



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES E L-ASPARAGINASE PELO USO DE
FUNGOS**

TAIS MAGALHÃES ABRANTES PINHEIRO

UBERLÂNDIA – MG

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO DE BIOCOSURFACTANTES E L-ASPARAGINASE PELO USO DE
FUNGOS**

Tais Magalhães Abrantes Pinheiro

Orientadores:

Dr. Ubirajara Coutinho Filho (UFU)

Dra. Vicelma Luiz Cardoso (UFU)

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

UBERLÂNDIA – MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P654p Pinheiro, Taís Magalhães Abrantes, 1986-
2017 Produção de biossurfactantes e l-asparaginase pelo uso de fungos /
Taís Magalhães Abrantes Pinheiro. - 2017.
73 f. : il.


Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Coorientadora: Vicelma Luiz Cardoso.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Engenharia Química.
Inclui bibliografia.

1. Engenharia química - Teses. 2. Levedos - Teses. 3. Fungos -
Aplicações industriais - Teses. 4. Agentes ativos de superfícies - Teses. I.
Coutinho Filho, Ubirajara. II. Cardoso, Vicelma Luiz. III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química. IV. Título.

CDU: 66.0

TESE DE DOUTORADO DE TAIS MAGALHÃES ABRANTES PINHEIRO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE
DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
ENGENHARIA QUÍMICA, EM 27/07/2017.

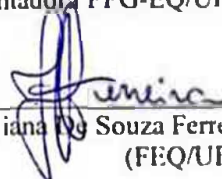
BANCA EXAMINADORA:



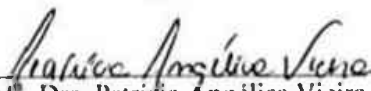
Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
(Orientador - PPG-EQ/UFU)



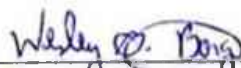
Prof.^a. Dra. Vicelma Luis Cardoso
(Co-Orientadora PPG-EQ/UFU)



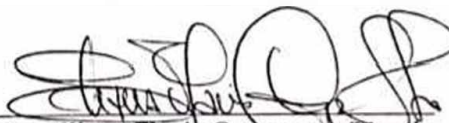
Prof.^a. Dra. Juliana de Souza Ferreira
(FEQ/UFU)



Prof.^a. Dra. Patricia Angélica Vieira
(FEQ/UFU)



Prof. Dr. Wesley da Silva Borges
(Curso de Química/UI.BRA)



Prof. Dra. Eliana Flavia Camporesi Servulo
(Escola de Química/UFRJ)

...Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo... "

ÁLVARO DE CAMPOS, 1928

AGRADECIMENTOS

Esta tese não foi feita só por mim, portanto o mérito não pode ser só meu. Por trás destas linhas, tabelas e gráficos existe muito tempo e dedicação de muitas outras pessoas que precisam ser citadas aqui em forma de agradecimento. Por esse motivo quero agradecer inicialmente os funcionários, técnicos e professores da Faculdade de Engenharia Química da UFU, agradeço também a FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Tive o privilégio de conhecer muita gente neste período de estudo na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, de algumas pessoas levarei exemplos verdadeiramente positivos e que me inspiram a ser melhor e querer sempre fazer o melhor, de outras levo o exemplo do que não quero ser e do que não devo ser em minha vida, especialmente no âmbito profissional. Contudo, felizmente, os exemplos positivos prevaleceram e devo grande parte do que penso e do que sou a tudo que vivenciei dentro desta instituição.

Durante o mestrado e o doutorado tive a honra de ser orientada pelo professor Ubirajara Coutinho Filho, não tenho como o agradecer a tudo o que já fez e ainda faz por mim, sempre disposto a ajudar. Exemplo de professor, cientista, orientador e de pessoa. Gostaria de agradecer, também, minha co-orientadora, Vicelma Luís Cardoso. Agradeço especialmente os colegas de laboratório, por compartilharem comigo as dificuldades e alegrias do dia a dia, especialmente as minhas amigas “cabritinhas”.

A outra parte de quem somos, sem dúvida, se trata dos afetos que encontramos ao longo de nossas vidas, por isso, aos meus gostaria que ficasse aqui registrado o meu mais profundo agradecimento. Primeiramente a Carol, Nayara e Paulinha, amigas para toda a vida, para o que der e vier... Como já diria Mario Quintana: "Há 2 espécies de chatos: os chatos propriamente ditos e os amigos, que são os nossos chatos prediletos."

Agradeço a minhas tias, Dalva e Dagmar, e a minha prima querida, Isadora, pelo apoio incondicional de sempre. A meus irmãos, Rafael e Cauê, obrigada pela força, apoio e palhaçadas, porque a vida é melhor assim e que seja sempre leve e engraçada, mesmo nos momentos tensos. Um agradecimento especial ao Cauê por ter me dado a alegria de ser tia do menino mais lindo do mundo, o Heitor.

Cassio, meu namorado amado, sempre me ajudando e me apoiando em tudo que faço, agradeço a ele por tudo que já vivemos e pela alegria que é estar ao seu lado! E finalmente, os mais importantes, minha mãe e meu pai, Iara e Jorge, pois devo a eles

tudo que sou, desde os primeiros passos até o que tudo que celebro hoje. Amo muito vocês!

É por isso, e por todos estes aqui citados, que considero ser este um trabalho que, definitivamente, não é só meu, tem um pouco de cada uma dessas pessoas nesta tese e nesta conquista, é por isso que acredito que o mérito não deva ser atribuído somente a mim, mas a todos nós. Obrigada à todos por tudo!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 - Fungos.....	4
3.2 - Biotecnologia.....	7
3.2 - Surfactante.....	10
3.3 - L-asparaginase.....	15
3.4 - Produção de L-asparaginase e biossurfactantes por fermentações.....	20
CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA.....	23
4.1 - Produção de surfactantes.....	23
4.1.1 - Microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes.....	23
4.1.2 - Fermentação submersa para produção de biossurfactantes.....	23
4.1.3 - Parâmetros da fermentação: biomassa, surfactante e glicose.....	24
4.1.4 - Colapso da gota e espalhamento da gota.....	25
4.1.5 - Índice de emulsificação (E24).....	25
4.1.6 - Tensão superficial.....	25
4.1.7 - Concentração micelar crítica (CMC).....	26
4.1.8 - Atividade Hemolítica.....	26
4.1.9 - Estabilidade do Biossurfactante.....	26
4.1.10 - Espectroscopia de infravermelho.....	26
4.2 - Produção de L-asparaginase e protease.....	27
4.2.1 - Microrganismos utilizados na produção de L-asparaginase.....	27
4.2.2 - Fermentação em estado sólido para produção de L-asparaginase.....	27
4.2.3 - Atividades da protease.....	29
4.2.4 - Atividades da L-asparaginase.....	30
4.2.5 - Avaliação das condições de fermentação.....	31
4.2.6 - Precipitação das enzimas.....	33

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS	35
5.1 - Resultados/Biossurfactantes.....	35
5.1.1 - Seleção dos microrganismos produtores e temperatura de produção	35
5.1.2 - Seleção do meio para produção de biossurfactantes.....	37
5.1.3 - Testes complementares.....	39
5.1.4 - Ensaio para determinação do tempo de fermentação.....	40
5.1.5 - Ensaio para verificação da estabilidade dos biossurfactantes.....	43
5.1.6 - Caracterização parcial das moléculas dos biossurfactantes produzidos.....	47
5.2 - Resultados da produção de L-asparaginase.....	48
5.2.1 - Teste preliminar avaliativo e adaptativo dos fungos.....	48
5.2.2 - Avaliação do uso da fermentação submersa como forma de preparo do inóculo....	49
5.1.3 - Avaliação do tamanho ideal das esferas de vidro e do tempo ideal para a ruptura das células.....	50
5.2.4 - Avaliação do aproveitamento da L-asparaginase intracelular nas fermentações em estado sólido.....	52
5.2.5 - Planejamento Plackett-Burman.....	53
5.2.6 - Otimização do processo de produção de L-asparaginase.....	55
5.2.7 - Avaliação da adição de água ao longo da fermentação.....	57
5.2.8 - Precipitação de protease e avaliação do aproveitamento desta enzima no processo de produção da L-asparaginase.....	58
CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES.....	60
CAPÍTULO 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE 1	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração dos diferentes tipos de hifas: a) septadas; b) cenocíticas.....	5
Figura 2: Colônia de <i>Aspergillus niger</i> diferenciando as hifas vegetativas e aéreas.....	6
Figura 3: Ciclos celulares das leveduras: a) brotamento; b) fissão.....	7
Figura 4: Esquema das forças intermoleculares em líquidos.....	11
Figura 5: Emulsão.....	11
Figura 6: Diferentes tipos de micelas.....	12
Figura 7: Estrutura química de alguns surfactantes: (a) (i) mono-ramnolípídeo, (ii) di-ramnolípídeo; (b) fosfolípídeo.....	13
Figura 8: Reação catalisada pela L-asparaginase.....	17
Figura 9: Fermentação em estado sólido.....	21
Figura 10: Fermentação submersa.....	22
Figura 11: Ilustração do banho de gelo.....	29
Figura 12: Esquema das análises protéicas.....	30
Figura 13 : Esquema da precipitação das enzimas.....	33
Figura 14: Efeito do tempo de fermentação na concentração celular.....	40
Figura 15: Efeito do tempo de fermentação na produção de biossurfactante.....	41
Figura 16: Parâmetros da fermentação: a) concentração de glicose; b) produtividade volumétrica (P_{vol}) e c) conversão de biossurfactante por massa celular ($Y_{p/s}$).....	42
Figura 17: Efeito da temperatura na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e b) emulsificação.....	44
Figura 18: Efeito da salinidade na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e b) emulsificação.....	45
Figura 19: Efeito do pH na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e.....	46
Figura 20: Espectroscopia de infravermelho dos biossurfactantes produzidos.....	47
Figura 21: Avaliação da rede neural: a) fase de treino, b) fase de teste.....	55
Figura 22: Modelo de otimização: a) curva de nível e b) tridimensional.....	56
Figura 23: Recuperação da L-asparaginase por etanol a) L-asparaginase não precipitada; b) L-asparaginase recuperada no meio sólido.....	58

Figura 24: Recuperação da Protease por etanol: a) protease não precipitada; b) protease recuperada no meio sólido.....	59
Figura 25: Rede neural artificial.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metabólitos fúngicos usados como produtos farmacêuticos e agrícolas.....	9
Tabela 2: Principais grupos e surfactantes.....	15
Tabela 3: Principais preparações com uso clínico.....	18
Tabela 4: Identificação dos microrganismos estudados na produção de surfactantes.....	23
Tabela 5: Composição dos meios analisados para produção de biossurfactantes.....	24
Tabela 6: Identificação dos microrganismos estudados na produção de L-asparaginase.....	27
Tabela 7: Meios testados para a avaliação do melhor inóculo.....	28
Tabela 8: Planejamento Plackett-Burman.....	31
Tabela 9: Variáveis do planejamento Plackett-Burman.....	31
Tabela 10: Ensaios do modelo de rede neural.....	32
Tabela 11: Precipitação de protease e asparaginase.....	34
Tabela 12: Resultados dos testes exploratórios para determinação dos microrganismos produtores de biossurfactante.....	36
Tabela 13: Leveduras selecionadas pelos testes exploratórios.....	37
Tabela 14: Resultados dos testes exploratórios para determinação do meio de produção de biossurfactantes.....	38
Tabela 15: Resultados dos testes exploratórios complementares.....	39
Tabela 16: Resultados da produção de protease dos testes preliminares em farelo de arroz.....	48
Tabela 17: Resultados da produção de protease dos testes preliminares em farelo de trigo.....	49
Tabela 18: Fungos selecionados para produção de L-asparaginase.....	49
Tabela 19: Resultados da atividade de protease na verificação da necessidade do preparo do inóculo.....	50
Tabela 20: Tamanho das esferas de vidro utilizadas na ruptura das células.....	51
Tabela 21: Resultados da atividade de L-asparaginase para determinar melhor tempo de ruptura das células.....	51
Tabela 22: Resultados da atividade da L-asparagina produzida intracelularmente e extracelularmente, nos diferentes inóculos.....	52
Tabela 23: Resultados do Planejamento Plackett-Burman.....	53

Tabela 24: Avaliação e significância do planejamento Plackett-Burman.	54
Tabela 25: Continuação do Planejamento Plackett-Burman, análise da necessidade de sais e outras fontes de carbono.	54
Tabela 26: Avaliação da adição de água ao longo da fermentação.	57

RESUMO

Diversas pesquisas demonstram o potencial dos fungos para metabolizar produtos comercialmente importantes, como ácidos orgânicos, álcool, enzimas, biopolímeros, biofármacos, entre outros. O presente trabalho visa a produção de compostos fúngicos de interesse farmacêutico: biossurfactantes e L-asparaginase

O trabalho visou à utilização de diversas leveduras provenientes do continente Antártico para a seleção de microrganismos produtores de biossurfactantes, além de utilizar outros diferentes fungos para avaliar a produção de L-asparaginase. Foram utilizadas 16 leveduras para o estudo de produção de biossurfactantes e 9 fungos distintos para a produção de L-asparaginase. Para cada microrganismo realizou-se ensaios exploratórios, a fim de selecionar cepas capazes de produzir biossurfactantes por fermentações submersas e L-asparaginase por fermentações em estado sólido (FES). Dentre as leveduras testadas, cinco se mostraram aptas para a produção de biossurfactante, destacando-se o *Leucosporidium scotti*, ainda não mencionado na literatura como produtor de surfactante, que produziu 7,5 g/L de glicolípídeos em 48 horas de fermentação em meio universal para leveduras. Para a produção de L-asparaginase utilizando *Aspergillus terreus* a melhor atividade enzimática encontrada foi de 414,89 U/kg, para dois dias de fermentação farelo de arroz e adição de água de 4,5 mL.

Palavras-chave: leveduras, fungos, biossurfactante, L-asparaginase.

ABSTRACT

Several researches have demonstrated the potential of fungi to metabolize commercially important products, such as organic acids, alcohol, enzymes, biopolymers, biopharmaceuticals, among others.. The objective of the work was the production of pharmaceutical compounds: biosurfactants and L-asparaginase

In the study, several yeasts from the Antarctic continent were used to select microorganisms that produce biosurfactants, and also used different fungi to evaluate the production of L-asparaginase. Sixteen yeasts were used for the production of biosurfactants and nine different fungi for the production of L-asparaginase. For each microorganism, exploratory tests were carried out for the selection of strains producing biosurfactants by submerged fermentations and L-asparaginase by solid state fermentations.

In the production of biosurfactants five yeasts proved to be suitable for production, especially *Leucosporidium scotti*, not yet mentioned in the literature as a producer of surfactant, which produced 7.5 g / L glycolipids. For the production of *Aspergillus terreus* L-asparaginase the best enzymatic activity was 414.89 U/kg, for two days of rice bran fermentation and addition of 4.5 mL water.

Keywords: yeast, fungi, biosurfactants, L-asparaginase.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos muito importantes para o desenvolvimento da ciência, uma vez que são objeto de estudo em diversas áreas do conhecimento. Essa importância é ainda mais notória nas áreas ligadas à biotecnologia e bioquímica (BENNETT, 1998).

Diversas pesquisas mostram a capacidade dos fungos de sintetizar produtos de grande importância industrial, como por exemplo, ácidos orgânicos, álcool, enzimas, biopolímeros, biofármacos, entre outros produtos (CHOW; TING, 2015; FERREIRA et al., 2017; GREWAL; KALRA, 1995; JAYUS et al., 2016; KIRAN et al., 2009; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017).

A ênfase no presente trabalho é a produção de compostos fúngicos de interesse farmacêutico: biossurfactantes e L-asparaginase.

A indústria do surfactante movimentou, em 2014, cerca de US\$ 29,3 bilhões e estima-se, que até 2022, atingirá US\$ 47,53 bilhões (REPORTLINKER, 2016).

A maioria dos surfactantes, produzidos mundialmente, são derivados de petróleo, o que acena com a necessidade de se desenvolver pesquisas com o intuito de produzi-los por fontes biológicas, chamados de biossurfactantes (CAMEOTRA et al., 2010).

Biossurfactantes são produtos químicos muito utilizados nas indústrias, principalmente nas áreas de medicamentos, alimentos, cosméticos e limpeza, além de serem muito importante nos processos de remediação e biorremediação (ANJUM et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; RODRIGUES, 2015; SÁNCHEZ; SÁNCHEZ; FLORES, 2013; SOUZA; PENNA; OLIVEIRA, 2014).

No caso específico dos biossurfactantes utilizados como fármacos diversos trabalhos relatam a importância do tensoativo devido à potencialidade em novas aplicações, como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunomoduladores, anticancerígenos e antioxidantes (CHEN et al., 2006; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; DONIO et al., 2013; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PANDIT et al., 2014; SHAH et al., 2005).

A L-asparaginase é uma enzima fundamental no mercado farmacêutico, estima-se que 40% de todas as enzimas comercializadas para fins médicos são L-asparaginase (VIMAL; KUMAR, 2017). Esta é enzima é utilizada, principalmente, como quimioterápico no tratamento da leucemia e seu efeito antileucêmico resulta do esgotamento da asparagina na célula cancerosa, impossibilitando seu desenvolvimento (DUVAL et al., 2002).

Estima-se que 13,7 pessoas, por ano, em cada 100.000 são diagnosticadas com leucemia, sendo que 6,8 pessoas morrem em função da doença, também a cada ano (NIH, 2014).

A L-asparaginase utilizada no tratamento da leucemia tem baixa toxicidade, no entanto pode causar mal-estar ao paciente, além de ter alto custo de produção e purificação. Em função disso, surge à necessidade de se produzir L-asparaginase por diferentes mecanismos visando o bem-estar dos pacientes e menores custos de produção (AL RABAYAH; JADDOUH; AMIREH, 2016; VIDYA et al., 2017).

