,3, respectivamente (FIG. 14 e FIG. 15). Esses resultados indicam que,

para um aumento da produção de L-asparaginase, é preferível a diminuição dos valores de pH. Assim, o ajuste do pH em 5,5 resulta em aumento da atividade de L-asparaginase em relação ao pH 6,5.

É importante ressaltar que o objetivo do planejamento fatorial é permitir apontar as variáveis que apresentam efeito significativo e que, portanto, devem ser consideradas para a elaboração dos experimentos de ajuste, ou seja, nos DCC. Assim, o fato de que as variáveis concentração de glicerol e pH apresentaram efeitos fortemente significativos sobre a produção de L-asparaginase indica que devem ser selecionadas, uma vez que possuem impacto para a resposta. Além disso, a análise multivariada do planejamento fatorial desenvolvido permitiu identificar valores de referência para estabelecer a faixa que deve ser aplicada nos experimentos de otimização, indicando como ponto de partida o nível máximo da concentração de glicerol e o nível mínimo do pH.

A determinação do efeito das interações entre as variáveis é uma das principais vantagens de se realizar um planejamento fatorial, o que não seria percebido através de análise univariada. Na Figura 15, é possível verificar que um dos três maiores efeitos sobre a atividade de L-asparaginase após 72 horas de cultivo foi o da interação entre as variáveis concentração de glicerol e pH (interação 1 x 3), o qual foi fortemente negativo (- 9,3). Esse efeito foi tão significativo quanto o do próprio pH e da concentração de glicerol. Entretanto, o índice negativo do efeito da interação pH x glicerol, indica que, para o aumento da resposta L-asparaginase produzida após 72 horas, é necessário que os valores das variáveis da interação sejam ajustados de maneira oposta. Ou seja, enquanto a concentração de glicerol deve aumentar, o pH deve diminuir. No presente caso, como o próprio efeito das variáveis indica que a concentração de glicerol deve ser mantida no nível máximo (efeito positivo) e o pH deve ser mantido no nível mínimo (efeito negativo), é possível obedecer à interação sem prejuízo da resposta. Há casos em que a interação é positiva, mas os efeitos das variáveis são opostos e, nessa condição, é necessário obedecer ao efeito mais significativo, cujo valor modular é maior.

O diagrama de Pareto da Figura 15 também mostra um efeito negativo e significativo para a interação das variáveis glicerol e pH. Embora esse efeito seja menor em 48 horas (-2,7) do que após 72 horas (-9,3), indica que também a produção da enzima após 48 horas deve ser aumentada quando os níveis dessas duas variáveis forem ajustados de maneira oposta (FIG. 14 e FIG. 15).

A variável concentração de L-asparagina teve um efeito menor do que o da concentração de glicerol e do pH sobre a produção de atividade após 48 horas (FIG.14). Entretanto, esse efeito foi positivo (3,0) indicando que o nível maior de L-asparagina (10 g . L<sup>-1</sup>) é preferível ao mínimo (0,5 g . L<sup>-1</sup>) para a produção da enzima nos cultivos de 48 horas. O efeito dessa variável tornou-se não significativo após 72 horas, o que é compreensível, se levado em consideração que a necessária indução enzimática já foi iniciada nos tempos anteriores de cultivo e que progressivamente a hidrólise do substrato deve diminuir sua concentração no meio, diminuindo também seu impacto sobre a resposta.

As interações da variável 2, concentração de L-asparagina, com a concentração de glicerol (interação 1 x 2) e com o pH (interação 2 x 3) foram significativas nos cultivos de 48 horas, com efeitos positivos de 8,5 e 3,9 respectivamente (FIG.15). Desse modo, para estabelecer novas faixas de valores que possam ser aplicadas nos experimentos de DCC, em obediência à interação 1 x 2 cujo efeito foi fortemente significativo e positivo, é preciso considerar que glicerol e L-asparagina devem ter suas concentrações aumentadas concomitantemente, ou seja, ambos devem ter como referência o nível máximo, 20 e 10 g . L<sup>-1</sup>. No caso da interação 2 x 3, também com efeito positivo, a concentração de L-asparagina deve ser ajustada no nível máximo, bem como o pH deveria também ser ajustado no nível máximo, 6,5. Porém, o efeito da variável pH foi negativo e mais significativo do que o da interação 2 x 3, o que significa dizer que seu impacto para a resposta é maior, de modo que ao balancear a análise, é preferível ajustar o pH para o mínimo, desobedecendo à interação 2 x 3.

Assim, as análises dos bioprocessos desenvolvidos por planejamento fatorial mostraram que as três variáveis foram apontadas como significativas para a produção de L-asparaginase, não devendo ser descartadas quando do delineamento dos experimentos de DCC. Além disso, foram tomados por base os valores máximos da concentração de glicerol (20 g . L<sup>-1</sup>) no estabelecimento dos novos níveis mínimo e máximo desta variável no DCC: 8 a 22 g . L<sup>-1</sup>. Para o pH, considerando que o nível mínimo pH 5,5 foi mais benéfico para a resposta do que pH 6,5, foi estabelecida uma variação de 4,0 a 6,0, a fim de explorar um intervalo de pH mais ácido do que o analisado no planejamento fatorial. Por fim, para a concentração de L-asparaginase, cujo nível máximo (10 g . L<sup>-1</sup>) foi apontado como preferencial ao nível mínimo (0,5 g . L<sup>-1</sup>) a faixa de valores proposta para o DCC oscilou de 2,5 a 7,5 g . L<sup>-1</sup>, a fim de elevar o nível mínimo e manter um nível máximo ainda próximo ao utilizado no planejamento fatorial. Além dos níveis mínimos e máximos estabelecidos para

cada variável de entrada após análise do planejamento fatorial, o DCC, como anteriormente descrito, permite a investigação de valores aquém e acima destes, através dos pontos axiais.

## 5.2 Resultados do Desenho composto central (DCC)

Após definição das variáveis para composição do DCC e sua faixa de valores foram gerados os bioprocessos anteriormente descritos (TAB. 5). Foram determinados nos sobrenadantes das culturas, após a separação da biomassa, a atividade de L-asparaginase como resposta dos experimentos e também o pH, além da concentração de amônio. Tendo em vista que nos bioprocessos do planejamento fatorial as atividades enzimáticas de alguns processos estavam ainda se iniciando após 72 horas, a análise foi estendida até 120 horas de cultivo. Os resultados das atividades enzimáticas produzidas nos bioprocessos delineados por DCC são mostrados na Tabela 7.

A partir da análise dos resultados é possível ressaltar que foi mantida a tendência de aumento da atividade enzimática nos tempos posteriores de cultivo, especialmente após 72 a 120 horas, como se previra pela análise dos resultados do planejamento fatorial (TAB 7). Como é possível perceber através dos dados da Tabela 7, a produção enzimática foi incipiente nos cultivos de 24 e 48 horas, elevando-se após 72 horas em alguns bioprocessos e após 96 e 120 horas na maioria dos bioprocessos. Isso indica que esses são os tempos mais adequados para a produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3.

Entre os bioprocessos delineados por DCC, a produção de L-asparaginase alcançou níveis significativos nos bioprocessos DCC7, DCC14 e DCC15-18 (pontos centrais) sendo de 4,6 U (120 horas); 6,5 U (72 horas) e  $5,0 \pm 0,9$  U (120 horas), respectivamente. É possível perceber que na maior parte dos processos nos quais a atividade se elevou, a elevação ocorreu após 120 horas de cultivo, bem como os pontos centrais do experimento estiveram entre os processos cuja atividade enzimática foi maior. Esse último dado revela que a faixa ótima de valores para um máximo de atividade foi alcançada.