Diante do exposto, os fungos são boas alternativas à produção convencional de surfactantes e L-asparaginase. Novos estudos para produção de biosurfactantes é importante para se descobrir microrganismos capazes de produzir surfactantes, superar os altos custos de produção e desenvolver novas moléculas de alto valor agregado. Pesquisas para produção de L-asparaginase podem ajudar a desenvolver formas de produção que diminua os efeitos colaterais aos pacientes e também menores custos de produção

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho tem um foco de interesse geral e alguns interesses específicos.

Interesse Geral:

- Avaliar a produção de biossurfactantes e L-asparaginase pelo uso de fungos.

Interesses Específicos:

- Investigar a produção de biossurfactantes utilizando leveduras do continente Antártico em fermentações submersas;
- Selecionar leveduras capazes de produzir biossurfactantes em fermentações submersas;
- Caracterizar os biossurfactantes obtidos nas fermentações;
- Investigar a produção de L-asparaginase por diferentes fungos em fermentações em estado sólido;
- Selecionar fungos capazes de produzir L-asparaginase em fermentações em estado sólido;
- Otimizar a produção de L-asparaginase;
- Avaliar a ampliação da economia do processo de produção da L-asparaginase pelo aproveitamento da protease.

CAPÍTULO 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Fungos

Os fungos pertencem ao reino Fungi, também conhecido por "Reino Misterioso" por ter a biomassa menos explorada dentre os demais reinos (PETERSEN, 2013). Cerca de 120 mil espécies já foram registradas e acredita-se que o número real alcance 1,5 milhões (HAWKSWORTH, 2001; KIRK et al., 2008).

A biodiversidade impressionante deste reino é representada por esporos microscópicos, cogumelos gigantes e vários organismos multicelulares em diversas cores, tamanhos e formas (PETERSEN, 2013).

Antes de 1969 os fungos eram classificados como vegetais e a microbiologia era uma ramificação da botânica. O que apoiava tal classificação era a presença de parede celular na constituição desses organismos. Entretanto pesquisas subseqüentes em evolução e fisiologia forçaram os pesquisadores a ordenar os fungos em um grupo diferente dos vegetais. Nasceu o Reino Fungi (REDDY, 2001). O primeiro pesquisador a propor que os seres fossem classificados em 5 diferentes reinos foi WHITTAKER (1969) em um trabalho intitulado "New Concepts of Kingdoms Organisms".

A catalogação das espécies é feita por fotografias, desenhos e medições (WARD, 1896) e são descritos por suas características anatômicas, fisiológicas e comportamentais como nutrição, estado vegetativo, parede celular, ciclo de vida, reprodução, propágulos ou órgãos de disseminação, esporocarpio ou corpo frutífero, *habitat* e papel ecológico (WEBSTER; WEBER, 2007).

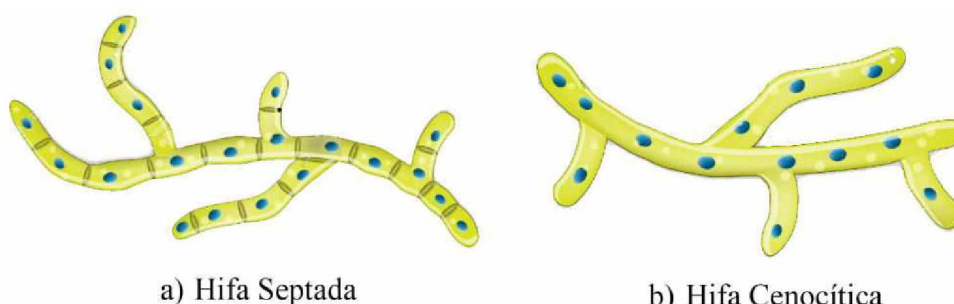
Os fungos são organismos eucariontes, cujas células têm um núcleo e organelas envoltos por membranas e são encontrados em diversos nichos ecológicos. A nutrição dos fungos se faz por absorção, uma vez que produzem enzimas extracelulares capazes de hidrolisar macromoléculas, possibilitando que sejam utilizadas no processo metabólico. É difícil definir as características gerais pertencentes aos fungos devido à enorme biodiversidade fisiológica e morfológica presente neste Reino. Além disso, a classificação destes seres evoluiu com novas pesquisas e descobertas (DUQUE, 2008; JIANG; AN, 2000).

A classificação atual do Reino Fungi, aceita pelos micologistas, agrupa no reino Fungi o seguinte Filo: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota e Basidiomycota (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O crescimento dos fungos ocorre em colônias e estas são descritas como estruturas vegetativas, uma vez que são compostas por células que participam do catabolismo e crescimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O talo, ou corpo, de um fungo filamentososo é formado por hifas que são longos filamentos de células interconectadas. Sob o ponto de vista estrutural, as hifas podem ser divididas em: septadas e cenocíticas. As primeiras apresentam paredes cruzadas, ou septos transversais, que as dividem em distintas unidades celulares uninucleadas e as segundas não possuem septos e são formados por longas células contínuas com vários núcleos, Figura 1.a e Figura 1.b. Apesar de algumas hifas serem septadas e outras cenocíticas, geralmente, as hifas formadas por diversos septos têm aberturas, poros, por onde ocorre a junção dos citoplasmas de células adjacentes sendo, portanto, organismos cenocíticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1: Ilustração dos diferentes tipos de hifas: a) septadas; b) cenocíticas.



a) Hifa Septada

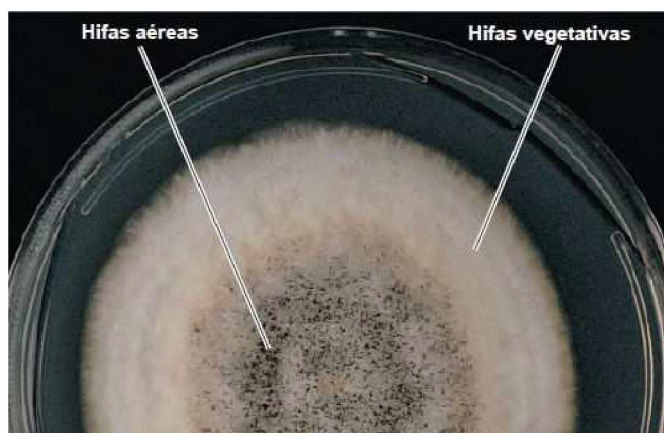
b) Hifa Cenocítica

Fonte: Adaptada de Duque, 2008.

As hifas podem ser vegetativas ou reprodutivas. Vegetativas são aquelas capazes de absorver nutrientes, enquanto as reprodutivas, também chamadas de aéreas, estão envolvidas no processo de reprodução, pois sustentam os esporos reprodutivos. Em condições ambientais favoráveis, as hifas crescem e formam uma massa filamentosa visível a olho nu conhecida como micélio, como apresentado na Figura 2 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

No entanto nem todos os fungos crescem como hifas, alguns tem crescimento unicelular, leveduras. As leveduras são tipicamente esféricas ou ovais e se reproduzem por brotamento ou fissão. Assim como os fungos filamentosos, as leveduras se encontram em diversos ambiente naturais como: solo, folhas, trato digestivo de animais, entre outros (WEBSTER; WEBER, 2007).

Figura 2: Colônia de *Aspergillus niger* diferenciando as hifas vegetativas e aéreas.



Fonte: Tortora; Funke; Case, 2012.

Na reprodução por brotamento, uma protuberância formada pela célula parental ocorre na superfície celular externa dando origem a uma estrutura denominada broto. Tal estrutura alonga-se e o núcleo da célula parental se divide ocasionando a migração de um dos núcleos para seu interior. O broto, então, se separa da célula parental devido à formação da parede celular sintetizada entre os dois, como pode ser visto na Figura 3.a. Durante o ciclo da vida, uma célula de levedura pode se reproduzir, por brotamento, e gerar mais de 24 células. Entretanto existem brotos que não se separam das células parentais e acabam dando origem a estruturas alongadas chamadas de pseudo-hifas. Fungos da espécie *Candida albicans*, por exemplo, se fixam em células epiteliais humanas na forma de levedura, mas somente na forma de pseudo-hifas são capazes de invadir tecidos profundos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

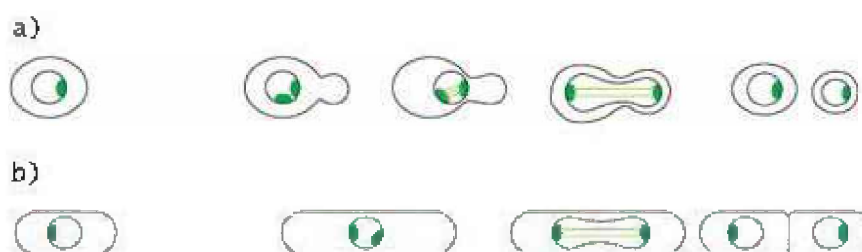
Já na reprodução por fissão, as células bastonetes crescem por alongamento das extremidades e se dividem a partir da formação de um septo em seu centro. Os núcleos se dividem dando origem a duas "células filhas", como mostra a Figura 3.b (ALBERTS et al., 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os fungos geralmente são adaptados a ambientes que poderiam ser hostis a outros seres, uma vez que são quimio-heterotróficos e, portanto, capazes de absorver nutrientes sem a necessidade de ingeri-los (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Algumas necessidades ambientais e características nutricionais dos fungos são:

- Melhor crescimento em ambientes nos quais o pH é próximo a 5;
- Fungos são, em sua maioria, aeróbicos;

- Leveduras são, em sua maioria, anaeróbicas facultativas;
- Fungos são, em sua maioria, resistentes à pressão osmótica o que os torna capazes de crescer em altas concentrações de açúcar ou sal;
- Fungos são capazes de crescer em ambientes com baixa umidade;
- Fungos necessitam de menor quantidade de nitrogênio para o crescimento quando comparado às bactérias, por exemplo.
- Fungos são capazes de metabolizar carboidratos complexos, como por exemplo, a lignina.

Figura 3: Ciclos celulares das leveduras: a) brotamento; b) fissão.



Fonte: Adaptada de Alberts et al., 2010.

Tais características permitem que os fungos se desenvolvam em substratos inusitados, como paredes de banheiro, couro de sapatos e jornais velhos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Alguns microrganismos são capazes de crescer em ambientes considerados inóspitos, como por exemplo: ambientes muito quentes ou muito frios; muito ácidos ou muito alcalinos; extremamente salgados; extremamente secos; com baixíssima quantidade de nutrientes; ambientes radioativos; de pressão muito alta ou no vácuo. No entanto estes ambientes são cheios de vida. Os seres que habitam estes ambientes são chamados de extremófilos, e desafiam os limites da vida (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

3.2 - Biotecnologia

A biotecnologia é a aplicação de sistemas biológicos e organismos em processos técnicos e industriais. Nesse contexto os fungos mostram-se muito importantes na ciência e na indústria, se destacando por serem a força motriz da indústria farmacêutica (BENNETT, 1998; JIANG; AN, 2000).

A biotecnologia é uma área do conhecimento abrangente que envolve desde fermentações para a produção de vinho e cerveja à penicilina e biofármacos. A cerveja, o vinho, o pão, o koji (alimento tipicamente japonês) e outros alimentos fermentados fazem parte da dieta humana há milênios. O estudo científico desses processos está na origem da microbiologia e da bioquímica (BENNETT, 1998).

A descoberta da penicilina, relatada no artigo abaixo, foi o episódio que alavancou o desenvolvimento da microbiologia industrial moderna (WYATT, 1991):

"...em Londres, em 1928, Alexandre Fleming dedicou-se a estudar a bactéria *Staphylococcus aureus*, responsável pelos abscessos em feridas abertas provocados por armas de fogo. Estudou tão intensamente que, um dia, exausto, resolveu-se dar de presente alguns dias de férias. Saiu, deixando os recipientes de vidro do laboratório, com as culturas da bactéria, sem supervisão. Esse desleixo fez com que, ao retornar, encontrasse um dos vidros sem tampa e com a cultura exposta e contaminada com o mofo da própria atmosfera.

Estava prestes a jogar todo o material fora quando, ao olhar no interior do vidro, percebeu que onde tinha se formado bolor, não havia *Staphylococcus* em atividade. Concluiu que o mofo, oriundo do fungo *Penicillium*, agia secretando uma substância que destruíra a bactéria.

Ainda que por acaso, estava criado o primeiro antibiótico da história da humanidade - a penicilina - que é para tantos cientistas uma das mais vitais descobertas da história humana. Para eles, a medicina só se tornou ciência verdadeira a partir dos antibióticos. Antes deles, era um bom exercício para o diagnóstico das enfermidades infecciosas. Quanto ao tratamento e à cura, só a interpretação religiosa podia compreender ou ajudar.

Com a descoberta de Alexander Fleming, abriam-se as portas de um novo mundo, com o surgimento de uma grande indústria que passou a se dedicar à produção de penicilina e outros antibióticos responsáveis pela possibilidade de vida com qualidade para pessoas que sofriam de tuberculose, pneumonia, meningite, sífilis, entre outras infecções.

A penicilina só foi verdadeiramente isolada em 1938, por Ernst B. Chain e Howard W. Florey, também na Inglaterra. Embora logo após a descoberta de Fleming tivesse surgido uma onda de desconfiança sobre a eficácia do bolor, ela não impediu que cientistas médicos continuassem estudando a substância. Com a Segunda Guerra Mundial e a necessidade de ajudar cada vez mais os feridos, Dr. Florey, patologista da Universidade de Oxford, tomou para si a pesquisa da penicilina, retomando o cultivo do bolor de Fleming e dele extraíndo um pó marrom. A substância foi testada em 80 tipos de bactérias, provando sua eficácia contra os micróbios e inatividade com relação aos glóbulos brancos." ¹

¹ A descoberta da penicilina é contada no artigo: "Alexander Fleming e a descoberta da penicilina" em 2009.

Diversos estudos mostram a capacidade dos fungos de produzir ácidos orgânicos, bioetanol, biosurfactante e até mesmo quimioterápicos, como a enzima asparaginase (CHOW; TING, 2015; GREWAL; KALRA, 1995; JAYUS et al., 2016; KIRAN et al., 2009). Diversos metabólitos fúngicos já são produzidos e comercializados em grande escala. Alguns exemplos de antibióticos e produtos agrícolas estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Metabólitos fúngicos usados como produtos farmacêuticos e agrícolas.

Metabólitos	Fungo Produtor	Produto
Penicilina	<i>Penicillium sp.</i>	Antibiótico
Cephalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>	Antibiótico
Mevinolina	<i>Aspergillus sp.</i>	Tratar hipercolesterolemia
Ciclosporina	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Imunossupressor
Ácido Micofenólico	<i>Penicillium sp.</i>	Imunossupressor
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Antifúngico
Estrobilurina	<i>Strobilurus tenacellus</i>	Fungicida - Agricultura
Ácido fusídico	<i>Fusidium coccineum</i>	Antibiótico
Ergotamina	<i>Claviceps purpurea</i>	Vasoconstritor
Giberelinas	<i>Fusarium moniliforme</i>	Crescimento de plantas
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i>	Crescimento de bovino

Fonte: Adaptada de Jiang; An, 2000.

As leveduras também são potenciais produtoras de biomoléculas funcionais, como produtos químicos finos, enzimas, substâncias bioativas, proteínas e nanopartículas. Todas as biomoléculas funcionais possuem aplicações nas indústrias de produtos alimentícios, químicos, agrícolas e também na produção de biocombustíveis e fármacos (CHI et al., 2016; ROSE; HARRISON, 1993).

O crescente interesse das indústrias na melhoria da produção das biomoléculas atraiu a atenção da comunidade científica, alavancando os estudos com microrganismos, entre eles as leveduras. A seleção de culturas isoladas de leveduras de ecossistemas variados tornou-se uma possibilidade de ser explorada. Entre esses ecossistemas, a Antártica se destaca por ter extraordinária biodiversidade ainda pouco explorada (SOUSA et al., 2016).

Alguns estudos com leveduras de ambientes frios comprova o potencial uso desses microrganismos na produção de álcool, biosurfactante, ácidos orgânicos, enzimas, entre outros produtos (BUZZINI; MARGESIN, 2014; CHAUD et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2015; SOUSA et al., 2016).

3.2 - Surfactante

O termo surfactante, em inglês "*surfactant*", é uma abreviatura da expressão *surface active agent* e, portanto, se refere à capacidade destas substâncias de alterarem a superfície de contato entre dois líquidos imiscíveis (HOLMBERG et al., 2002).

Esta alteração na superfície de contato ocorre devido à presença concomitante dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na estrutura da substância que permite a formação de um filme molecular. Este filme possibilita a redução das tensões interfacial e superficial, o que provê ao surfactante características específicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A porção apolar da molécula é hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser aniônicos, catiônicos ou anfotérica (HOLMBERG et al., 2002).