Os dados também mostram que com um número relativamente pequeno de etapas experimentais, sendo oito condições experimentais no planejamento fatorial mais 15 condições geradas no DCC, a atividade de L-asparaginase produzida por *Penicillium sp.* T8.3 aumentou em mais de 16 vezes, comparando-se o máximo da atividade nos bioprocessos elaborados por planejamento fatorial (0,4 U) e a atividade de 6,5 U alcançada no processo DCC14 (TAB. 6 e TAB. 7). Ao comparar-se com a atividade ótima obtida nos pontos centrais

após 120 horas, o aumento foi maior que 12 vezes. Nos resultados reportados por outros estudos em que se produziu L-asparaginase bacteriana são descritas atividades enzimáticas de 32,2 U (MAHAJAN *et al.*, 2012), 3,23 U (DESHPANDE; CHOUBEY; AGASHE, 2014), 3,96; 7,42 e 6,99 (KIRANMAYI *et al.*, 2014). Embora exista uma alta atividade com a enzima obtida de bactérias, os resultados aqui apresentados estão acima da média dos citados. Além disso, uma L-asparaginase de origem eucarionte apresenta como perspectivas para os estudos clínicos de vantagens terapêuticas que incluem menor resposta imunológica e menos efeitos tóxicos, como foi descrito anteriormente.

Os resultados alcançados mostram que o planejamento estatístico de experimentos e a análise multivariada são ferramentas poderosas que permitem identificar as condições ideais necessárias ao ajuste de processos biotecnológicos.

**Tabela 7 - Atividade enzimática produzida nos bioprocessos delineados por desenho composto central entre 24 e 120 horas de incubação.**

Bioprocesso	Variáveis de entrada			Atividade enzimática (U)				
	[C] (g . L <sup>-1</sup> )	[N] (g . L <sup>-1</sup> )	pH	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1	8,0	2,5	4,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1
2	8,0	2,5	6,0	0,0	0,0	0,1	0,3	0,1
3	8,0	7,5	4,0	0,0	0,4	0,5	0,0	2,6
4	8,0	7,5	6,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
5	22,0	2,5	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
6	22,0	2,5	6,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
7	22,0	7,5	4,0	0,0	0,1	0,0	0,0	4,6
8	22,0	7,5	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	3,2	5,0	5,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
10	26,8	5,0	5,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
11	15,0	0,8	5,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,0
12	15,0	9,2	5,0	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1
13	15,0	5,0	3,3	0,6	0,2	0,1	0,1	0,0
14	15,0	5,0	6,7	0,0	0,5	6,5	0,0	0,0
15 (C)	15,0	5,0	5,0	0,0	0,2	0,2	0,0	5,3
16 (C)	15,0	5,0	5,0	0,0	0,2	0,3	0,0	5,7
17 (C)	15,0	5,0	5,0	0,0	0,2	0,2	0,7	3,9
18 (C)	15,0	5,0	5,0	0,0	0,2	0,3	0,2	5,3

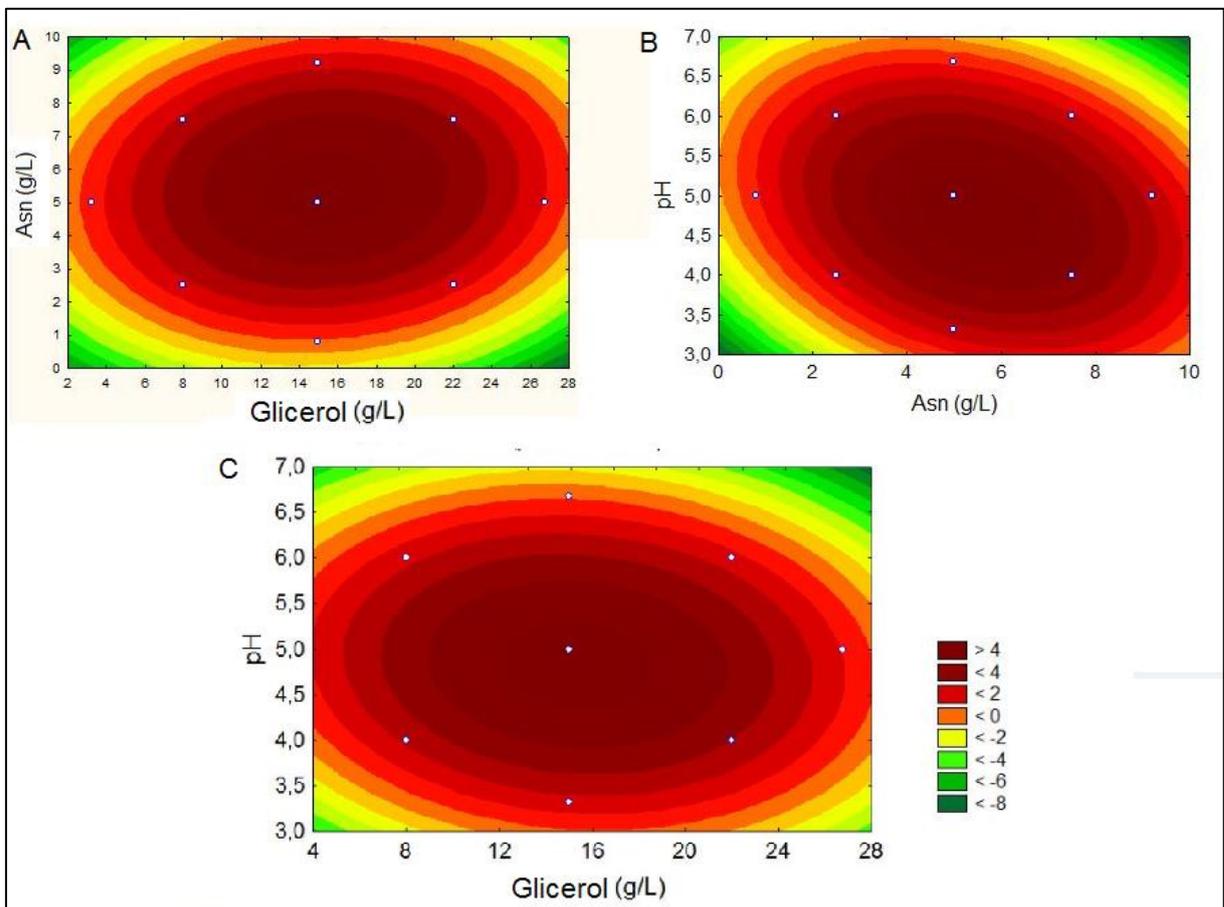
Fonte: próprio autor. A nomenclatura [C], [N] e pH indica a concentração da fonte de carbono, de nitrogênio e o pH do meio, respectivamente. Aqui se ressaltam os bioprocessos com maior atividade enzimática: bioprocessos 3, 7, e os 4 pontos centrais (15, 16, 17 e 18) após 120 horas, e o bioprocessos 14 após 72 horas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de amônio por minuto por mL nas condições de reação (37 °C e pH 7,0).



Esses dados encorajaram a elaboração de um modelo matemático baseado no efeito das variáveis, o qual possa ser utilizado para prever o comportamento da resposta produzida em novos bioprocessos.

Além da otimização pela determinação da faixa de valores que delimita a máxima resposta, é desejável que os processos produtivos sejam robustos, ou seja, que a amplitude dos valores que resultam no máximo da produção seja o maior possível. A robustez é uma medida da sensibilidade da variável de resposta às mudanças em qualquer uma das variáveis de entrada. Para exemplificar, a utilidade da robustez de um modelo matemático está ligada a um intervalo de erro que pode ter a medição da variável de entrada sem alterar significativamente a variável de saída. No presente trabalho, a robustez do modelo gerado permite inferir o quanto pode mudar a atividade enzimática em função de variações nos valores da concentração de glicerol, de L-asparagina ou do pH inicial do meio. A Figura 17 mostra os gráficos de robustez obtidos a partir da análise estatística do DCC.

**Figura 17 - Robustez da produção de L-asparaginase de *Penicillium sp.* T8.3 em função das variáveis concentração de asparagina x concentração de glicerol, pH x concentração de asparagina e pH x concentração de glicerol.**



Fonte: próprio autor

Segundo os diagramas de robustez mostrados na Figura 17, os intervalos de trabalho para garantir uma atividade enzimática acima de 4 U são de, aproximadamente, 12 a 18 g/L para a concentração de glicerol (Figura 17A e 17C), 4 a 7 g/L para a concentração de L-asparagina (Figura 17A e 17B) e 4,5 a 5,2 para o pH (Figura 17B e 17C). A análise dos diagramas indica que uma alteração nos valores das variáveis dentro dos limites acima indicados não deve afetar significativamente a resposta, que deve permanecer acima de 4 U de atividade de L-asparaginase. Variações da ordem de  $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (glicerol) e  $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (L-asparagina) significariam alterações da ordem de 6 e 3 kg dos substratos em um volume de 1000 L. Processos robustos geram menos impactos na produção em escala industrial, pelo que são mais promissores para a produção comercial.

O modelo matemático foi gerado pela aplicação dos coeficientes de cada variável em seus efeitos lineares e quadráticos sobre a resposta atividade de L-asparaginase. Os valores de atividade enzimática computados geraram uma função para prever o valor da atividade enzimática em função da concentração de glicerol, concentração de L-asparagina e o pH inicial do meio de cultura. Os índices pelos quais as variáveis de entrada impactam a variável de saída, atividade de L-asparaginase, são determinados através da análise estatística do efeito de cada variável, com base nas alterações dos níveis especificados no DCC e as resultantes flutuações no valor da atividade de L-asparaginase.

Na Tabela 8 se mostram os coeficientes gerados através do programa *Statistica* 7.0 junto com os valores da significância p. O valor de significância mais utilizado é de 5%, o que indica que o valor de p igual a 0,05 é significativo em 95%. Dessa forma, coeficientes que apresentaram valores de p superiores a 0,05 foram considerados não significativos.

Na Tabela 8 é possível observar que os coeficientes quadráticos ( $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$ ) foram significativos, com valores de p muito inferiores a 5% e intervalos de confiança muito acima de 95%. Dessa forma, diante da sua significância estatística os coeficientes dos efeitos quadráticos das variáveis concentração de glicerol, concentração de L-asparagina e pH foram aplicados no modelo matemático. Os coeficientes lineares, embora não significativos segundo os valores de p acima de 0,05 também foram incluídos por hierarquia. Como os valores quadráticos menores que zero geram uma concavidade negativa, eles são usados para deter o impacto crescente dos fatores lineares; de outra maneira, se fossem utilizados unicamente os valores lineares crescentes, o modelo suporia uma atividade enzimática infinita quando as variáveis de entrada forem infinitas também.

**Tabela 8 - Sumário dos coeficientes e suas significâncias determinados no modelo matemático.**

Coeficiente	Variável associada	Valor	Significância (p)
$\beta_0$	-	-58,52	0,0002
$\beta_1$	glicerol	1,14	0,7169
$\beta_{11}$	glicerol	-0,033	0,0035
$\beta_2$	L-asparagina	4,32	0,1720
$\beta_{22}$	L-asparagina	-0,26	0,0036
$\beta_3$	pH	18,07	0,1643
$\beta_{33}$	pH	-1,63	0,0035
$\beta_{12}$	1-2 (glicerol-asn)	0,01	0,5964
$\beta_{13}$	1-3 (glicerol-pH)	0,04	0,5644
$\beta_{23}$	2-3 (asn-pH)	0,35	0,0935

Fonte: próprio autor.  $\beta_0$ : constante do modelo;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , e  $\beta_3$ : coeficientes lineares de cada variável;  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  e  $\beta_{33}$ : coeficientes dos termos quadráticos;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{23}$  e  $\beta_{13}$ : coeficientes de interação entre cada duas variáveis.

Variável 1: concentração de glicerol; Variável 2: concentração de L-asparagina; Variável 3: pH.

Aplicando-se a constante do modelo, bem como os coeficientes lineares e quadráticos das três variáveis envolvidas, foi possível chegar à equação matemática (3), preditiva da resposta  $W$ , atividade enzimática de L-asparaginase no extrato da cultura.

$$W = -58,52 + 1,14[C] - 0,033[C]^2 + 4,32[N] - 0,26[N]^2 + 18,07 \cdot pH - 1,63 \cdot pH^2 \quad (3)$$

Na qual  $[C]$ ,  $[N]$  e  $pH$ , correspondem à concentração de glicerol, de L-asparagina, e ao  $pH$  respectivamente.

A análise realizada com auxílio do programa *Statistica 7.0* sugeriu os pontos críticos do processo, ou seja, através da equação matemática (3), o valor de cada variável de entrada para otimizar o valor da variável de saída corresponde a  $15,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  e  $5,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  para a concentração de glicerol e L-asparagina, respectivamente e  $pH$  4,8. Segundo a previsão do ponto máximo da resposta de atividade de L-asparaginase que pode ser alcançada pela aplicação dos pontos críticos nas condições utilizadas no presente estudo, o valor teórico da atividade enzimática foi de 16,4 U.

### 5.3 Avaliação experimental do modelo matemático

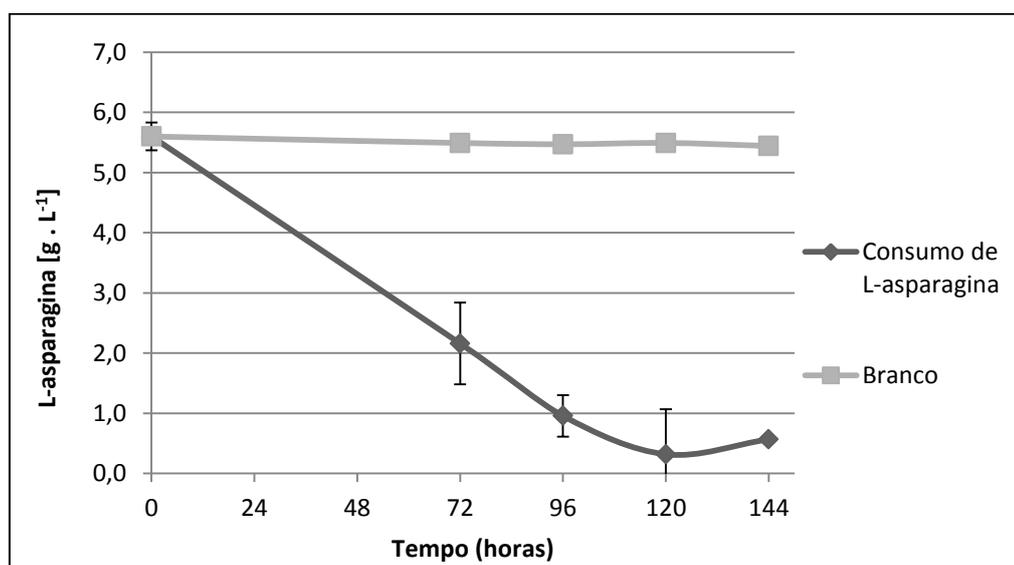
Embora os dados usados para obter este modelo houveram sido experimentais, o valor da atividade enzimática é chamado de teórico, uma vez que trata-se de um valor que foi previsto por um modelo matemático preditivo do comportamento da resposta de um determinado processo. Em se tratando de um modelo teórico, é necessário que sua validade