Os surfactantes aniônicos são os mais comercializados e possuem cargas negativas na porção ativa da superfície da molécula, como por exemplo, os sabões, RCOO^-Na^+ , e o alquilbenzeno sulfonato, $\text{RC}_6\text{H}_4\text{SO}_3^-\text{Na}^+$. Analogamente, os surfactantes catiônicos possuem a porção ativa com carga positiva, como as aminas de cadeia longa, $\text{RNH}_3^+\text{Cl}^-$, e o cloreto de amônio quaternário, $\text{RN}(\text{CH}_3)^{3+}\text{Cl}^-$ (ROSEN; KUNJAPPU, 2012)

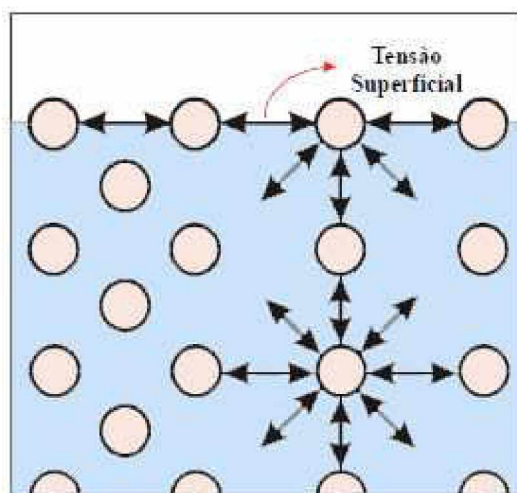
Já os surfactantes anfotéricos são aqueles que podem se comportar como catiônicos ou aniônicos, por possuírem na sua porção ativa da superfície tanto cargas positivas quanto negativas. Este é o caso dos aminoácidos de cadeia longa, $\text{RN}^+\text{H}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$, e as sulfobetáinas, $\text{RH}^+(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ (ROSEN; KUNJAPPU, 2012).

Os surfactantes têm capacidades únicas que justificam a grande utilização destas substâncias nas indústrias, como: reduzir as tensões superficiais e formar emulsificações (MULLIGAN, 2005).

A tensão superficial é uma força gerada pelas moléculas. Abaixo da superfície cada molécula é igualmente atraída pelas demais, não existindo tendências diferentes de atração. Porém as moléculas presentes na superfície de um líquido interagem apenas com as vizinhas, não existindo atração para cima, logo a superfície do líquido se comporta como um filme fino elástico e esticado, como mostra a Figura 4 (HEWITT, 2002).

Portanto, a adição de um surfactante à água, gera um rearranjo das moléculas para minimizar a repulsão entre as caudas hidrofóbicas e a água. Neste novo arranjo, os grupos polares ficam na solução aquosa, próximo da superfície, e os grupos apolares ficam na interface água-ar, minimizando a interação das caudas com a água, gerando uma diminuição na tensão superficial (SCHRAMM; STASIUK; MARANGONI, 2003).

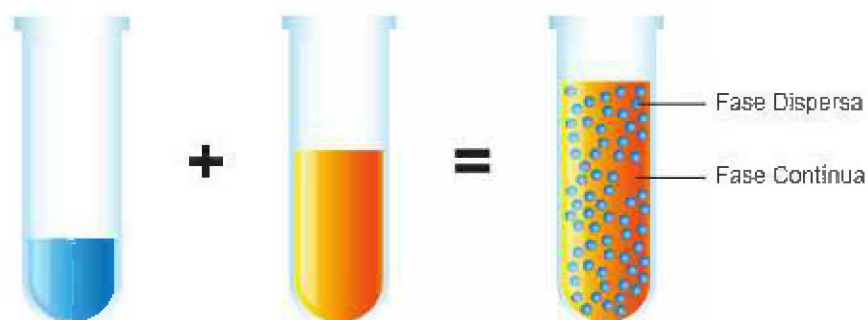
Figura 4: Esquema das forças intermoleculares em líquidos.



Fonte: Piróllo, 2006.

A emulsificação é uma suspensão estável de dois diferentes líquidos imiscíveis. Em uma emulsão existem duas fases, a fase dispersa e a fase contínua, sendo a primeira formada por gotículas muito finas dispersas em um líquido, e a segunda formada pelo próprio líquido em que as gotículas se encontram dispersas, (Figura 5).

Figura 5: Emulsão.



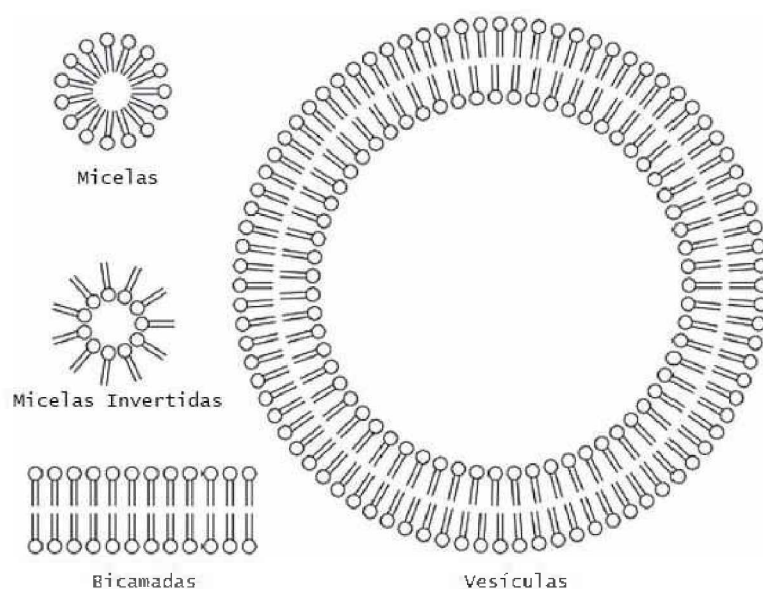
Fonte: INCBIO, 2016.

Outra característica muito importante dos surfactantes é a formação de micelas, estruturas auto-organizadas que dependem da estrutura química do surfactante e da concentração micelar crítica (MIYAKE; YAMASHITA, 2017). Esta formação ocorre devido à tendência dos líquidos a adotarem uma forma que minimize a sua área superficial (HEWITT, 2002). Geralmente a forma adotada é a esférica, por ser a menor razão possível

entre área superficial e volume, porém estas micelas podem adotar outras formas (RANDHAWA, 2015), como mostra a Figura 6.

Os surfactantes representam uma classe química muito importante e muito utilizada nas indústrias. Os principais usos industriais dos tensoativos são como componente ou aditivo dos produtos para: lavanderias, cosméticos, processamento de agroprodutos e alimentos, produção de pesticidas e herbicidas. Além disso, é utilizado na recuperação de óleo, remediação e biorremediação de ambientes contaminados (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; MULLIGAN, 2005; RON; ROSENBERG, 2002).

Figura 6: Diferentes tipos de micelas.



Fonte: Adaptada de Randhawa, 2015.

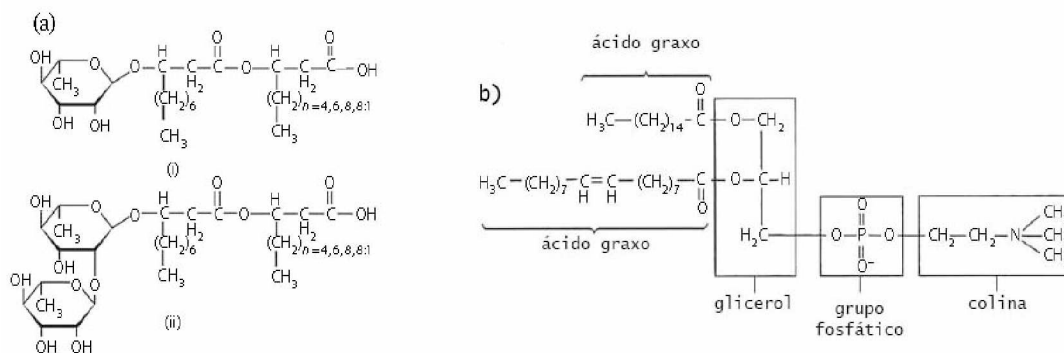
A indústria do surfactante girou US\$ 29,3 bilhões em 2014 e estima-se que atingirá cerca de US\$ 47,53 bilhões até 2022, com taxa de crescimento anual de 6,23%. Este crescimento promissor se deve aos investimentos e projetos econômicos dos países emergentes, como China, Brasil e Índia. O comércio mundial de surfactantes aniônicos alcançou, em 2014, a cifra de 7500 KT e de surfactantes não-iônicos, cerca de 6400 KT. Já os anfotéricos tiveram comercialização discreta quando comparado às demais. Atualmente, os surfactantes sintéticos são os mais comercializados no mercado mundial. Entretanto, com as pressões ambientais e as regulamentações cada vez mais rigorosas, espera-se que a

comercialização dos surfactantes de origem natural cresça com taxas mais altas no futuro (REPORTLINKER, 2016; STRATISTICS MRC, 2015).

Os compostos tensoativos de origem microbiana, chamados de biossurfactantes, são subprodutos metabólicos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). São biologicamente produzidos por bactérias e fungos e podem ser sintetizados a partir de diferentes substratos, como açúcares, óleos e resíduos (LIN, 1996). A maioria dos tensoativos microbianos são aniônicos ou neutros, porém alguns podem ser catiônicos, como por exemplo aqueles que possuem amina em sua estrutura química.

Tensoativos naturais podem ser classificados como glicolipídeos, lipopeptídeos, fosfopeptídeos, ácidos graxos, lipídeos neutros, compostos poliméricos e particulados, dependendo da estrutura química da parte hidrofóbica e hidrofílica. A porção apolar dos biossurfactantes é formada, geralmente, por ácidos graxos de cadeia longa, ácidos graxos hidroxilados ou ésteres de ácido graxo; enquanto a porção hidrofílica pode ser formada por hidrato de carbono, aminoácidos, peptídeos, ácidos carboxílicos, fosfatos ou álcoois (MULLIGAN, 2005). As estruturas químicas dos ramnolipídeos e dos fosfolipídeo estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Estrutura química de alguns surfactantes: (a) (i) mono-ramnolipídeo, (ii) di-ramnolipídeo; (b) fosfolipídeo.



Fonte: Adaptada de Randhawa, 2015.

Os biossurfactantes, quando comparados aos surfactantes sintéticos, são menos prejudiciais ao meio ambiente por serem biodegradáveis. Os tensoativos sintéticos não são facilmente decompostos na natureza, porque o grupo hidrofóbico formado por caudas ramificadas são de difícil degradação (KOSARIC, 2008; SCOTT; JONES, 2000).

A maioria dos tensotivos sintéticos e comerciais são derivados do petróleo e a substituição de surfactantes químicos por biossurfactantes produzidos a partir de matérias-primas sustentáveis, apesar de oferecer inúmeras vantagens, esbarra em altos custos de produção (CAMEOTRA et al., 2010).

Outras vantagens dos surfactantes naturais, quando comparado aos surfactantes sintéticos são:

- estabilidade em condições extremas (temperatura, salinidade, pH),
- alta biodegradabilidade,
- baixa toxicidade e capacidade de ser produzido *in situ* a partir de matérias-primas renováveis.

Além disso, os biossurfactantes podem apresentar potencial em novas aplicações no âmbito da medicina. Existem diversos estudos que demonstram bons resultados na utilização de biossurfactantes como antibacterianos, antifúngicos, antivirais, imunomoduladores, anticancerígenos e antioxidantes (CHEN et al., 2006; DÍAZ DE RIENZO et al., 2015; DONIO et al., 2013; EMMERT; HANDELSMAN, 1999; PANDIT et al., 2014; SHAH et al., 2005).

Há muito tempo, já se sabe que algumas bactérias e fungos, em condições adequadas, são capazes de sintetizar lipídeos que se acumulam intracelularmente e são liberados como biossurfactantes em meio de cultura (HOMMEL et al., 1987).

As bactérias mais conhecidas por produzirem biossurfactante são *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodococcus erithropolis*. No entanto, vários fungos também os produzem, como as cândidas e os bacilos. A Tabela 2 apresenta de forma concisa os grupos e principais surfactantes sintetizados por microrganismos (KARANTH; DEO; VEENANADIG, 1999).

Diversos fatores podem influenciar na quantidade e na qualidade do surfactante produzido pelos microrganismos. As condições da fermentação que interferem na produção do biossurfactantes são: temperatura, pH, agitação e o tipo da fonte da carbono. Porém as concentrações de fósforo, nitrogênio, manganês e ferro, também interferem na síntese do biossurfactante (DESAI; IBRAHIM, 1997).

Como os biossurfactantes ainda não são capazes de competir com os surfactantes sintéticos pelo alto custo de produção, é necessário o estudo da combinação ótima de fatores que influenciam na produção do biosurfactante com o intuito de reduzir seus custos e aumentar sua competitividade no mercado (FIECHTER, 1999).

Tabela 2: Principais grupos e surfactantes.

Glicolipídeos	
Ramnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Trealose lipídeos	<i>Rhodococcus erithropolis</i> <i>Arthobacter sp.</i>
Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i> , <i>C. apicola</i>
Manosileritritol lipídeos	<i>C. antartica</i>
Lipopeptídeos	
Surfactina/iturin/fengicina	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosina	<i>P. fluorescens</i>
Líquenissina	<i>B. licheniformis</i>
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>
Fosfolipídeos	
	<i>Acinetobacter sp.</i>
	<i>Corynebacterium lepus</i>
Antibióticos de Superfície Ativa	
Gramicidina	<i>Brevibacterium brevis</i>
Polimixina	<i>B. polymyxa</i>
Antibiótico TA	<i>Myxococcus xanthus</i>
Ácidos graxos ou lipídeos neutros Ácidos Corynomicolic	
	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Tensio ativos poliméricos	
Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasan	<i>A. radioresistens</i>
Liposan	<i>C. lipolytica</i>
Lipomanan	<i>C. tropicalis</i>
Biosurfactantes particulados - Vesículas microbianas inteiras	
	<i>A. calcoaceticus</i>
	<i>Cyanobacteri</i>

Fonte: Adaptada de Karanth N. G. K., Deo P. G., 1999.

3.3 - L-asparaginase

A L-asparaginase é uma enzima muito utilizada no tratamento de leucemia linfoblástica aguda e linfoma linfoblástico, principalmente em crianças, além de outras patologias leucêmicas como a doença de Hodgkin, a leucemia mielomonocítica aguda,

linfossarcoma e o melanossarcoma (DUVAL et al., 2002; GALINDO-RODRÍGUEZ et al., 2017; SOARES et al., 2002).

Foi usada pela primeira vez clinicamente em 1966 para o tratamento de um garoto de 8 anos de idade diagnosticado com leucemia linfoblástica grau 5. A L-asparaginase administrada como medicamento logrou, em curto tempo, regredir parcialmente a doença (DOLOWY et al., 1966) e desde então continua sendo utilizada e estudada como quimioterápico em todo mundo (DUVAL et al., 2002; PUI et al., 1981; TALLAL et al., 1970).

O projeto Globocan da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) estimou que mais de 10 milhões de pessoas no mundo são portadoras de algum tipo de câncer e que mais da metade dos doentes falecem devido à doença. Os tipos de câncer com maior taxa de mortalidade são de pulmão, fígado, estômago, colorretal, mama, esôfago, pâncreas, próstata, colo do útero e leucemia (IARC, 2012).

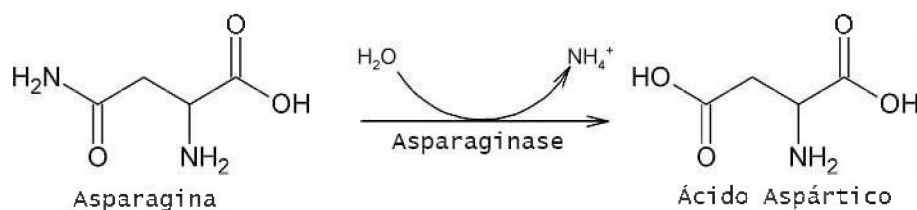
A leucemia é de origem desconhecida e trata-se de uma doença maligna dos glóbulos brancos. Este tipo de câncer ocorre devido ao crescimento desenfreado de células jovens anormais na medula óssea, que substituem as células normais sanguíneas (INCA, 2013). Neste grupo de tumores incluem-se: leucemia linfóide, leucemia mielóide, leucemia monocítica, além de outras leucemias de células de tipo especificado e leucemia de tipo celular não especificado. A cada ano, 13,7 pessoas em cada 100.000 são diagnosticadas com leucemia e dessas, a metade vai a óbito (NIH, 2014).

A importância médica desta enzima pode ser estimada pelo seu valor de mercado, uma vez que 40% das enzimas comercializadas como fármacos são L-asparaginase. A grande utilidade desta enzima e a produção menor que a demanda, eleva seu custo (VIMAL; KUMAR, 2017).

O efeito antileucêmico desta enzima resulta do esgotamento da L-asparagina nas células cancerosas (DUVAL et al., 2002). Tanto as células normais, quanto as células cancerosas necessitam do aminoácido L-asparagina para o pleno funcionamento do metabolismo celular. Mas enquanto as células saudáveis conseguem produzir a quantidade necessária de L-asparagina para a manutenção de suas funções, as células tumorais não produzem L-asparagina e utilizam a L-asparagina presente no plasma em seu metabolismo. Logo, a aplicação de L-asparaginase no organismo gera o esgotamento de L-asparagina no plasma, impossibilitando que a célula cancerosa mantenha-se viva (MCCREDIE; HO; FREIREICH, 1973; SHRIVASTAVA et al., 2016).

A L-asparaginase hidrolisa a L-asparagina em ácido aspártico e amônia. Primeiro a L-asparagina liga-se à enzima, liberando a amônia e formando o intermediário aspartil. Este intermediário reage com a água e o produto formado é o ácido aspártico, Figura 8 (AGHAIYPOUR; WLODAWER; LUBKOWSKI, 2001).

Figura 8: Reação catalisada pela L-asparaginase.



Fonte: Adaptada de Roth, 2011.

A L-asparaginase utilizada no tratamento da leucemia tem baixa toxicidade, no entanto pode causar mal-estar ao paciente. O atual tratamento com L-asparaginase pode causar nos pacientes reações que limitam seu uso, como: hipersensibilidade devido ao fato de ser uma proteína estranha ao organismo humano; e efeitos adversos provocados pela liberação dos produtos da reação e pela inibição da síntese protéica devido aos baixos níveis de L-asparagina disponíveis na circulação sanguínea (HOLLAND et al., 2000). Seus principais efeitos colaterais não são graves e incluem: urticária, edema, febre e erupções na pele. Porém, podem ocorrer casos graves como anafilaxia, pancreatite, diabetes e anormalidades da coagulação, causando possível trombose intracraniana e hemorragia (HIJIYA; SLUIS, 2016; PUI et al., 1981; ROBERSON et al., 2008). Cerca de 75% dos pacientes tratados pela administração da L-asparaginase têm alguma reação alérgica (WACKER et al., 2007).