para previsão da resposta seja analisada experimentalmente, a fim de verificar o quanto a previsão se aproxima dos valores experimentais.

Desse modo, seis meios foram preparados nas condições determinadas como ponto crítico do processo ou seja: 15,5 g . L<sup>-1</sup> de glicerol; 5,6 g . L<sup>-1</sup> de L-asparagina e pH 4,8. Cinco meios foram inoculados e um deles foi utilizado como controle. Os seis meios foram submetidos às mesmas condições de temperatura e monitorados em intervalos de 24 horas a partir do terceiro dia de cultivo, uma vez que nos bioprocessos planejados e no DCC, a produção de atividade enzimática começava a se elevar após 72 horas. Foram determinados nas amostras dos sobrenadantes: o amônio residual e a atividade enzimática.

A liberação de amônio pode ser correlacionada com o decréscimo da concentração do substrato L-asparagina no meio de cultivo. Cada 18 gramas de amônio liberado equivalem ao consumo de 132 gramas de L-asparagina. Com base nessa análise, foi construído no Gráfico 3, a curva de consumo de L-asparagina em função do tempo nas culturas teste e controle. Na cultura controle, não inoculada, a concentração de amônio residual apresentou variação mínima ao longo de tempo de incubação, traduzindo-se na curva linear de consumo de L-asparagina verificada no Gráfico 3. Esses resultados sugerem que a quantidade de L-asparagina degradada no processo de esterilização do meio em autoclave é depreciable, e, em consequência, que todo o amônio obtido nos meios testados é um produto da atividade da L-asparaginase secretada pela biomassa.

**Gráfico 3 - Queda na concentração de L-asparagina nos meios em condições de otimização**

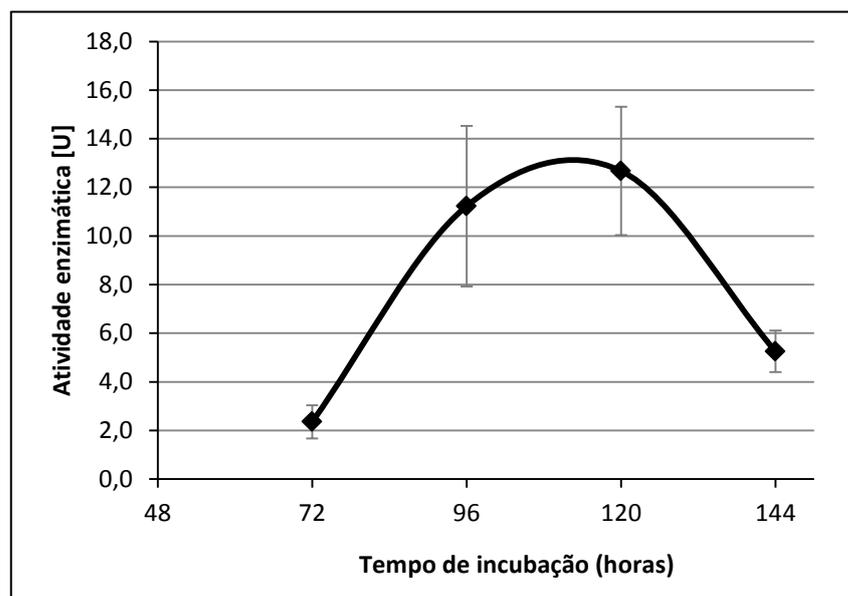


Fonte: próprio autor.

Segundo Savitri (2003), uma alta atividade de L-asparaginase está vinculada à falta de fonte de nitrogênio. Os resultados do presente trabalho também mostram uma atividade enzimática máxima no momento que a concentração de nitrogênio é próxima a zero. Aparentemente, quando ocorre redução intensa da fonte de nitrogênio após 72 horas, a qual é quase esgotada após 120 horas de cultivo, surge a necessidade metabólica de que se aumente a produção da enzima para acelerar o processo de hidrólise de fontes nitrogenadas e aumentar a captação dos produtos resultantes. No Gráfico 4 é possível verificar que a máxima da curva de atividade de L-asparaginase corresponde ao intervalo entre 96 e 120 horas. Drainas *et al.* (1977), por exemplo, utilizaram *A. nidulans* para produzir L-asparaginase. Os autores concluem que um consumo da fonte de nitrogênio cria uma queda nos níveis de amônia, levando ao aumento da atividade enzimática (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977). Vários outros autores confirmam este fenômeno (SARQUIS *et al.*, 2004; SAVITRI; ASTHANA; AZMI, 2003), enquanto outros (CADDICK; PETERS; PLATT, 1994) afirmam que o gene de L-asparaginase está sujeito à regulação de nitrogênio, através do fator GATA e dos ativadores ARE-A e NIT-2 que regulam a transcrição em função da disponibilidade de nitrogênio.

A curva cinética da atividade enzimática e produção de L-asparaginase mostrada no Gráfico 4, permite observar que a mais alta atividade enzimática foi atingida após 96 e 120 horas de incubação (GRAF. 4). A Atividade enzimática determinada na cultura controle foi nula.

Ao comparar a atividade de L-asparaginase produzida por *Penicillium sp.*T8.3 nas condições otimizadas com os relatos de outros autores é possível verificar a eficácia do método de melhoramento da produção da atividade enzimática utilizado no presente estudo. Soniyamby *et al.* (2011) conseguiram uma atividade máxima de  $3,75 \text{ U.mL}^{-1}$  em estudos desenvolvidos com *Penicillium sp.* Trabalhos realizados com o gênero *Fusarium* resultaram em uma atividade de L-asparaginase de  $3,1 \text{ U.mL}^{-1}$  (NAKAHAMA; IMADA; IGARASI, 1973). Entretanto, o Gráfico 4 mostra que a máxima atividade de L-asparaginase produzida nos cultivos de *Penicillium sp.*T8.3 foi de 12,7 U, muito próxima do valor teórico de 16,4 U previsto no modelo gerado, descrito na equação (3).

Gráfico 4 - Produção de L-asparaginase por *Penicillium sp.* T8.3 em bioprocesso melhorado

Fonte: próprio autor

Finalmente, é importante ressaltar que os experimentos permitiram o alcance dos objetivos propostos, elevando a produção da atividade enzimática de 0,4 U para 12,7 U, um aumento aproximado de 32 vezes. Uma comparação porcentual entre o resultado obtido e o predito pelo modelo foi feita. A atividade máxima que o modelo matemático propôs está descrita na Tabela 9 com os coeficientes das variáveis estudadas e seus aportes para a atividade enzimática. A atividade enzimática obtida experimentalmente corresponde a 77% da previsão teórica, permitindo concluir pela validade do modelo matemático gerado.

Tabela 9 - Comparação entre o modelo matemático e o resultado experimental.

Variável	Coeficiente do modelo	Valor da variável	Aporte à atividade
-	-58,52		-58,5
[C]	1,14	15,5	17,7
Glicerol	-0,033	15,5	-7,9
[N] Asp	4,32	5,6	24,2
	-0,26	5,6	-8,2
pH inicial	18,07	4,8	86,7
	-1,63	4,8	-37,6
<b>Atividade</b>		<b>Prevista</b>	<b>16,4 U</b>
		<b>Experimental</b>	<b>12,7 U</b>

Fonte: próprio autor.

## 6 CONCLUSÕES

Através do planejamento estatístico de bioprocessos, pela combinação de planejamento fatorial e desenho composto central, foi possível estabelecer as bases da produção de L-asparaginase por um isolado do gênero *Penicillium*.

Os resultados apontaram a relação positiva da concentração da fonte de carbono glicerol sobre a produção da enzima L-asparaginase, determinada nos extratos dos bioprocessos, ao contrário do efeito negativo determinado para o pH do meio. A concentração de L-asparagina é significativa apenas nos tempos iniciais de cultivo, mas não após 72 horas.

Esses dados corroboram os resultados observados acerca do decréscimo da concentração do substrato de nitrogênio que coincide com a máxima atividade enzimática no bioprocessos otimizado, de acordo com os relatos da literatura acerca da relação entre esgotamento de nitrogênio e estímulo da produção de L-asparaginase.

Os resultados do presente trabalho, além de elevar a produção de atividade enzimática de L-asparaginase pela linhagem *Penicillium sp.*T8.3 de 0,4 U para 12,7 U, muito acima da produção obtida na maioria dos estudos que relataram produção da enzima fúngica, permitiu gerar conhecimentos acerca do bioprocessos produtivo. O meio de cultura obtido para esta atividade enzimática final foi preparado com 15,5 g . L<sup>-1</sup> de glicerol, 5,6 g . L<sup>-1</sup> de L-asparagina e pH 4,8.

Os experimentos delineados por DCC e a metodologia de superfície de resposta permitiram gerar modelo matemático para prever a resposta produção de atividade de L-asparaginase nas condições de otimização em 77%, após validação experimental.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E TRABALHO FUTURO

Os conhecimentos gerados e o ajuste do bioprocesso para a produção de L-asparaginase abrem como perspectiva que sejam conduzidos estudos posteriores para a investigação acerca do controle da expressão da atividade de L-asparaginase em função do metabolismo de nitrogênio e para a elaboração de processo produtivo em escala ampliada.

Esta pesquisa também abre caminhos para que novos estudos de purificação e isolamento da enzima L-asparaginase de *Penicillium sp.* T8.3 sejam conduzidos, com posterior caracterização cinética e determinação das variáveis  $km$  e  $\mu_{max}$ . Outras perspectivas de estudo incluem a determinação do potencial terapêutico e avaliação de efeitos colaterais que esta enzima pode exibir.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUCHOWSKI, A. *et al.* Effect of Covalent Attachment of Polyethylene Glycol on Immunogenicity and Circulating Life of Bovine Liver Catalase. **Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3582–3586, 1977.

AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS. **L-Asparaginase passará a ser produzido no Brasil pela Fiocruz em 2015**. Disponível em: <<http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=1430>>. Acesso em: 6 dez. 2015.

AGRAWAL, N. R. *et al.* A Phase I-II trial of polyethylene glycol-conjugated L-asparaginase in patients with multiple myeloma. **Cancer**, v. 98, n. 1, p. 94–99, 2003.

AGUAYO, A. *et al.* Combination therapy with methotrexate, vincristine, polyethylene-glycol conjugated-asparaginase, and prednisone in the treatment of patients with refractory or recurrent acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 86, n. 7, p. 1203–1209, 1999.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Leucemia linfocítica aguda (em adultos)**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002301-pdf.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer ? A guide for patients and families**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 6 dez. 2016.

ANDRADE, A. F.; BORGES, K. S.; SILVEIRA, V. S. Update on the Use of L-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 8, p. 95–100, 2014.

ARISSETO, A. P. **Acrilamida em alimentos: Ocorrência, métodos analíticos e estimativas de ingestão**. [s.l.] Universidad estadual de Campinas, 2007.

ASSELIN, B. L. *et al.* Comparative pharmacokinetic studies of three asparaginase preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780–1786, 1993.

BACELAR, A. **Assimilação de nitrogênio e crescimento apical em fungos filamentosos produtores de L-asparaginase**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, 2016.

BACELAR, A. *et al.* Fungal production of the anti-leukemic enzyme L-asparaginase: from screening to medium development. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 4, p. 387–394, 2016.

BANKS, W. A. Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier. **BMC neurology**, v. 9, n. Suppl 1, p. S3, 2009.

BANSAL, S. *et al.* Hyperthermophilic asparaginase mutants with enhanced substrate affinity and antineoplastic activity: structural insights on their mechanism of action. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 1161–1171, 2012.

BATOOL, T. *et al.* A Comprehensive Review on L-Asparaginase and Its Applications.

**Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 5, p. 900–923, 2016.

BIANCHINI, M. D S. **Fungos basidiomicetos em biorremediação**. São Paulo, SP: [s.n.].

BONETTI, E. *et al.* The regulation of L-asparaginase activity in rats and mice. Effects of normal and malignant growth, of sex and of dietary changes. **The Biochemical journal**, v. 115, n. 3, p. 597–601, 1969.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, v. 118, p. 99–120, 1963.

BROWN, A. E. **Benson's microbiological applications**. 10. ed. New York: MC Graw Hill, 2007.

BUNPO, P. *et al.* Alanyl-glutamine consumption modifies the suppressive effect of L-asparaginase on lymphocyte populations in mice. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 2, p. 338–343, 2008.

CADDICK, M. X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in mycelial fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, p. 169–177, 1994.

CARLILE, M. J; WATKINSON, S.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2. ed. Londres, ENG: Academic Press, 2001.

CASTELLANI, A. The “Water Cultivation” of Pathogenic Fungi. **Annales des societes belges de medecine tropicale, de parasitologie, et de mycologie**, v. 44, n. 2, p. 217–220, 1964.

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

DA SILVA, T. J. **Seleção de fungos filamentosos para fermentação cítrica de glicerina residual da produção de biodiesel**. [s.l.] Universidad Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2011.

DE ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE CAMARGO, B. *et al.* **Incidência , Mortalidade E Morbidade Hospitalar Por Câncer Em Crianças , Adolescentes E Adultos Jovens No Brasil : informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/wcm/incidencia/2017/pdf/versao-completa.pdf>>.

DERGAL, S. B. **Química de los alimentos**. Quarta ed. México D.F., México: Pearson Educación, 2006.

DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by streptomyces ginsengisoli. **The Scientific**

**World Journal**, v. 2014, p. 1–6, 2014.

DINNDORF, P. A. *et al.* FDA drug approval summary: pegaspargase (oncaspar) for the first-line treatment of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **The oncologist**, v. 12, n. 8, p. 991–998, 2007.