Atualmente, existem três principais preparações de L-asparaginase utilizadas no tratamento da leucemia. A primeira é L-asparaginase nativa derivada da bactéria *Escherichia coli*, a segunda é composta pela combinação do polietilenoglicol e asparaginase nativa, e a última é a L-asparaginase proveniente da bactéria *Erwinia chrysanthemi* (PANETTA et al., 2009). As principais preparações usadas clinicamente estão apresentadas na Tabela 3.

Estas preparações da enzima possuem diferentes graus de toxicidade, estas diferenças, se devem às distintas atividades da L-glutaminase contida nas formulações. A L-glutamina pode potencialmente aumentar a atividade antitumoral da asparagina, porém a hidrólise da L-glutamina libera como subproduto da reação o ácido glutâmico (glutamato de sódio), que

pode causar toxicidade, em especial neurotoxicidade. No entanto as toxicidades são semelhantes para todas as L-asparaginases comercialmente disponíveis, as exceções são as reações alérgicas, menores frequentes no tratamento com PEG-asparaginase. Além disso, a asparaginase não costuma afetar a mucosa oral, o sistema gastrointestinal ou os folículos pilosos (HOLLAND et al., 2000).

Tabela 3: Principais preparações com uso clínico.

Produto comercial	Empresa Produtora	Fonte Biológica
Asparaginase medac®	Medac, Kyowa Hakko	<i>E.coli</i>
Crasnitin®	Bayer AG ^a	<i>E.coli</i>
Ciderolase®	Rhône-Poilenc Rorer	<i>E.coli</i>
Elspar®	MSD, Rhône-Poulec Rorer ^a	<i>E.coli</i>
Erwinase®	Speywood	<i>Erwinia chrysanthemi</i>
Oncaspar®	Enzo, Rhône-Poulec Rorer, Medac	<i>E.coli</i>

^a - esta preparação não é mais produzida

FONTE: Adaptada de Müller; Boos, 2017.

Estas preparações da enzima possuem diferentes graus de toxicidade e estas diferenças se devem às distintas atividades da L-glutaminase contida nas formulações. A L-glutamina pode potencialmente aumentar a atividade antitumoral da asparagina, porém a hidrólise da L-glutamina libera como subproduto da reação o ácido glutâmico (glutamato de sódio), que pode causar toxicidade, em especial neurotoxicidade. No entanto as toxicidades são semelhantes para todas as L-asparaginases comercialmente disponíveis, as exceções são as reações alérgicas, menos frequentes no tratamento com PEG-asparaginase. Além disso, a asparaginase não costuma afetar a mucosa oral, o sistema gastrointestinal ou os folículos pilosos (HOLLAND et al., 2000).

Se o paciente tiver hipersensibilidade ao tratamento com a L-asparaginase nativa da *E.coli*, então o tratamento deve ser descontinuado e substituído por outro, podendo ser alterado para outra forma da asparaginase, desde que esta mudança não cause reações cruzadas entre os tratamentos (HOLLAND et al., 2000).

A L-asparaginase produzida pela bactéria *Erwinia chrysanthemi*, vendida comercialmente com o nome de Erwinaze® e produzida pela EUSA Pharma (EUA), foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), em 18 de novembro de 2011, como componente quimioterápico no tratamento de pacientes com leucemia linfoblástica aguda que

desenvolveram hipersensibilidade a enzima da *E.coli*. A liberação baseou-se em um estudo clínico com 58 pacientes que apresentaram reações alérgicas ao tratamento da L-asparaginase da *E.coli* e não puderam continuar recebendo o tratamento com a enzima. As reações mais graves apresentadas pelo grupo foram reações alérgicas como anafilaxia, pancreatite, transaminases anormais, coagulopatias, hemorragia, náuseas, vômitos e hiperglicemia. No entanto, as reações foram semelhantes às já vistas na L-asparaginase derivada da *E. coli* (NIH, 2014).

A L-asparaginase nativa da *E. coli*, vendida com o nome comercial Elspar® foi amplamente utilizada até 2012. Porém, no ano em questão, o medicamento foi descontinuado e substituído pela PEG-asparaginase e pela L-asparaginase da *Erwinia chrysanthemi* (FDA, 2012; HORVATA et al., 2016).

A produção de enzimas é um processo de baixo impacto ambiental, com custo variável conforme segmento industrial que utilizará a enzima. Os custos são maiores caso sejam utilizadas como biofármacos, devido ao alto custo da purificação, exigida pelos órgãos reguladores. Logo, os padrões de qualidade exigidos pelos órgãos regulamentadores e a demanda maior que a produção acabam por aumentar o valor de comercialização das enzimas utilizadas como biofármacos (ABUD, 2005; VIMAL; KUMAR, 2017).

Para a L-asparaginase não é diferente e o custo de produção do quimioterápico ainda é alto, o que gera um necessidade de investigar e estudar formas de se produzir o medicamentos a preços mais acessíveis (WIETCHOREK et al., 2013).

Na maioria dos estudos sobre produção de L-asparaginase, sabendo-se que esta é sintetizada intracelularmente, utiliza-se métodos mecânicos para romper a parede celular. Entretanto esse processo apresenta várias desvantagens como alto custo e grande necessidade de mão de obra, o que praticamente inviabiliza a produção em grande escala, sendo útil apenas em laboratórios. Além disso, ao se romper as células todo material interno é liberado no meio gerando um produto final altamente impuro, contendo proteínas, ácidos nucleicos e fragmentos de parede celular. Logo o custo de purificação é ainda maior. Um método ideal seria aquele que fosse rápido e de baixo custo. Uma substituição plausível, aos métodos mecânicos, é a utilização de agentes químicos capazes de romper as células ou de aliviar a resistência da barreira de permeabilidade da membrana celular (ABUD, 2005).

O microrganismo produtor da L-asparaginase é um fator fundamental do processo que pode tornar a produção economicamente viável, uma vez que certos microrganismos sintetizam a enzima com menor concentração de outros subprodutos, reduzindo o custo da purificação. Além disso, novos microrganismos produtores podem sintetizar uma enzima com

características melhoradas que causem menores efeitos colaterais, como o estudo de Krasotkina et al. (2004), que utilizou a bactéria *Erwinia carotovora* e concluiu que a asparaginase por ela produzida teve menores efeitos colaterais nos pacientes quando comparada com a asparaginase de *E. coli* e *Erwinia chrysanthemi*.

O principal uso da L-asparaginase é como biofármaco no tratamento de leucemia. No entanto outras pesquisas investigam seu emprego na produção de insulina. Na indústria de alimentos é empregada na produção de comida cozida e congelada, visando à redução da concentração de acrilamida, um composto altamente carcinogênico formado no processamento de alimento a altas temperaturas (LAVINE; DICINTIO, 1982; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016). A acrilamida é formada através da reação de Maillard, reação entre sacarídeos e o grupo NH₂ de aminoácidos. No caso da acrilamida, os grupos amino são originários de um aminoácido particular, a L-asparagina. Como a remoção de acrilamida de alimentos congelados é impraticável, logo as estratégias de mitigação se concentraram na limitação da formação de acrilamida. A aplicação da enzima L-asparaginase fornece um possível método alternativo para a mitigação de acrilamida, logo a enzima pode reduzir de forma seletiva o nível de L-asparagina livre, hidrolisando-a para o ácido L-aspartico e amônia (CIESAROVÁ, 2016; DIAS et al., 2017; SHI et al., 2017).

3.4 - Produção de L-asparaginase e biossurfactantes por fermentações

Diversos estudos da literatura destacam a importância da produção da L-asparaginase por fermentações em estado sólido como forma de redução dos custos do processo (DIAS et al., 2015; HYMAVATHI et al., 2009; VARALAKSHMI; JAYA RAJU, 2013).

A fermentação em estado sólido, Figura 9, é definida como a fermentação que utiliza como substrato algum sólido na ausência ou com pouca água, mantendo apenas a umidade necessária para manutenção do metabolismo microbiano (PANDEY, 2003).

A história dessa tecnologia mostra que esta foi ignorada pelos países ocidentais, após a década de 40, devido à adaptação do uso da fermentação submersa. Acredita-se que este abandono ocorreu devido ao desenvolvimento da penicilina. O antibiótico era produzido por fermentações submersas e sua imensa importância durante a Segunda Guerra Mundial fez com que este tipo de fermentação se tornasse o modelo a seguir. Essa tendência continuou durante as décadas seguintes.

Porém entre os anos 1960 e 1970 a produção de micotoxinas, por fermentação em estado sólido, começou a crescer e mudar o cenário mundial das fermentações. A produção de

alimentos bovinos enriquecidos com proteínas foi outro grande marco para a fermentação em estado sólido, uma vez que foram desenvolvidas técnicas de utilização de resíduos agroindustriais, oferecendo um processo único para agregar valor aos resíduos de baixo valor agregado. Desde então, há crescimento contínuo na área apresentada, com destaque para a última década (PANDEY, 2003).

Figura 9: Fermentação em estado sólido.



Fonte: Autor.

A tecnologia de fermentação em estado sólido é largamente empregada na produção de combustíveis, alimentos, produtos químicos e farmacêuticos. A aplicação dessa tecnologia em processos biológicos tem várias vantagens, como a utilização de resíduos industriais como substratos na fermentação em estado sólido sendo, portanto, uma alternativa à processos convencionais agregando valor aos produtos antes tidos como resíduos não utilizáveis. A melhor compreensão da engenharia bioquímica, particularmente da modelagem matemática e do *design* de biorreatores, tornou possível a utilização da fermentação em estado sólido em escala industrial (PANDEY, 2003).

A fermentação submersa na produção de biossurfactantes é a mais relatada na literatura, embora haja estudos com fermentação em estado sólido (JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2016; LOPES, 2017).

A fermentação submersa, Figura 10, é definida como a fermentação que ocorre em substratos líquidos de fluxo livre. Neste tipo de fermentação, os substratos são consumidos rapidamente pelos microrganismos e os compostos bioativos são secretados no caldo fermentado. Esta tecnologia é adequada para utilização de bactérias e leveduras que

necessitam de alto teor de umidade para seu metabolismo (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Figura 10: Fermentação submersa.



Fonte: Autor.

Por fim, os dois tipos de fermentação, tanto submersa quanto a fermentação em estado sólido, possuem amplas aplicações e benefícios. No entanto muitas pesquisas com substratos sustentáveis serão ainda necessárias para garantir a melhor produtividade e qualidade de um lado e menor impacto ambiental e menores custos de produção de outro (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

CAPÍTULO 4 - METODOLOGIA

4.1 - Produção de surfactantes

4.1.1 - Microrganismos utilizados na produção de biossurfactantes

Foram utilizadas 16 leveduras do continente antártico identificadas por métodos convencionais de biologia molecular no Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola da UNICAMP (CPQBA) (DUARTE et al., 2013). Na Tabela 4, estão apresentadas as leveduras com seus respectivos locais de coleta. As leveduras foram mantidas à -16°C em meio contendo 50% glicerol e 50% de meio universal para leveduras (MU) de composição (g/L): extrato de levedura, 3,0; peptona, 5,0; glicose, 20,0.

Tabela 4: Identificação dos microrganismos estudados na produção de surfactantes.

Microrganismo	Local de coleta	Espécie
L21	Animal: Isópode	<i>Pichia guilliermondii</i>
L55	Animal: Ascidia	<i>Pichia anômala</i>
L44	Animal: Salpa	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>
L71	Animal: Esponja	<i>Bullera pseudoalba</i>
L58	Animal: Ascidia	<i>Candida sake strain</i>
L75	Amostra de Solo	<i>Candida glabosa</i>
L84	Sedimento Marinho	<i>Candida glabosa</i>
L81	Sedimento Marinho	<i>Debaryomyces sp.</i>
L92	Líquen de rocha	<i>Cryptococcus victoriae</i>
L97	Líquen de rocha	<i>Cryptococcus victoriae</i>
L121	Sedimento Marinho	<i>Cryptococcus adeliensis</i>
L122	Sedimento Marinho	<i>Cryptococcus victoriae</i>
L116	Sedimento Marinho	<i>Leucosporidium scotti</i>
L117	Sedimento Marinho	<i>Leucosporidium scotti</i>
L118	Sedimento Marinho	<i>Leucosporidium scotti</i>
L120	Sedimento Marinho	<i>Leucosporidium scotti</i>

4.1.2 - Fermentação submersa para produção de biossurfactantes

Nos testes foram utilizados três diferentes tipos de meio fermentativo, cada um com diferentes composições, conforme a Tabela 5.

Tabela 5: Composição dos meios analisados para produção de biossurfactantes.

Compostos	Meio A/(M.U) (g/L)	Meio B (g/L)	Meio C (g/L)
Glicose	20	50	20
Extrato de levedura	3	1,5	3
Peptona	5	--	5
Azeite de oliva	--	50	20
NH ₄ Cl	--	4	--
KH ₂ PO ₄	--	1	--
NaCl	--	0,1	--
MgSO ₄ .7H ₂ O	--	0,5	--

A produção de biossurfactante foi realizada em reatores cônicos com capacidade de 250 mL. Cada reator cônico contendo 100 mL do meio foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121 °C.

Foram inoculados, em cada um dos frascos, 0,017 g/L de células. Para conduzir o processo fermentativo os reatores cônicos com as leveduras foram mantidos em mesa agitadora a 100 rpm. Os parâmetros temperatura e tempo de fermentação foram determinados de acordo com o estudo.

4.1.3 - Parâmetros da fermentação: biomassa, surfactante e glicose

As concentrações das biomassas foram avaliadas pelo método gravimétrico, por meio de centrifugação a 8000 rpm por 20 minutos. A secagem da massa fez-se em estufa a 100°C até peso constante.

A concentração de surfactante foi obtida da fração extraída por acetato de etila; segundo a metodologia de MOUSSA et al. (2004); que consiste em misturar 2mL de acetato de etila e 2mL do meio fermentado centrifugado, seguido de agitação em vortex por 2 minutos. A quantificação da massa do surfactante foi realizada com 1 mL do sobrenadante e seguida de evaporação em estufa de circulação forçada a 30°C até peso constante.

A concentração de glicose foi determinada por espectrometria usando glicose-oxidase como descrito por LEARY et al. (1992).

As produtividades volumétricas (Pvol) e as conversões de biossurfactante por massa celular (Yp/s) foram calculadas utilizando as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$P_{vol} = \frac{P}{t}$$

(1)

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

(2)

Sendo P, P₀, t, X e X₀, concentração de biossurfactante ao final da produção, concentração inicial de biossurfactante, tempo de fermentação, concentração de células ao final da fermentação e concentração inicial de células, respectivamente.

4.1.4 - Colapso da gota e espalhamento da gota

As análises de colapso e espalhamento da gota são classificados como métodos qualitativos.

O teste colapso da gota foi realizado em microplacas de 96 poços com adição de 0,3 mL do meio fermentado seguido da adição de 50 µL de óleo de soja na superfície do meio. A avaliação da ação surfactante foi realizada pelo achatamento da gota.

O espalhamento da gota também é um teste qualitativo e foi avaliado pela ruptura da película superficial do óleo de soja, quando 50 µL de meio era adicionado a uma placa de Petri contendo 10 mL de água destilada e 1 mL de óleo de soja.

4.1.5 - Índice de emulsificação (E₂₄)

O índice de emulsificação foi avaliado para os meios apolares: querosene, óleo de soja e óleo diesel. Misturou-se 4 mL de meio centrifugado e 6 mL de meio apolar em tubo de ensaio devidamente fechado, seguido de agitação em vórtex por 2 minutos. O índice de emulsificação foi determinado após 24 horas de repouso pela altura da camada emulsificada, como mostra a Equação 3:

$$E_{24} = \frac{E}{E_1} \times 100$$

(3)

sendo: E - altura da camada emulsificada (cm) e E₁ - altura total da mistura (cm).

4.1.6 - Tensão superficial

A análise da tensão superficial foi realizada utilizando tensiômetro modelo K6 da marca Krüss GmbH e placas de Petri contendo, aproximadamente, 10 mL da amostra. As análises

foram feitas em temperatura ambiente e o tensiômetro foi calibrado, conforme as especificações do fabricante, com etanol e água. A análise foi realizada com o auxílio de uma haste de 6 cm de comprimento, contendo um anel de platina-iridium de 2 cm de diâmetro em uma das extremidades. A leitura de tensão consiste em um processo de imersão e emersão do anel na superfície da amostra.

4.1.7 - Concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica foi avaliada a partir da tensão superficial do meio fermentado em diferentes concentrações do biossurfactantes obtidas por diluição do material liofilizado.

4.1.8 - Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada pela descoloração do meio ágar-sangue composto por sangue de carneiro (10,0 % v/v) e nutrientes (g/L): peptona de caseína, 15,0; peptona de carne, 4,0; extrato de levedura, 2,0; amido de milho, 1,0; cloreto de sódio, 5,0; ágar, 14,0.

4.1.9 - Estabilidade do Biossurfactante

A estabilidade do surfactante foi avaliada para temperatura, pH e salinidade do meio pelo cálculo do E24 utilizando querosene como meio apolar e pela avaliação de tensão superficial. No teste de estabilidade térmica foi testada a manutenção dos biossurfactantes nas temperaturas de 20, 40, 60, 80 e 100 °C por um período de 15 minutos. Seguiu-se a medida do E24 e índice de emulsificação. As estabilidades quanto ao pH e a salinidade foram avaliadas após 15 minutos de alteração das condições de acidez e salinidade do meio centrifugado. No teste de estabilidade para pH foram testados os pHs de 4, 6, 8, 10 e 11 e no teste de salinidade, as concentrações de NaCl testadas foram 5, 15 20, 50 e 100 g/L.