DODOR, D. E.; TABATABAI, M. A. Amidohydrolases in soils as affected by cropping systems. **Applied Soil Ecology**, v. 24, n. 1, p. 73–90, 2003.

DOLOWY, W. C. *et al.* Toxic and Antineoplastic effects of L-asparaginase. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1813–1819, 1966.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Londres, ENG: Elsevier, 1995.

DOUER, D. Is asparaginase a critical component in the treatment of acute lymphoblastic leukemia ? **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 21, n. 4, p. 647–658, 2008.

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

DUFOSSÉ, L. *et al.* Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

EGLER, R.; AHUJA, S.; MATLOUB, Y. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62, 2016.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production , Isolation , and Purification of L -Asparaginase from *Pseudomonas Aeruginosa* 50071 Using Solid-state Fermentation. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 4, p. 387–393, 2004.

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

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

ELSHAFEI, A. M. *et al.* Purification, kinetic properties and antitumor activity of L-glutaminase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 4, n. 1, p. 97–115, 2014.

EMADI, A.; ZOKAEE, H.; SAUSVILLE, E. A. Asparaginase in the treatment of non - ALL hematologic malignancies. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 73, p. 875–883, 2014.

FDA. **FDA Approved Drug Products**. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=103411>>. Acesso em: 8 dez. 2016.

FENELON, S.; ALMEIDA, S. D. S. A histórica visita de Marie Curie ao Instituto do Câncer de Belo Horizonte. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 17–18, 2001.

FERNANDEZ, C. A. *et al.* Successful challenges using native *E. coli* asparaginase after hypersensitivity reactions to PEGylated *E. coli* asparaginase. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 73, p. 1307–1313, 2014.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 2004, n. 49, p. 1–174, 2004.

GASPAR, M. M.; PEREZ-SOLER, C.; CRUZ, M. E. M. Biological characterization of L - asparaginase liposomal formulations. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 38, p. 373–377, 1996.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical reviews in biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.

GRAHAM, M. L. Pegaspargase: A review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 1293–1302, 2003.

GRECO, A. *et al.* Organization and expression of the cell cycle gene, *ts11*, that encodes asparagine synthetase. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 6, p. 2350–2359, 1989.

GREENBERG, D. M.; BLUMENTHAL, G.; RAMADAN, M. A. Effect of Administration of the Enzyme Glutaminase on the Growth of Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 24, p. 957–963, 1964.

HAK, L. J. *et al.* Asparaginase pharmacodynamics differ by formulation among children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 18, n. April, p. 1072–1077, 2004.

HAMERSCHLAK, N. As leucemias no Brasil. **Onco&**, p. 20–23, 2012.

HOWARD, J. B.; CARPENTER, F. H. L-Asparaginase. **The Journal of biological chemistry**, v. 247, n. 4, p. 1020–1030, 1972.

HOWLADER, N. *et al.* **SEER Cancer Statistics Review 1975-2013** SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD: [s.n.]. Disponível em: <[https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2013/#contents](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2013/#contents)>.

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.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **A situação do câncer no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ministerio da Saúde, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Resenha da luta contra o câncer no Brasil: documentário do serviço nacional de câncer**. 2da. ed. Brasília: Ministerio de Saúde, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. 3. ed. Rio de Janeiro: ESDEVA, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. A Saúde e o Lucro. **Rede Câncer**, p. 28–30, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministerio de Saúde, 2015.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum II. Studies on the nature of the active serum constituent: histological mechanism of the regression: tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro. **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 583–60, 1953.

KIL, J. O.; KIM, G. N.; PARK, I. Extraction of extracellular L-asparaginase from *Candida utilis*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 749–750, 1995.

KIM, N. W. *et al.* Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. **Science**, v. 266, p. 2011–2014, 1994.

KIM, W. J. *et al.* Optimization of culture conditions and continuous production of chitosan by the fungi, *Absidia coerulea*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 1, p. 6–10, 2001.

KIRANMAYI, M. U. *et al.* Production and optimization of L-asparaginase by actinobacterium isolated from Nizampatnam mangrove ecosystem. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. September, p. 799–805, 2014.

KOBRINSKY, N. L. *et al.* Outcomes of Treatment of Children and Adolescents With Recurrent Non-Hodgkin 's Lymphoma and Hodgkin 's Chemotherapy , and Transplantation : Children ' s Cancer Group Study CCG-5912. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 9, p. 2390–2396, 2001.

KURNIATI, E. *et al.* Potential bioremediation of mercury-contaminated substrate using filamentous fungi isolated from forest soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1223–1231, 2014.

LOGUERCIO-LEITE, C. *et al.* A particularidade de ser um fungo. **Biotemas**, v. 19, n. 2, p. 17–27, 2006.

LOUREIRO, C. B. **Purificação , conjugação e avaliação “ in vitro ” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

LOUREIRO, C. B. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. June, p. 138–145, 2012.

MADIGAN, M. T. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

MAHAJAN, R. V *et al.* Efficient production of L -asparaginase from *Bacillus licheniformis* with low-glutaminase activity : Optimization , scale up and acrylamide degradation studies. **BIORESOURCE TECHNOLOGY**, v. 125, p. 11–16, 2012.

MAHAJAN, R. V *et al.* A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of l-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 3, p. 122–126, 2013.

MAHAJAN, R. V *et al.* Purification and characterization of a novel and robust L-asparaginase having low-glutaminase activity from bacillus licheniformis: In vitro evaluation of anti-cancerous properties. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 8, 2014.

MASHBURN, L. T.; WRISTON, J. C. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase From Escherichia Coli. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450–452, 1964.

MCCOY, T. A.; MAXWELL, M.; NEUMAN, R. E. The Amino Acid Requirements of the Walker Carcinosarcoma 256 in Vitro. **Cancer Research**, v. 16, p. 979–984, 1956.

MEISTER, A. *et al.* HYDROLYSIS AND TRANSFER REACTIONS CATALYZED BY  $\omega$ -AMIDASE PREPARATIONS. **Journal of biological chemistry**, v. 215, p. 441–460, 1955.

MESAS, J. M.; GIL, J. A.; MARTÍN, J. F. Characterization and partial purification of L-asparaginase from Corynebacterium glutamicum. **Journal of general microbiology**, v. 136, p. 515–519, 1990.

MILA. **Falta do medicamento L-Asparaginase reduziria chances de cura, dizem especialistas**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/informe-publicitario-tempo-de-saude/platb/2014/01/14/falta-do-medicamento-l-asparaginase-reduziria-chances-de-cura-dizem-especialistas/>>. Acesso em: 6 dez. 2015.

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

MOHAN KUMAR, N. S.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. K. Production and optimization of l-asparaginase from Cladosporium sp. using agricultural residues in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 150–158, 2013.

MOSS, G. P. **Enzyme Nomenclature**. Disponível em: <<http://enzyme.expasy.org/cgi-bin/enzyme/enzyme-search-ec>>. Acesso em: 2 nov. 2016.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 28, n. 3, p. 97–113, 1998.

MURRAY, R. K. *et al.* **Harper Bioquímica Ilustrada**. 28. ed. México D.F., México: Mc Graw Hill, 2010.

NAKAHAMA, K.; IMADA, A.; IGARASI, S. Formation of L-Asparaginase by Fusarium Species. **Journal of general microbiology**, v. 75, p. 269–273, 1973.