4.1.10 - Espectroscopia de infravermelho

Para a análise da espectroscopia de infravermelho (IV), os biossurfactantes foram purificados por extração com solvente. A purificação foi realizada após a retirada das células por centrifugação a 8000 rpm por 20 minutos e acidificação do meio até pH 2 utilizando uma solução de 6 M de ácido clorídrico. Como solvente extrator foi utilizada uma mistura de clorofórmio/metanol (2:1) e o surfactante produzido foi separado em rotaevaporador (IKA RV

8 VC) a 65°C e 1 atm. A análise de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro (IRPRESTIGE21 - SHIMADZU) utilizando amostras dispersas em KBr.

A espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre os grupos funcionais presentes nas moléculas, logo o objetivo é determinar os grupos funcionais presentes nos biossurfactantes produzidos. Cada grupo funcional absorve frequências características de radiação na região do IV. Os resultados possibilitam a geração de gráficos de intensidade de radiação versus frequência, que permite caracterizar as mostras.

4.2 - Produção de L-asparaginase e protease

4.2.1 - Microrganismos utilizados na produção de L-asparaginase

Nos estudos foram utilizadas 9 cepas de fungos, de acordo com a Tabela 6. Estas culturas foram cedidas pelo Prof. Adalberto Pessoa Junior do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio a 5 °C contendo meio PDA (g/L): batata, 20,0 (líquido fervido por 1 hora e coado); glicose, 20,0; ágar, 20,0.

Tabela 6: Identificação dos microrganismos estudados na produção de L-asparaginase.

Microrganismo	Espécie
PC 1.7 A	<i>Aspergillus terreus</i>
VSP-18	<i>Aspergillus terreus</i>
VSP-22	<i>Aspergillus terreus</i>
VSP-27	<i>Aspergillus terreus</i>
VSP-06	<i>Aspergillus fumigatus</i>
VSP-14	<i>Paecilomyces variotti</i>
VSP-20	<i>Aspergillus awamori</i>
OS-F16	não identificado
GUSP-3.1	não identificado

4.2.2 - Fermentação em estado sólido para produção de L-asparaginase

A produção de L-asparaginase foi realizada utilizando o microrganismo *Aspergillus terreus* (PC 1.7 A), porém também foram realizados testes comparativos com os demais fungos. A produção da enzima foi realizada em quatro etapas: preparo do inóculo, produção,

extração da enzima e ruptura das células. Sendo que nos testes preliminares não foi realizado o preparo do inóculo.

Do inóculo previamente preparado em um dos meios testados, descritos na Tabela 7, 120 mL foram transferidos para reatores cônicos com capacidade de 250 mililitros previamente esterilizados a 121 °C por 20 minutos. Esporos dos fungos, obtidos da raspagem de um tubo onde eram mantidos, foram inoculados nos reatores cônicos. As fermentações foram realizadas em mesa giratória a 120 rpm em temperatura ambiente e o tempo de fermentação do inóculo foi diferente para cada ensaio.

Tabela 7: Meios testados para a avaliação do melhor inóculo.

Inóculo	Sacarose (g/L)	NH ₄ NO ₃ (g/L)	Asparagina (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	K ₂ HPO ₄ (g/L)	MgSO ₄ (g/L)	KCl (g/L)	FeSO ₄ (g/L)
1	5	1	10	2	1	0,5	0,5	0,01
2	10	1	10	2	1	0,5	0,5	0,01
3	15	1	10	2	1	0,5	0,5	0,01
4	5	2	10	2	1	0,5	0,5	0,01
5	10	2	10	2	1	0,5	0,5	0,01
6	15	2	10	2	1	0,5	0,5	0,01
7	5	3	10	2	1	0,5	0,5	0,01
8	10	3	10	2	1	0,5	0,5	0,01
9	15	3	10	2	1	0,5	0,5	0,01
10*	30	0	0	2	1	0,5	0,5	0,01

*meio CZAPEK.

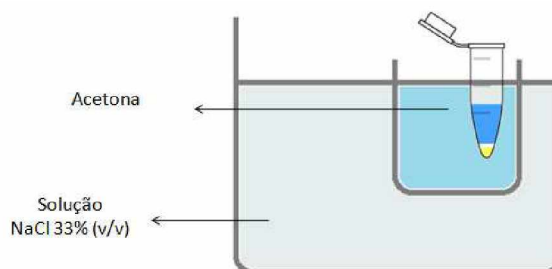
Ao terminar a fermentação do inóculo, o fermentado foi centrifugado e as células recolocadas em suspensão em 120 mL de água destilada estéril. Essas células foram, então, utilizadas nas fermentações em estado sólido.

As fermentações em estado sólido foram realizadas em reatores cônicos estáticos, com capacidade de 250 mL, contendo 10 g de farelo de arroz ou farelo de trigo e as células obtidas na etapa anterior. Tanto a umidade quanto a quantidade de inóculo e o tempo de fermentação foram definidos diferentemente para cada ensaio.

O extrato enzimático bruto foi obtido utilizando-se 50 mL de solução tween 80 (1%) sob agitação orbital a 120 rpm por 1 hora. Após a agitação o extrato enzimático foi obtido por peneiramento do material.

Para avaliar a necessidade de ruptura das células estas foram separadas e avaliadas por método gravimétrico, como já descrito no Item 4.1.2. O processo de ruptura foi realizado em tubos do tipo Eppendorf com capacidade para 2 mL, com adição de 1 mL da solução concentrada de células e 0,3 mL de esferas de vidro. O material submetido ao processo não poderia ultrapassar a temperatura de 10°C (FLORES, 2017), logo o processo de ruptura, utilizando vórtex, foi intercalado com banho de gelo, 30 segundos de agitação e 30 segundos de banho de gelo, conforme a Figura 11.

Figura 11: Ilustração do banho de gelo.



Fonte: Autor.

4.2.3 - Atividades da protease

A atividade da protease foi medida conforme o método de CHARNEY e TOMARELLI (1947). Tal método consistiu na manutenção de uma mistura de 0,5 mL de azocaseína, 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de tampão fosfato (pH 7) contida em tubos de ensaio em banho termostático a 37 °C por 40 minutos. Após essa incubação adicionou-se, em cada tubo, 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA-10%) para que a azocaseína não hidrolisada precipitasse. O material foi centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm. Separou-se de cada sobrenadante 1 mL que foi misturado a 1 mL de KOH (5 M).

Uma das características do grupo AZO é produzir coloração alaranjada em ambientes alcalinos. Assim, a mistura com hidróxido de potássio pode evidenciar a presença e atividade da protease pela avaliação da intensidade dessa cor (SOUZA, 2015). A intensidade da cor alaranjada foi medida em espectrofotômetro a 428 nm. Esta análise está esquematizada na Figura 12.a. O branco foi preparado utilizando-se água destilada em vez da amostra e os cálculos foram feitos definindo uma unidade enzimática como sendo a quantidade de enzima capaz de provocar um acréscimo de 0,1/min na absorbância.

Para o cálculo da atividade de L-asparaginase (U/kg) foi utilizada a Equação 4:

$$\frac{U}{Kg} \text{ de Prot} = \frac{Abs}{0,5 \text{ ml} \times 0,1 \text{ min}^{-1}} \times \frac{vol. \text{extraído (ml)}}{massa \text{ de sólido (g)}} \times 1000 \frac{g}{Kg} \quad (4)$$

4.2.4 - Atividades da L-asparaginase

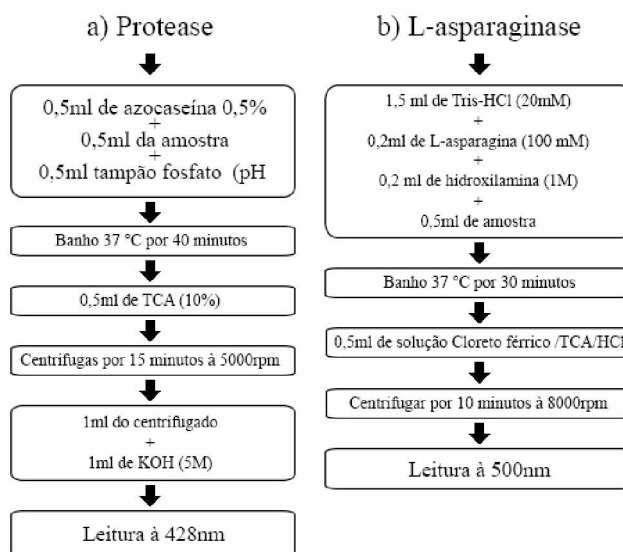
A dosagem de L-asparaginase foi realizada conforme metodologia proposta por DIVINO (2015) e esquematizada na Figura 12.b. A análise foi baseada na metodologia β -hidroxamato aspártico, que consiste em incubar por 30 minutos a 37°C, uma mistura de 1,5 mL de Tris-HCl (mM), 0,2 mL de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL de hidroxilamina e 0,5 mL de amostra. A reação foi interrompida e a mistura recebeu adição de 0,5 mL da solução cloreto férrico/ácido tricloroacético/ácido clorídrico. O material foi centrifugado por 10 minutos à 8000 rpm. A intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro à 500 nm. O branco foi preparado trocando-se a amostra por água destilada.

Nesta análise, a coloração final torna-se avermelhada devido à formação do β -hidroxamato aspártico em β -hidroxamato aspártico férrico de cor avermelhada.

Para o cálculo da atividade de L-asparaginase (U/kg) foi utilizada a Equação 5:

$$\frac{U}{Kg} \text{ de Asp} = Abs \times \frac{1 \mu\text{mol}}{0,4 Abs} \times \frac{1}{0,5 \text{ ml} \times 30 \text{ min}} \times \frac{vol. \text{extraído (ml)}}{massa \text{ de sólido (g)}} \times 1000 \frac{g}{Kg} \quad (5)$$

Figura 12: Esquema das análises protéicas.



4.2.5 - Avaliação das condições de fermentação

As condições de fermentação foram investigadas em duas etapas. Como primeira etapa da otimização foi avaliada a necessidade de complementação do meio sólido, pela adição de NaNO_3 , K_2HPO_4 , glicose e glicerol, e de avaliar as condições operacionais: umidade, pH, temperatura, tempo de fermentação e quantidade de inóculo adicionado ao sólido. Neste processo utilizou-se o Planejamento Plackett-Burman. Este é um método estatístico que tem sido amplamente utilizados como o delineamento experimental e objetiva identificar os efeitos das variáveis no fenômeno estudado (AZIZI; GHARABAGHI; SAEEDI, 2014). A Tabela 8 representa a matriz Hadamard com 12 ensaios para avaliação do efeito de cada variável e 6 análises complementares para avaliar a necessidade da adição dos nutrientes que não foram significativos. Na Tabela 9 estão dispostos os níveis para cada uma das variáveis.

Tabela 8: Planejamento Plackett-Burman.

Corrida	Umidade	NaNO_3	pH	Temperatura	Glicose	Tempo	Glicerol	Inóculo	K_2HPO_4
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 9: Variáveis do planejamento Plackett-Burman.

Nível	Umidade (g)	NaNO_3 (g)	pH	Temperatura (°C)	Glicose (g)	Tempo (Horas)	Glicerol (g)	Inóculo (mL)	K_2HPO_4 (g)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
+	12	0,02	8	35	0,1	135	0,01	6	0,01
-	6	0,01	6	25	0,05	70	0,005	3	0,005

A otimização da produção de L-asparaginase foi realizada utilizando-se rede neural artificial e considerando as variáveis que se mostraram relevantes no processo.

Na Tabela 10 estão dispostas as variáveis significativas e as 24 condições utilizadas no modelo de rede neural.

Tabela 10: Ensaios do modelo de rede neural.

Ensaios	Tempo de fermentação (Dias)	Volume de água (mL)
1	3	11
2	3	5
3	5	11
4	5	5
5	2	8
6	6	8
7	4	2
8	4	14
9	4	8
10	4	8
11	4	8
12	4	8
13	1	5
14	2	5
15	4	5
16	6	5
17	1	10
18	2	10
19	4	10
20	6	10
21	1	15
22	2	15
23	4	15
24	6	15

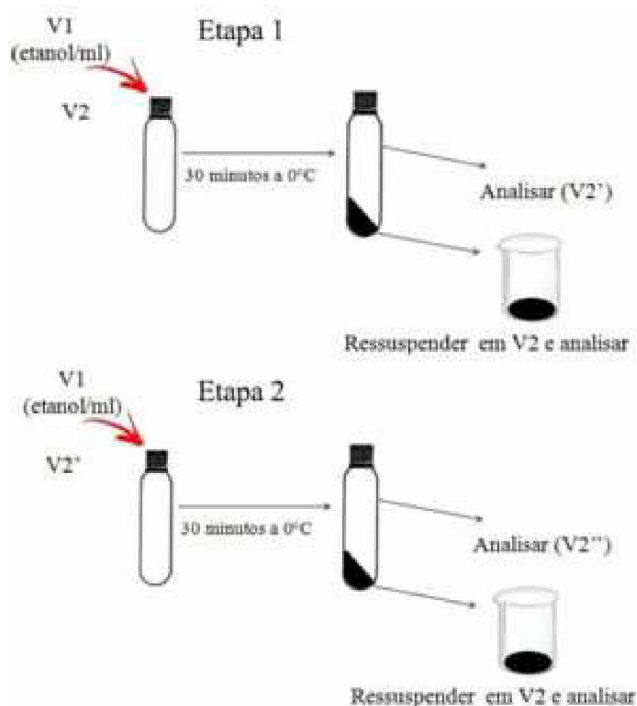
Foi utilizado um modelo de rede neural artificial, Apêndice 1, com três camadas (camada de entrada, camada oculta e camada de saída), sendo a camada oculta formada por 6 neurônios. A rede foi obtida em linguagem R utilizando o pacote AMORE (CRAN, 2017). O

modelo utilizado possuía neurônios do tipo tansig na camada oculta e purelin na camada de saída.

4.2.6 - Precipitação das enzimas

Para investigar o aproveitamento da produção de protease no processo de produção da L-asparaginase foram realizadas precipitações seqüenciais a fim de se determinar uma concentração de etanol para a separação das enzimas. Nestes testes foram realizadas três séries de experimentos em que o sobrenadante de uma etapa foi utilizado na etapa seguinte, conforme Figura 13.

Figura 13 : Esquema da precipitação das enzimas.



Diversas concentrações de etanol foram testadas variando os valores de V1 (etanol) e V2 (meio), conforme apresentados a Tabela 11.

Tabela 11: Precipitação de protease e asparaginase

	Etapa 1	Etapa 2
Série 1	V1=2 e V2=20	V1=2 e V2=20
Série 2	V1=3 e V2=19	V1=3 e V2=19
Série 3	V1=11,4 e V2=10,6	V1=3 e V2=19
% etanol		
	Etapa 1	Etapa 2
Série 1	9,1	17,35
Série 2	13,63	25,41
Série 3	51,8	58,3

CAPÍTULO 5 - RESULTADOS

5.1 - Resultados/Biossurfactantes

5.1.1 - Seleção dos microrganismos produtores e temperatura de produção

Testes exploratórios preliminares determinaram a potencialidade de produção de biossurfactantes apresentada por cada uma das 16 espécies de leveduras.

Os parâmetros utilizados nos testes para a seleção das leveduras foram: crescimento celular, tensão superficial e a capacidade de emulsificação em óleo de soja, querosene e diesel. Nos testes cujos resultados não evidenciaram diferenças significativas, o critério utilizado para a seleção das leveduras foi o índice de emulsificação. Os resultados destes testes preliminares estão apresentados na Tabela 12.

Os resultados mostram que, mesmo as leveduras sendo provenientes de ambiente frio, a maior produção de biossurfactante foi observada a 30°C, para a maioria das leveduras testadas. O melhor comportamento das leveduras nesta temperatura pode ser observado analisando o crescimento celular, as biomassas a 30°C foram maiores do que a 15°C, com exceção as leveduras L75, L84, L122, L118. Portanto todas as demais discussões são referentes aos resultados a 30°C. A tensão superficial encontrada para o meio universal para levedura foi de 61,0 mN/m e a concentração inicial de células foi de 0,017 g/L de células.

As leveduras L21 e L55, ambas do gênero *Pichia*, foram capazes de produzir biossurfactantes, no entanto a levedura L21 (*Pichia guilliermondii*) se destacou, uma vez que apresentou maior biomassa, menor tensão superficial e elevado índice de emulsificação, sendo: 6,62 g/L, 37,95 mN/m e emulsificação em querosene de 93%, respectivamente (Tabela 12).

Nos testes com *Cryptococcus* (Tabela 12) foram testadas 4 diferentes cepas e a L92 (*Cryptococcus victoriae*) mostrou maior potencial para a produção de biossurfactante, apresentando maior crescimento celular com biomassa de 1,59 g/L e altos índices de emulsificação, superiores a 60% para os diferentes meios apolares testados.

Foram submetidas aos testes exploratórios quatro diferentes cepas de *Leucosporidium*, e a cepa L120 (*Leucosporidium scotti*) se destacou entre as demais, apresentado alta biomassa, 6,28 g/L, menor tensão superficial de 47,39 mN/m, e 100% de emulsificação em óleo de soja.

Tabela 12: Resultados dos testes exploratórios para determinação dos microrganismos produtores de biossurfactante.