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

OHNUMA, T. *et al.* Biochemical and Pharmacological Studies with Asparaginase in Man. **Cancer Research**, v. 30, n. SEPTEMBER, p. 2297–2305, 1970.

- PALMER, E. **Lundbeck to stop making cancer drug**. Disponível em: <<http://www.fiercepharma.com/m-a/lundbeck-to-stop-making-cancer-drug%0A?>>. Acesso em: 10 nov. 2015.
- PATRO, K. K. R.; GUPTA, N. Impact of Cultural and Nutritional Conditions on L-Asparaginase Production by *Penicillium Citrinum* THOM. **International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 114–121, 2014.
- PATRO, K. K. R.; SATPATHY, S.; GUPTA, N. Evaluation of some fungi for L-asparaginase production. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, n. 4, p. 219–221, 2011.
- POCHEDLY, C. Neurotoxicity Due to CNS Therapy for Leukemia. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 3, n. 1, p. 101–115, 1977.
- PRICKETT, W. M. *et al.* Vascular targeted single-walled carbon nanotubes for near-infrared light therapy of cancer. **Nanotechnology**, v. 22, n. 45, p. 455101, 2011.
- RADHIKA TIPPANI. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the *Fusarium* sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3692–3696, 2012.
- RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. M. **Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica : bactérias, fungos e vírus**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.
- RICCARDI, R. *et al.* L-asparaginase pharmacokinetics and asparagine levels in cerebrospinal fluid of rhesus monkeys and humans. **Cancer Research**, v. 41, n. November, p. 4554–4558, 1981.
- RIZZARI, C. *et al.* Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in oncology**, v. 25, n. Suppl 1, p. S1-9, 2013.
- ROBERTS, J.; BURSON, G.; HILL, J. M. New procedures for purification of L-asparaginase with high yield from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 2117–2123, 1968.
- ROTOLI, B. M. *et al.* Inhibition of glutamine synthetase triggers apoptosis in asparaginase-resistant cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 15, p. 281–292, 2005.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. 2. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2010.
- SANSOM, C. E.; JASKOLSKI, M. **Structure, Dynamics and Electrostatics of the L-Asparaginase Catalytic Centre** Ponzan, Poland, 2004. Disponível em: <<http://www.man.poznan.pl/CBB/POSTER1/poster.html#refs>>
- SARQUIS, M. I. D. M. *et al.* Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, 2004.
- SAVITRI; ASTHANA, N.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 184–194, 2003.
- SELVIG, K.; ALSPAUGH, J. A. pH response pathways in fungi: Adapting to host-derived

and environmental signals. **Mycobiology**, v. 39, n. 4, p. 249–256, 2011.

SHAKAMBARI, G. *et al.* Industrial effluent as a substrate for glutaminase free L-asparaginase production from *Pseudomonas plecoglossicida* strain RS1; media optimization, enzyme purification and its characterization. **RSC Advances**, v. 5, n. 60, p. 48729–48738, 2015.

SHANTHIPRIYA, A. *et al.* Factors influencing L-asparaginase Production by Three Thermophilic Caprophilous Fungi. **International Journal of Pharma Sciences**, v. 5, n. 5, p. 1242–1248, 2015.

SHARMA, V.; SHARMA, A.; SETH, R. Effect of Temperature and pH variations on Growth Pattern of keratinophilic fungi from Jaipur , India. **Entomology and Applied Science Letters**, v. 3, n. 5, p. 177–181, 2016.

SHAY, J. W.; WRIGHT, W. E. Role of telomeres and telomerase in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 21, n. 6, p. 349–353, 2011.

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Biotechnological advancement in isolation of anti-neoplastic compounds from natural origin: A novel source of L-asparaginase. **Acta Biomedica**, v. 81, n. 2, p. 104–108, 2010.

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

SHRIVASTAVA, A. *et al.* Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 100, p. 1–12, 2016.

SILVA, G. A. Nanotechnology approaches to crossing the blood-brain barrier and drug delivery to the CNS. **BMC neuroscience**, v. 9, p. 1–4, 2008.

SINGH, J. *et al.* l -Asparaginase as a new molecular target against leishmaniasis: insights into the mechanism of action and structure-based inhibitor design. **Molecular BioSystems**, v. 11, p. 1887–1896, 2015.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 185, p. 389–397, 2015.

SOBOPE. **Desabastecimento da L-Asparaginase**. Disponível em: <[http://soboep.org.br/apex/f?p=106:13:0::NO::DFL\\_PAGE\\_ID:661](http://soboep.org.br/apex/f?p=106:13:0::NO::DFL_PAGE_ID:661)>. Acesso em: 7 dez. 2015.

SONG, P. *et al.* Asparaginase induces apoptosis and cytoprotective autophagy in chronic myeloid leukemia cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3861–73, 2015.

SURESH, J. V; RAJU, K. J. Studies on the production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using agro-residues under mixed substrate solid State fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 314–325, 2013.

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

TSURUSAWA, M. *et al.* L-Asparagine depletion levels and L-asparaginase activity in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia under asparaginase treatment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p. 204–208, 2004.

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

WILLEMS, L. *et al.* Inhibiting glutamine uptake represents an attractive new strategy for treating acute myeloid leukemia. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3521–3532, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Model List of Essential Medicines Essential Medicines**. [s.l: s.n.]. Disponível em:  
<<http://www.quotidianosanita.it/allegati/allegato5987253.pdf>>.

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

ZIMMER, K. R. *et al.* Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista liberato**, v. 10, n. 14, p. 123–137, 2009.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A - MATEMÁTICA DETALHADA

#### A.1 Equação da câmara de Neubauer

As leituras da câmara de Neubauer foram feitas para medir um volume certo de esporos e dessa maneira inocular sempre  $10^5$  conídios/mL. A equação é uma proporção entre a quantidade desejada e a quantidade lida no microscópio:

*Conídeos na Câmara = Conídeos no meio*

$$\text{Leitura} \times \text{diluição} \times F_{\text{câmara}} \times v = \frac{10^5 \text{ con.}}{\text{ml}} \times 60 \text{ ml}$$

Onde Leitura é o numero de conídios observados na câmara, diluição é o fator  $10^2$  do inóculo lido,  $F_{\text{câmara}}$  é a constante  $10^4$  vem das dimensões da câmara de Neubauer, e  $v$  é o volume a adicionar no meio de cultura [mL]. O número 60 é porque cada experimento foi calculado para 60 mL de meio. Nessa ordem de ideias, o volume é:

$$v [\mu\text{l}] = \frac{6 \times 10^6 \times 1000}{\text{leitura} \times 10^6} = \frac{6000}{\text{leitura}}$$

Então, de um volume diluído com **20** conídios na meia, **300  $\mu\text{L}$**  do volume concentrado original são adicionados ao meio de cultura.

#### A.2 Interpolação da linha reta “concentração de amônio vs. Absorbância lida no espectrofotômetro”

Uma solução mãe de  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de sulfato de amônio (seco) é preparada. Posteriormente, seis diluições são preparadas a partir dessa solução para usá-las como pontos padrão da curva de calibração. Os pontos regularmente usados foram 60, 50, 25, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Adicionalmente, se usou água destilada como branco. Todos os pontos da curva foram sometidos às mesmas condições que as amostras para padronizar a leitura. Todos os pontos foram lidos em triplicata e se construiu o Gráfico 5 com as médias dos dados. A Tabela 10 resume as informações dos padrões preparados e lidos.

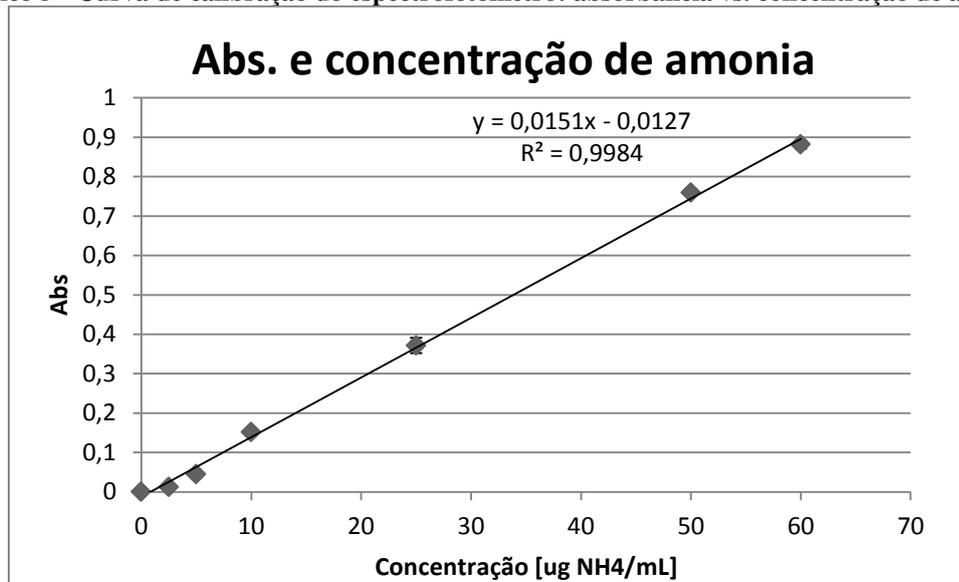
Tabela 10 - ABS. dos padrões para a curva de calibração

Abs. e concentração de amônia						
	Abs			Méd	SD	[ug.mL <sup>-1</sup> ]
Br	0	0		0	0	0
P1	0,011	0,015	0,011	0,01233	0,00231	2,5
P2	0,043	0,045	0,046	0,04467	0,00153	5
P3	0,162	0,143	0,15	0,15167	0,00961	10
P4	0,39	0,373	0,351	0,37133	0,01955	25
P5	0,757	0,768	0,752	0,759	0,00819	50
P6	0,89	0,87	0,884	0,88133	0,01026	60

Fonte: próprio autor

Após de obter uma linha reta tipo  $Y = MX + B$ , com  $Y$  = absorvância e  $X$  = concentração, um valor lido no espectrofotômetro é interpolado da maneira seguinte:

Gráfico 5 - Curva de calibração do espectrofotômetro: absorvância vs. concentração de amônia



Fonte: próprio autor(Curva exemplo. Setembro 26, 2015)

$$ABS = 0,0151 \times [am\hat{o}nio] - 0,0127 \rightarrow [am\hat{o}nio] = \frac{ABS + 0,0127}{0,0151}$$

Uma leitura de **0,602** ABS então:

$$[am\hat{o}nio] = \frac{0,602 + 0,0127}{0,0151} = 40,7 \mu g NH_4^+ / ml$$

## ANEXOS

## ANEXO A - MEIO SÓLIDO CZAPEK-DOX

**Tabela 11 - Meio sólido Czapek-DOX**  
 MéiosólidoCzapek-Dox

Sacarose	30g	18g
NaNo <sub>3</sub>	3g	1,8g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1,3g	0,78g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5g	0,3g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,005g	0,003g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01g	0,006g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01g	0,006g
KCl	0,5g	0,3
Ágar	15g	9g
Água destilada até completar	1000 mL	600 mL

Fonte: (FRISVAD; SAMSON, 2004)

A Tabela 11 mostra o procedimento para preparar 600 ml e 1000 ml de médio. A mistura de 1000 mL consegue preparar 30 placas (aprox.) e a mistura de 600 mL, 18 (aprox.). O procedimento em ordem é:

- 1) Misturar os reagentes com menos do total da água e sem o ágar.
- 2) Concertar o pH a 6,3 (após da mistura o pH deve estar ao redor de 8,0 unidades)
- 3) Adicionar e misturar com o ágar
- 4) Autoclavar e verter.

## ANEXO B - REAGENTES DE LABORATÓRIO

### AB.1 Solução 1,5 M de ácido tricloro acético TCA

- 1) Pesar 122,5 g de TCA
- 2) Diluir o sólido a temperatura ambiente
- 3) Completar até 500 mL com água destilada em uma proveta de laboratório
- 4) Autoclavar e armazenar

### AB.2 Solução 1M(pH 7) de Tris HCl

- 1) Pesar 77,34 g de Tris HCl
- 2) Diluir o sólido a temperatura ambiente
- 3) Ajustar o pH a 7.0 (o pH inicial da solução deve estar abaixo de 3)
- 4) Completar até 500 mL com água destilada em uma proveta de laboratório
- 5) Autoclavar e armazenar

### AB.3 Solução de sulfato de amônio e preparação dos padrões da curva analítica

- 1) Pesar 0,0458 g de sulfato de amônio seco
- 2) Completar até 25 mL com água destilada em uma proveta

Para obter sulfato de amônio seco pode-se pesar uma quantidade maior e deixar 24 horas em um forno a 50 °C. Deve-se deixar permanentemente o sulfato de amônio em um dessecador logo de ser tirado do forno para manter a mínima humidade. Os padrões se preparam com se mostra na Tabela 12.

**Tabela 12 - Padrões da curva analítica de amônio**

Padrão	[ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ]	Amônio	Água
P6	60	120 $\mu\text{L}$ de Solução principal	880 $\mu\text{L}$
P5	50	100 $\mu\text{L}$ de Solução principal	900 $\mu\text{L}$
P4	25	500 $\mu\text{L}$ de padrão P5	500 $\mu\text{L}$
P3	10	100 $\mu\text{L}$ de padrão P5	400 $\mu\text{L}$
P2	5	100 $\mu\text{L}$ de padrão P5	900 $\mu\text{L}$
P1	2,5	500 $\mu\text{L}$ de padrão P2	500 $\mu\text{L}$

Fonte: próprio autor

**AB.4 Reagente de Nessler como indicador de amônio (1000 mL)**

1. Diluir 61,75 g de iodeto de potássio (KI) em 200 mL de água ultra pura livre de amônia
2. Diluir 180 g de hidróxido de potássio (KOH) em 250 mL de água ultra pura livre de amônia
3. Diluir 25 g cloreto de mercúrio (II) ( $\text{HgCl}_2$ ) em 400 mL de água ultra pura livre de amônia quente. Essa solução deve ser saturada. A fração 25/400 é aproximada.
4. Pesar 0,75 g de iodeto de potássio por aparte.
5. Misturar a solução (3) na solução (1) ate precipitar o iodeto de mercúrio (II), um sólido vermelho.
6. Adicionar à solução anterior o composto (4)
7. Adicionar a solução (2) à anterior quando estiver fria e ajustar o volume total a 1000 mL.

O reagente de Nessler deve ser conservado em garrafa âmbar em frio para evitar a rápida oxidação do composto de mercúrio. A água utilizada foi água destilada de osmose reversa.