Microrganismos	Temperatura (°C)	Biomassa (g/L)	Tensão superficial (mN/m)	E24 (%)		E24 (%) Querosene
				Soja	Diesel	
Pichia						
L21	15°C	4,88	49,3	0	0	83
	30 °C	6,62	37,95	0	57	93
L55	15°C	1,28	48,32	88	0	0
	30 °C	1,4	49,71	90	0	35
Cryptococcus						
L92	15°C	0,68	46,42	0	0	81
	30 °C	1,59	45,51	90	95	65
L97	15°C	0,08	51,15	0	0	42
	30 °C	0,35	44,18	0	0	50
L121	15°C	0,00	46,74	100	0	0
	30 °C	0,00	0,00	0	0	0
L122	15°C	0,84	44,6	100	0	0
	30 °C	0,3	49,25	100	0	0
Leucosporidium						
L116	15°C	0,00	45,06	100	60	0
	30 °C	1,79	48,32	100	0	0
L117	15°C	0,72	49,25	100	0	40
	30 °C	5,31	48,78	100	0	0
L118	15°C	0,00	48,06	0	0	0
	30 °C	0,00	53,4	0	0	0
L120	15°C	3,9	52,96	100	0	32
	30 °C	6,28	47,39	100	0	66
Cândida						
L58	15°C	3,27	39,95	100	71	0
	30 °C	4,96	49,25	100	87	0
L75	15°C	1	32,96	52	--	0
	30 °C	0,901	39,08	100	--	100
L84	15°C	4,7	52,79	40	0	86
	30 °C	3,32	40,96	0	0	90

Cepas de cândidas foram submetidas aos testes iniciais e duas delas mostraram-se promissoras na produção de biossurfactante, L58 (*Candida sake*) e L75 (*Candida glabrosa*). Ambas são potenciais produtoras de biossurfactantes, reduziram significativamente a tensão superficial e apresentaram altos índices de emulsificação em óleo de soja e óleo diesel.

As espécies *Cystofilobasidium infirmominatum* (L44), *Bullera pseudoalba* (L71) e *Debaryomyces sp.* (L81), não foram capazes de produzir biossurfactantes e os resultados não foram apresentados.

Devido aos resultados obtidos nos testes exploratórios, as cinco leveduras selecionadas para dar continuidade aos estudos são apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13: Leveduras selecionadas pelos testes exploratórios.

Código	Leveduras Selecionadas
L21	<i>Pichia guilliermondii</i>
L58	<i>Candida sake strain</i>
L75	<i>Candida glabosa</i>
L92	<i>Cryptococcus victoriae</i>
L120	<i>Leucosporidium scotti</i>

5.1.2 - Seleção do meio para produção de biossurfactantes

Nestes testes foram utilizados três diferentes tipos de meio fermentativo, conforme a Tabela 5, descrita no item 4.1.2.

Para a seleção do meio de produção foram feitas análises qualitativas, como colapso e espalhamento da gota, e quantitativas, como tensão superficial e índice de emulsificação em óleo de soja, diesel e querosene. O critério de escolha utilizado foi o mesmo empregado na escolha dos microrganismos e, portanto, o índice de emulsificação foi o critério diferencial. Os resultados obtidos neste teste exploratório estão apresentados na Tabela 14.

Analisando os resultados para a levedura L21 (*Pichia guilliermondii*), é possível afirmar que todos os meios testados foram satisfatórios, pois em todos os meios o colapso e espalhamento da gota foram observados, e apresentou redução da tensão superficial. O meio B apresentou menor valor para tensão superficial (31,15 mN/m) e o meio A maiores índices de emulsificação, 57% em óleo diesel e 93% em querosene.

As análises utilizando a levedura L58 (*Candida sake strain*) mostraram bons resultados para espalhamento e colapso da gota nas fermentações empregando o meio A. A fermentação em meio C atingiu a menor tensão superficial (42,74 mN/m) e o meio A os maiores índices de emulsificação (E24 soja - 100% e E24 diesel - 87%).

Tabela 14: Resultados dos testes exploratórios para determinação do meio de produção de biossurfactantes.

	Colapso da gota	Espalhamento da gota	Tensão Superficial (mN/m)	E24 Soja (%)	E24 Diesel (%)	E24 Querosene (%)
Meios L21 - <i>Pichia guilliermondii</i>						
A	S	S	37,95	0	57	93
B	S	S	31,15	0	0	58
C	S	S	42,78	0	0	77
L58 - <i>Candida sake strain</i>						
A	S	S (muito)	49,25	100	87	0
B	S (muito)	N	48,32	100	75	0
C	N	N	42,74	100	0	0
L75 - <i>Candida glabrosa</i>						
A	N	N	34,59	100	0	100
B	S	N	41,87	0	0	0
C	N	N	39,14	0	0	0
L92 - <i>Cryptococcus victoriae</i>						
A	S	N	45,51	90	95	65
B	N	N	45,51	0	0	0
C	S	N	42,78	0	0	0
L120 - <i>Leucosporidium scotti</i>						
A	S	S	47,39	100	0	66
B	S	S	45,53	100	0	0
C	S	N	45,53	100	0	0

* S- sim e N- não.

A levedura L75 (*Candida glabrosa*), apesar de não ter apresentado bons resultados de espalhamento e colapso da gota, obteve a menor tensão superficial encontrada em meio A (34,59 mN/m). Além disso, este mesmo meio apresentou índices máximos de emulsificação em óleo de soja e em querosene.

O *Cryptococcus victoriae* (L92) não apresentou bons resultados para o espalhamento da gota, no entanto o colapso nos meios A e C foram satisfatórios. O meio C se destacou quanto à tensão superficial (42,78 mN/m). Em meio A os índices de emulsificação foram superiores à 90% em óleo de soja e diesel.

Por último, a levedura L120 (*Leucosporidium scotti*) apresentou resultados satisfatórios em relação ao colapso e espalhamento da gota, com exceção da utilização do

meio C. Ao empregar os meios B e C foi observado a redução da tensão superficial, 45,53 mN/m. Os índices de emulsificação foram maiores empregando o meio A, (E24 soja - 100% e E24 querosene - 66%).

Em função do que foi apresentado na Tabela 14 e discutido acima, o meio A foi selecionado para dar continuidade aos ensaios experimentais. Além disso, vale ressaltar que o meio A é uma simplificação dos demais meios, uma vez que possui menos reagentes em sua composição, o que o torna uma alternativa de menor custo justificando, também, a escolha.

5.1.3 - Testes complementares

Testes complementares foram realizados a fim de se obter mais informações sobre cada biossurfactante produzido. Tais resultados estão dispostos na Tabela 15.

Tabela 15: Resultados dos testes exploratórios complementares.

Microrganismo	Atividade Hemolítica	CMC (mg/L)
L21	+	550
L58	+	650
L75	+	500
L92	+	700
L120	+	500

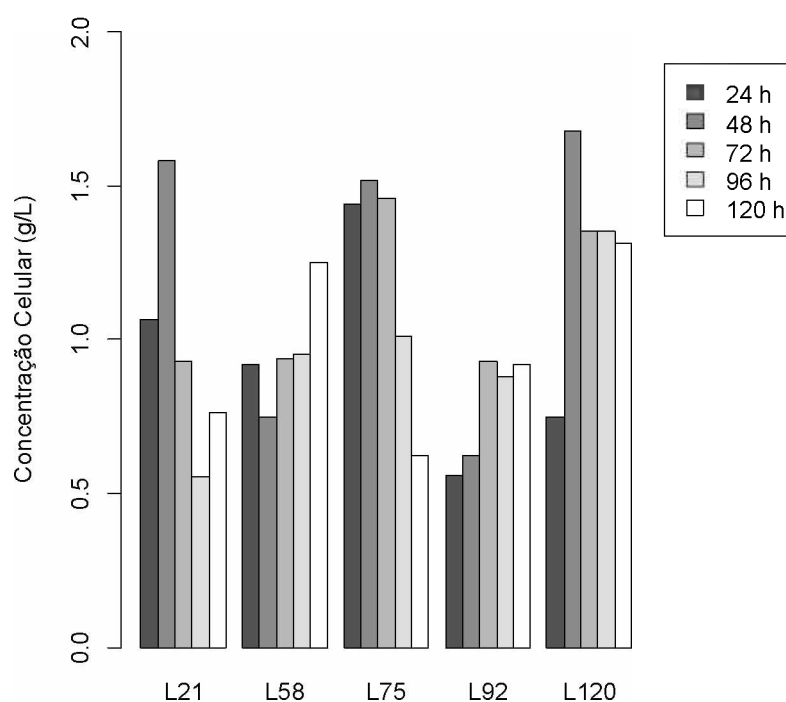
Segundo a literatura (KHOPADE et al., 2012; PŁAZA; ZJAWIONY; BANAT, 2006), o teste de atividade hemolítica é considerado um teste primário para triagem de biossurfactantes. E os resultados, portanto, confirmam o potencial das leveduras como produtoras de tensoativos.

A concentração micelar crítica é um parâmetro importante dado que ditará a viabilidade econômica do tensoativo. A efetividade dos biossurfactantes é maior para valores menores de CMC, uma vez que conservam as propriedades desejadas mesmo em pequenas concentrações. Os valores de CMC encontrados para as leveduras testadas estão entre 500 e 700 mg/L, que estão de acordo com os intervalos relatados na literatura (2,0 - 2100 mg/L) para biossurfactantes eficientes (LIU et al., 2013; RUFINO et al., 2014; SARUBBO; FARIAS; CAMPOS-TAKAKI, 2007).

5.1.4 - Ensaio para determinação do tempo de fermentação

Os ensaios para encontrar os tempos ideais na produção dos biossurfactantes levaram em conta a temperatura (30°C), o meio (meio A) e os microrganismos selecionados nos ensaios preliminares, item 5.1.1. As Figuras 14 e 15 representam, respectivamente, os resultados de crescimento celular e produção de biossurfactante para cinco diferentes tempos de fermentação analisados, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Figura 14: Efeito do tempo de fermentação na concentração celular.



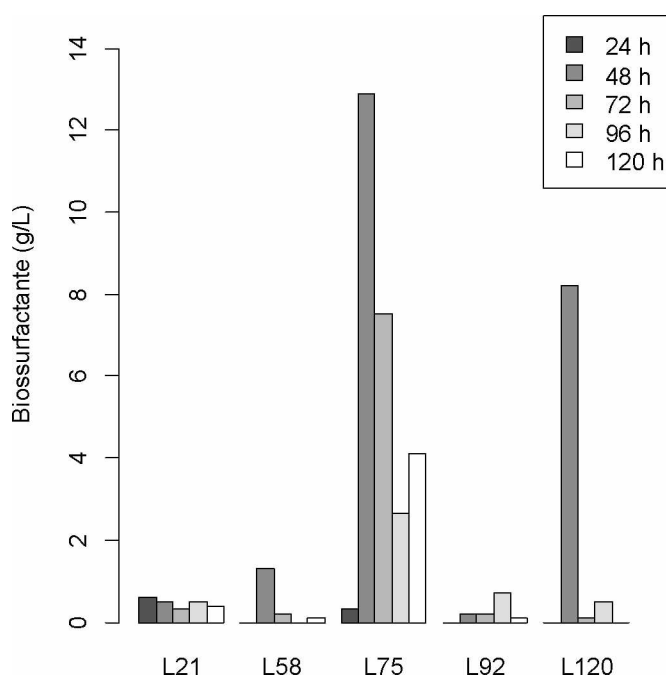
De acordo com a Figura 16, o maior crescimento celular foi observado em 48 horas de fermentação para as leveduras L21, L75 e L120. A levedura L58 apresentou maior crescimento celular com 120 horas de fermentação. A levedura L92 apresentou maior crescimento com 72 horas e permaneceu constante até as 120 horas de fermentação.

Analisando a Figura 15, a maior produção de tensoativos foi atingida com 48 horas de fermentação para a maioria das leveduras, exceto para *P. guilliermondii* (L21) e *C. victoriae* (L92) que apresentaram a maior produção de surfactante com 24 e 96 horas, respectivamente.

As concentrações de biossurfactante encontradas para as leveduras *C. glabosa* (L75)

e *L. scotti* (L120) foram 12,0 g/L e 7,5 g/L de biossurfactante, respectivamente. Estes resultados encontrados são compatíveis com resultados otimizados encontrados na literatura.

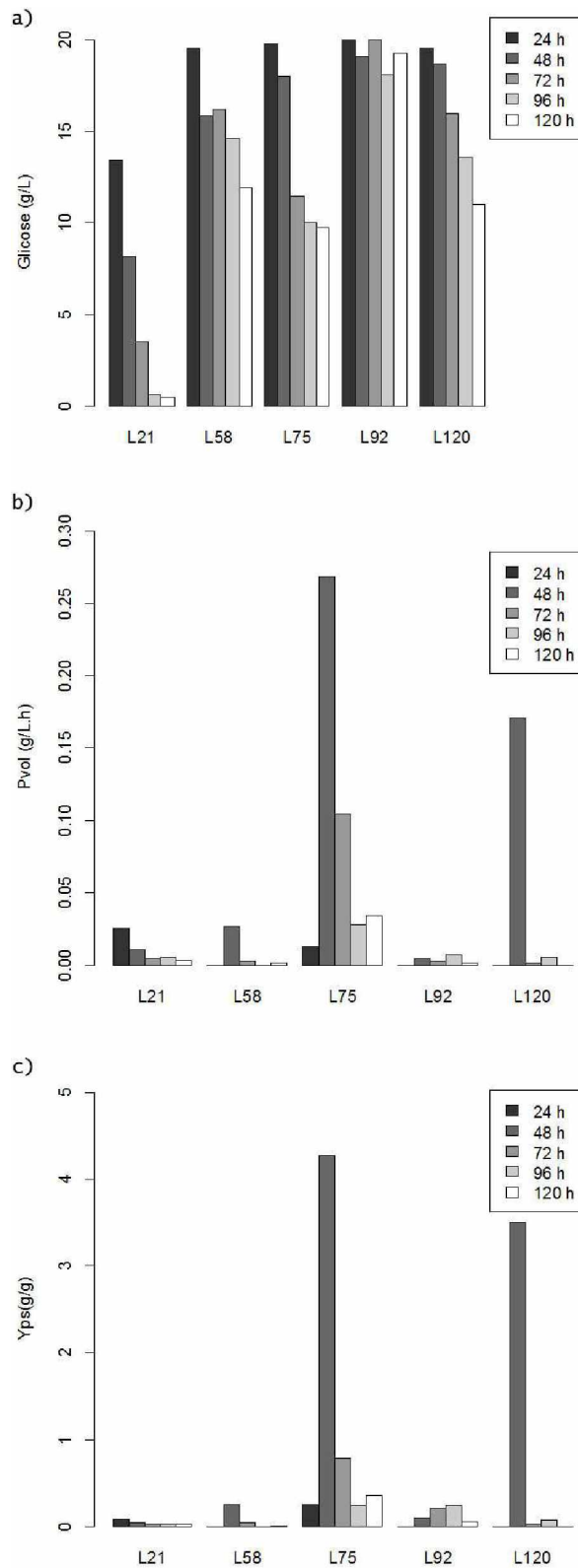
Figura 15: Efeito do tempo de fermentação na produção de biossurfactante.



RUFINO et al. (2014), utilizando *Candida lipolytica* (UCO0988), óleo soja e ácido glutâmico, produziram 8,0 g/L de biossurfactante em 72 horas de fermentação. CASTANHA et al. (2014), estudaram a otimização do surfactante produzido por *Cryptococcus laurentii* utilizando soro de queijo como substrato e produziram 2,98 g/L de biossurfactante em 360 horas de fermentação. JOSHI-NAVARE et al. (2014), utilizando *Pichia caribbica* em meio contendo óleo e xilose como fontes de carbono, produziram 7,48 g/L de biossurfactante em 158 horas de fermentação. Não foram encontradas na literatura informações sobre produção de biossurfactante pela levedura *Leucosporidium*.

As produtividades volumétricas e as conversões de biossurfactante por massa celular estão apresentadas na Figura 16.

Figura 16: Parâmetros da fermentação: a) concentração de glicose; b) produtividade volumétrica (P_{vol}) e c) conversão de biossurfactante por massa celular ($Y_{p/s}$).



Analisando-se a Figura 16, verifica-se que a maior produção de biossurfactante ocorre no tempo de 48 horas, exceto para as leveduras *P. guilliermondii* (L21) e *C. victoriae* (L92). Para as leveduras de maior produção de biossurfactante, L75 e L120, o consumo de glicose foi maior do que 40% ao final das fermentações, além disso, é possível observar que a produção de biossurfactantes está associada ao crescimento celular para as leveduras *C. globosa* (L75), *L. scotti* (L120) e *C. victoriae* (L92).

5.1.5 - Ensaio para verificação da estabilidade dos biossurfactantes

A estabilidade do surfactante foi avaliada para temperatura, pH e salinidade conforme o item 4.1.7 e os resultados estão apresentados nas Figuras 17, 18 e 19.

Ao se observar a Figura 17 é possível notar que os biossurfactantes produzidos pelas leveduras mantiveram-se estáveis em relação ao índice de emulsificação e a tensão superficial, mesmo variando a temperatura entre 20°C e 100°C. Estes resultados ao serem comparados com os da literatura mostram-se mais interessantes já que os surfactantes comerciais apresentam queda, em faixa de temperatura idêntica, de mais de 70% para E24 conforme relatado por FERHAT et al. (2011) e IVSHINA et al. (1998).

A Figura 18 representa o efeito da salinidade sobre os biossurfactantes. Pode-se observar que nenhuma das concentrações de NaCl testadas alterou significativamente a tensão superficial, Figura 18.a. Na Figura 18.b os resultados para E24 superiores a 60%, na faixa de salinidade testada, sugerem que os biossurfactantes produzidos pelas leveduras *C. victoriae* (L92) e *L. scotti* (L120) podem ser utilizados para biorremediação de ambientes marinhos, uma vez que possuem salinidade variável entre 35 e 57 g/L (SANTOS et al., 2013).

O efeito do pH na tensão superficial e na emulsificação dos tensoativos está disposto na Figura 19. Observa-se que os biossurfactantes mantiveram-se estáveis quanto a tensão superficial na faixa de pH testada. A emulsificação dos biossurfactantes produzidos pelas leveduras *C. sake* (L58) e *C. globosa* (L75) só foi eficaz para pH ácido e neutro/básico, respectivamente. Tal redução das propriedades emulsionantes para diferentes faixas de pH era esperada, uma vez que o tipo de meio apolar utilizado para gerar a emulsão e as diferentes forças repulsivas (ou atrativas) relacionadas à ionização das partes hidrofílicas dos biossurfactante se alteram com a mudança de pH, como descrito na literatura (FERHAT et al., 2011; PORNUNTHORNTAWEE; CHAVADEJ; RUJIRAVANIT, 2009).

PORNUNTHORNTAWEE et al. (2009) relataram baixa estabilidade de ramnolípido em pH básico como resultado das forças repulsivas entre os grupos hidrofílicos.

FERHAT et al. (2011) observaram baixa emulsificação dos biossurfactantes produzidos pela bactéria *Brevibacterium* em querosene e diesel. No entanto, a emulsificação foi eficiente em óleo de girassol e em óleo de motor.

Figura 17: Efeito da temperatura na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e b) emulsificação.

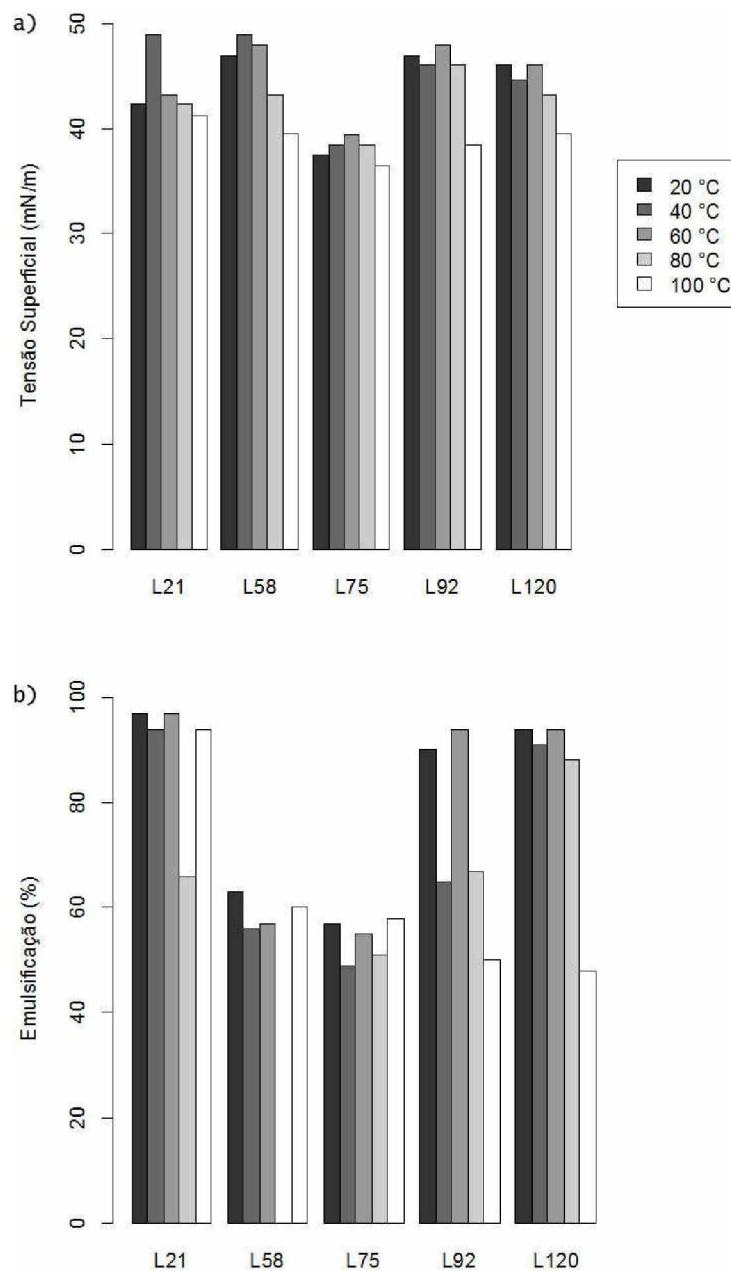


Figura 18: Efeito da salinidade na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e b) emulsificação.

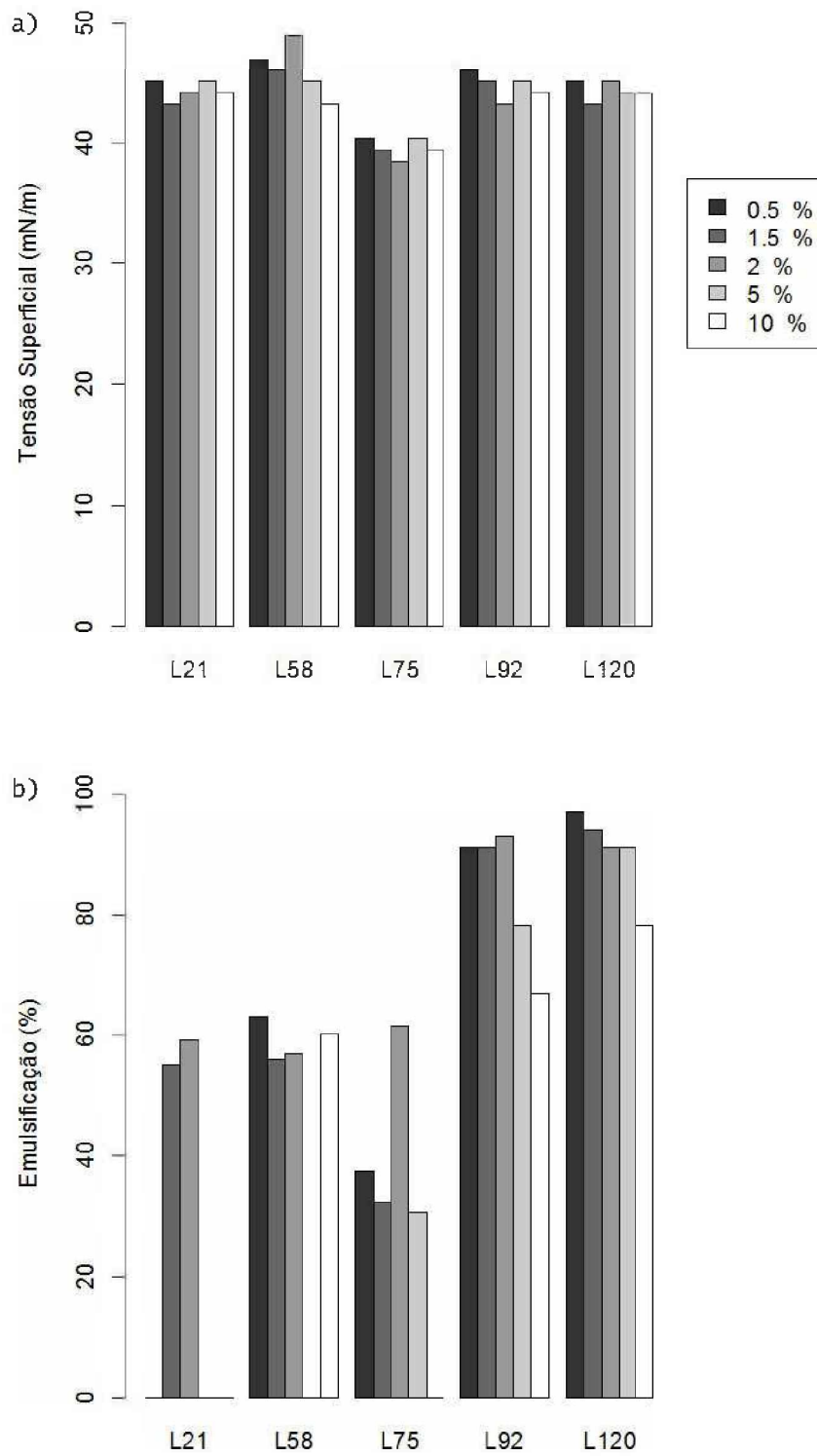
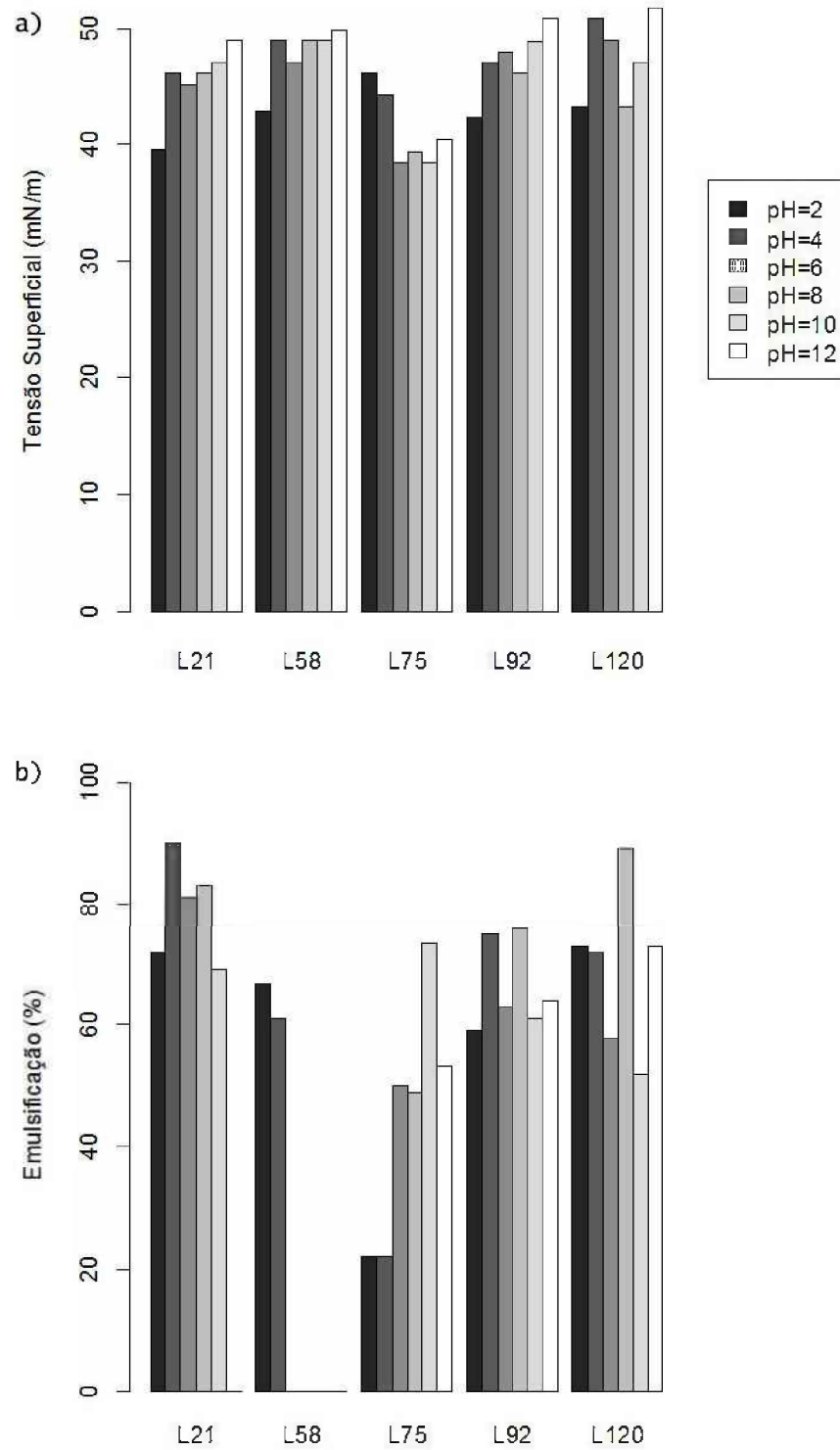


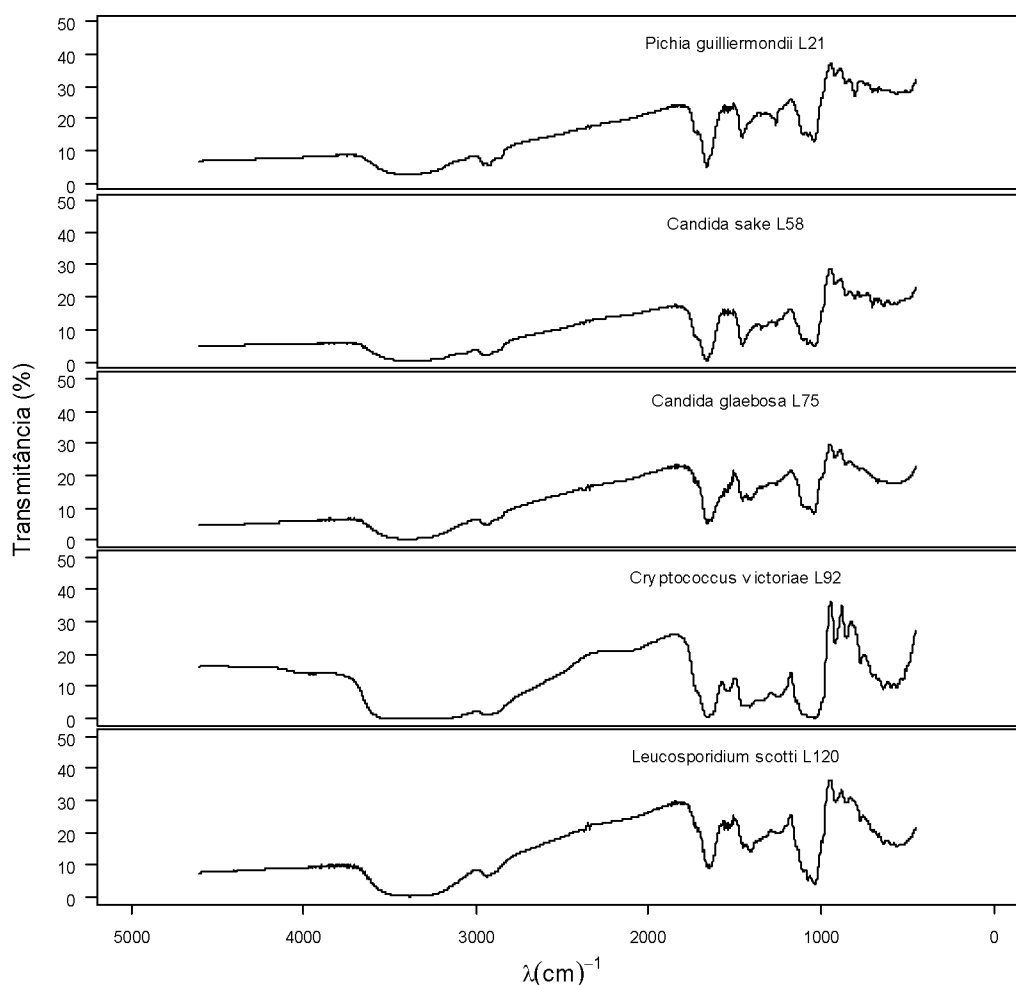
Figura 19: Efeito do pH na estabilidade dos biossurfactantes: a) tensão superficial e b) emulsificação.



5.1.6 - Caracterização parcial das moléculas dos biossurfactantes produzidos

A avaliação das características das moléculas do biossurfactantes foi realizada por espectroscopia de infravermelho, como já descrito no item 4.1.8 e os resultados estão apresentados na Figura 20.

Figura 20: Espectroscopia de infravermelho dos biossurfactantes produzidos.



A presença dos grupos álcool carboxílico (-OH), carbonila (-COO e -COOH), éteres (COC), alquilas (-CH₂, -CH₃) e ésteres (-COC-) foram identificados na espectroscopia de infravermelho (Figura 22), isto indica que todos os biossurfactantes produzidos pelas leveduras são de natureza glicolípica.

A ligação localizada entre 3300-3500 cm^{-1} refere-se às vibrações de estiramento do grupo OH (SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015). Os picos na região 2850-2950 cm^{-1}

¹ ocorrem devido ao estiramento das ligações -CH₂ e -CH₃ (ISMAIL et al., 2013). O pico que aparece em 1650 cm⁻¹ representa os grupos carbonila (OLIVEIRA et al., 2013), a absorção a 1400 cm⁻¹ representa a deformação e flexão em cadeias alifáticas (SARAFIN et al., 2014). E o pico em 1000 cm⁻¹ ocorre devido à vibração do grupo éter (C-O-C) (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2012).

5.2 - Resultados da produção de L-asparaginase

5.2.1 - Teste preliminar avaliativo e adaptativo dos fungos

Nestes primeiros testes foram utilizados 9 diferentes fungos, Tabela 6, com o objetivo de selecionar microrganismos capazes de produzir protease e, assim, avaliar uma possível ampliação da economia do processo de produção da L-asparaginase pelo aproveitamento da protease. Além disso, estes testes foram realizados para adaptação dos microrganismos à fermentação em estado sólido nos substratos testados, farelo de arroz e de trigo, utilizando a produção de protease como um indicativo de melhor adaptação. Os testes foram realizados sem a realização do preparo do inóculo, mas adicionando ao substrato sólido os esporos obtidos por raspagem de um tubo de manutenção e 10 mL de água destilada. Foram testados, também, diferentes tempos de fermentação (48, 72, 96, 144, 168 e 192 horas), e os resultados estão mostrados nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16: Resultados da produção de protease dos testes preliminares em farelo de arroz.

Cepas	Atividade de protease em farelo de arroz					
	48	72	96	144	168	192
	horas	horas	horas	horas	horas	horas
	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg
VSP 18	4424	12800	5664	7968	7920	3344
VSP 27	5808	15648	6816	8240	8240	6064
VSP 6	5640	13584	5448	6112	6416	5248
OS.F 16	872	5184	2448	2440	2312	11840
VSP 14	243,2	2848	1920	896	776	280
VSP 22	6672	14192	4920	7632	7056	2656
VSP20	601,6	3696	1656	984	960	328
GUSP 3.1	3312	12400	5760	9088	7568	4496
PCI 1.7A	1888	1516	2308	632	1796	1232

Tabela 17: Resultados da produção de protease dos testes preliminares em farelo de trigo.

	Atividade de protease em farelo de trigo					
	48	72	96	144	168	192
	horas	horas	horas	horas	horas	horas
	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg	U/kg
VSP 18	2192	3264	3224	2800	3432	3096
VSP 27	3960	4400	3864	4392	4784	5024
VSP 6	2496	2368	1896	1616	960	0
OS.F 16	580	208	1024	468	720	3444
VSP 14	188	300	904	1992	636	1860
VSP 22	2184	1460	1072	1988	1488	1400
VSP20	1720	1208	1,2	412	1040	4
GUSP 3.1	1552	840	824	724	1436	1440
PCI 1.7A	1776	1040	464	932	1116	368

Analisando e comparando os resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17 em farelo de arroz e em farelo de trigo, é possível afirmar que todos os 9 fungos testados apresentaram resultados satisfatórios quanto à produção de protease. O farelo de arroz mostrou maior efetividade na produção de protease com valores variando de 243,2 U/mL a 15648 U/mL.

Como todos os microrganismos apresentaram bons resultados, foram selecionados para os estudos posteriores as cepas diferentes entre si e já identificadas. Logo foram selecionados 4 fungos dos 9 iniciais (Tabela 18).

Tabela 18: Fungos selecionados para produção de L-asparaginase.

Microrganismo Código	Espécie
PC 1.7 A	<i>Aspergillus terreus</i>
VSP-06	<i>Aspergillus fumigatus</i>
VSP-14	<i>Paecilomyces variotti</i>
VSP-20	<i>Aspergillus awamori</i>

5.2.2 - Avaliação do uso da fermentação submersa como forma de preparo do inóculo

Neste ensaio o farelo de arroz foi utilizado como substrato sólido e foram testados diferentes tempos de fermentação (48, 72, 120, 144, 168 e 192 horas). O meio utilizado como inóculo foi o CZAPEK, já descrito no Tabela 7. Os 4 microrganismos selecionados na etapa

anterior (Tabela 18), foram utilizados nestes ensaios, e os resultados estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19: Resultados da atividade de protease na verificação da necessidade do preparo do inóculo.

	48 horas U/kg	72 horas U/kg	120 horas U/kg	144 horas U/kg	168 horas U/kg	192 horas U/kg
PCI 1.7A	1272	7528	9187,2	7632	3760	4592
VSP 14	1560	3832	2534,4	1808	1056	928
VSP 20	264	592	528	544	2104	592
VSP 6	5664	13376	10176	10944	3808	9312

Ao analisar os resultados obtidos nos testes preliminares (Tabela 16), e os resultados da Tabela 19, pode-se afirmar que o preparo do inóculo na fermentação em estado sólido aumentou consideravelmente a produção de protease para os microrganismos PCI 1.7A e VSP 20, apresentando crescimento de 298% e 5,9%, respectivamente.

A capacidade de produção de protease pelo microrganismo PCI 1.7A é evidenciada pela utilização do inóculo, logo elegeram-se esse microrganismo para a realização dos demais testes.

5.1.3 - Avaliação do tamanho ideal das esferas de vidro e do tempo ideal para a ruptura das células

As células utilizadas no ensaio foram obtidas pela fermentação em estado sólido do microrganismo PCI 1.7A como descrito no item 4.2.2. As células foram obtidas pela centrifugação de 25 mL de meio fermentado e em seguida recolocadas em suspensão utilizando 10 mL de água destilada. Esta solução concentrada de células foi, então, submetida à ruptura.

Para determinar o tamanho ideal das esferas de vidro para a ruptura das células as esferas foram separadas com auxílio de peneiras e os tamanhos selecionados para o teste estão dispostos na Tabela 19. A atividade da L-asparaginase foi o indicativo utilizado para avaliar os resultados da ruptura, apresentados, também, na Tabela 20.

Tabela 20: Tamanho das esferas de vidro utilizadas na ruptura das células.

Esferas	Tamanho das esferas (mm)	Atividade L-asparaginase (U/kg)
A -	1,00 - 0,84	160,00
B -	0,84 - 0,71	346,67
C -	0,71 - 0,59	171,33
D -	< 0,59	241,33

Os resultados demonstram que o tamanho ideal das esferas de vidro para ruptura das células encontra-se na faixa de 0,84 - 0,71mm, com atividade de L-asparaginase igual a 346,67 U/kg.

Utilizando esferas de tamanho ideal, foram realizados ensaios para a determinação do tempo ótimo de ruptura. Os ensaios também recorreram ao banho de gelo para controle da temperatura que não poderia ultrapassar 10°C. Os tempos testados foram (4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 minutos) em vórtex. O tempo consumido com os banhos foi ignorado, o que garantiu que o tempo medido foi o tempo de ruptura de fato. Os resultados das atividades da L-asparaginase são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21: Resultados da atividade de L-asparaginase para determinar melhor tempo de ruptura das células.

Tempo de Ruptura (minutos)	Atividade L-asparaginase (U/kg)
4,00	10,00
6,00	32,33
8,00	58,33
10,00	114,33
12,00	152,67
14,00	213,33
16,00	172,67

De acordo com os resultados, é possível afirmar que o melhor tempo de ruptura das células foi de 14 minutos, usando as esferas de 0,84 - 0,71mm, com atividade de L-asparaginase igual a 213,33 U/kg.

5.2.4 - Avaliação do aproveitamento da L-asparaginase intracelular nas fermentações em estado sólido

Para determinar o melhor meio para preparo do inóculo, visando a maior produção de L-asparaginase, foram utilizados 10 diferentes meios, apresentados na Tabela 7.

Para avaliar a importância da ruptura de células no processo de produção de L-asparaginase, foram realizados testes comparativos com sobrenadante do centrifugado. O tempo de fermentação do inóculo e da fermentação em estado sólido foi, cada um, de 96 horas. A Tabela 22 apresenta os dados obtidos no ensaio.

Tabela 22: Resultados da atividade da L-asparagina produzida intracelularmente e extracelularmente, nos diferentes inóculos

Inóculo	Atividade L-asparaginase Intracelular (U/kg)	Atividade L-asparaginase Extracelular (U/kg)
1	46,67	216,00
2	76,67	256,00
3	86,67	241,33
4	76,00	271,33
5	54,00	230,00
6	54,00	245,33
7	82,67	231,33
8	72,00	209,33
9	49,33	220,00
10	213,33	246,00

Os resultados indicam que a L-asparaginase produzida dentro da célula é secretada para fora desta. Diante das etapas adicionais que envolveriam o aproveitamento da L-asparaginase intracelular, ruptura das células e purificação, e o fato da fermentação em estado sólido não gerar grandes biomassas fúngicas, optou-se por seguir as análises apenas com a L-asparaginase externa às células.

Além disso, a análise revela que a fermentação em que se utilizou como inóculo o meio 4 obteve maior valor de atividade da L-asparaginase (271,33 U/kg) quando comparado aos demais meios.

5.2.5 - Planejamento Plackett-Burman

Idealizou-se um planejamento para investigar a influência de 9 variáveis na produção de L-asparaginase. O planejamento escolhido foi o Plackett-Burman utilizando 9 variáveis em dois níveis, como pode ser visto na Tabela 8. O planejamento foi realizado em 12 diferentes condições experimentais, conforme o planejamento descrito na Tabela 8. A resposta analisada foi a atividade de L-asparaginase, pois se trata do produto de maior interesse e os resultados estão apresentados, também, na Tabela 23.

Tabela 23: Resultados do Planejamento Plackett-Burman.

Corrida	Umidade	NaNO ₃	pH	Temperatura	Glicose	Tempo	Glicerol	Inóculo	K ₂ HPO ₄	Atividade L-asparaginase (U/kg)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	264,00
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	290,67
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	360,00
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	340,67
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	390,00
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	318,00
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	412,67
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	361,33
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	406,67
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	344,00
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	425,33
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	354,00

Os resultados foram analisados, para identificar as variáveis significativas no processo, com nível de confiança de 90%, e não foram consideradas as interações entre variáveis, Tabela 24.

Os resultados demonstram que a quantidade de água (X1) adicionada ao meio sólido foi significativa para o processo, sendo que o efeito dessa variável no processo foi de (-3,88194), isto é, os melhores resultados foram obtidos para o nível mais baixo da variável (6 mL). A variável tempo de fermentação (X6) também foi significativa para o processo, com efeito positivo igual a 2,368056.

Tabela 24: Avaliação e significância do planejamento Plackett-Burman.

Coefficiente	Estimativa	Erro Padrão	t valor	P(> t)	Efeito	R ² =0,9627
Interseção	0,44514	0,007995	55,602	0,000323		
X1 - Água	-0,038819	0,007995	-4,856	0,039892	-3,88194	**
X2 - Nitrato	0,0131125	0,007995	1,642	0,242342	1,3125	
X3 - pH	-0,016042	0,007995	-2,007	0,182612	-1,60417	
X4 - Temperatura	0,014236	0,007995	1,781	0,216912	1,423611	
X5- Glicose	0,009653	0,007995	1,207	0,350687	0,965278	
X6 - Tempo	0,023681	0,007995	2,962	0,097577	2,368056	*
X7 - Glicerol	0,013264	0,007995	1,659	0,238959	1,326389	
X8 - Inóculo	-0,014097	0,007995	-1,763	0,219894	-1,40972	
X9 - Fosfato	-0,011597	0,007995	-1,451	0,283961	-1,15972	

** - Variável significativa para nível de confiança de 5%.

* - Variável significativa para nível de confiança de 10%.

Novo teste foi realizado para verificar a necessidade de adicionar os sais NaNO₃ e K₂HPO₄ e as fontes de carbono, glicose e glicerol, utilizadas no planejamento. O teste foi realizado utilizando como base a corrida 11 do planejamento Plackett-Burman, uma vez que apresentou melhor resultado da atividade de L-asparaginase (425,33 U/kg), Tabela 23. Foram realizadas 6 corridas, retirando-se um a um os nutrientes e as fontes de carbono, como apresentado na Tabela 25. Os resultados deste teste para verificar a necessidade do uso dos sais, glicerol e glicose também estão disponíveis na Tabela 25.

Tabela 25: Continuação do Planejamento Plackett-Burman, análise da necessidade de sais e outras fontes de carbono.

Corrida	Umidade	NaNO ₃	pH	Temperatura	Glicose	Tempo	Glicerol	Inóculo	K ₂ HPO ₄	Atividade L-asparaginase (U/kg)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	
1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	427,333
2	-	#	-	-	#	+	#	+	#	428,667
3	-	#	-	-	-	+	+	+	-	413,333
4	-	+	-	-	#	+	+	+	-	400,00
5	-	+	-	-	-	+	#	+	-	404,667
6	-	+	-	-	-	+	+	+	#	340,00

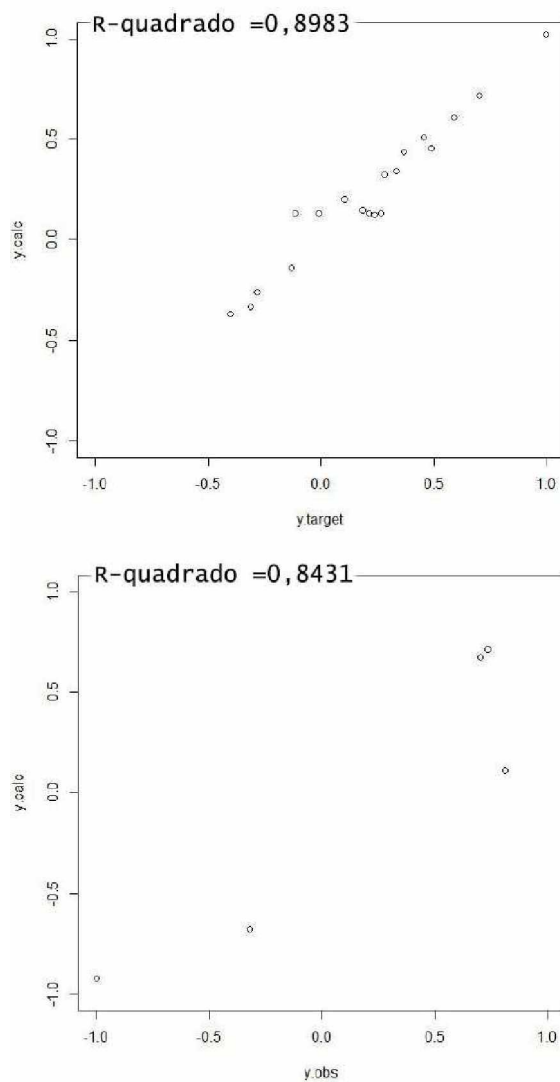
não há adição do componente

A corrida 1, que foi exatamente igual à corrida 11 do planejamento Plackett-Burman, obteve praticamente o mesmo resultado da atividade da L-asparaginase que a corrida 2, feita na ausência de NaNO_3 , K_2HPO_4 , glicose e glicerol. Logo não se justifica o uso dos sais, glicose e glicerol.

5.2.6 - Otimização do processo de produção de L-asparaginase

Para a otimização do processo foram realizadas 24 corridas variando o tempo de fermentação e o volume de água adicionado ao farelo de arroz, Tabela 9. Os resultados ajustados ao modelo de rede neural artificial para otimização estão apresentados na Figura 21.

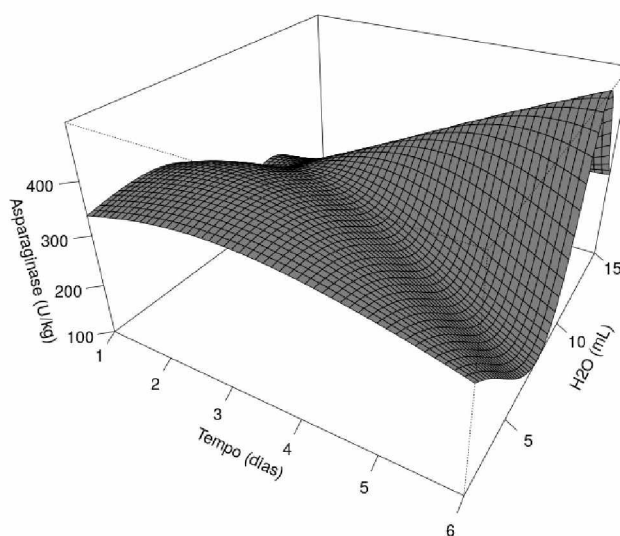
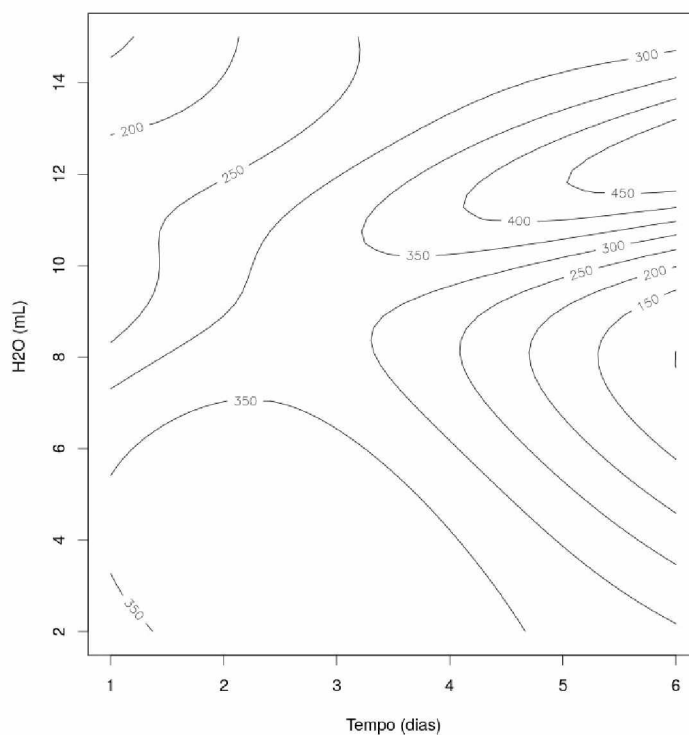
Figura 21: Avaliação da rede neural: a) fase de treino, b) fase de teste.



Pode-se observar que o modelo se ajustou adequadamente na fase de teste, Figura 21.b, e descrevem de forma satisfatória condições distintas das analisadas na fase de treino, Figura 21.a.

O modelo de otimização é descrito pela Figura 23 na forma de curva de nível, Figura 22.a, e tridimensional, Figura 22.b.

Figura 22: Modelo de otimização: a) curva de nível e b) tridimensional.



Como pode ser observado o excesso de água tem um efeito negativo na atividade enzimática para todas as condições, exceto para tempos de fermentação superiores há 4 dias, em que a adição inicial de volumes superiores a 9 mL favorece a produção de L-asparaginase.

Além disso, pode-se concluir que existem duas condições ótimas para o processo, sendo a primeira 12 mL de água e fermentação por 6 dias (450 U/kg). A segunda condição ótima tem tempo de fermentação em estado sólido de 2 dias e adição inicial de água de 4,5 mL (350 U/kg), sendo que a segunda condição citada gera 2,3 vezes mais enzimas por unidade de tempo quando comparada à outra condição ótima.

A condição otimizada pela rede neural artificial foi reproduzida laboratorialmente para verificar a reprodutibilidade do processo. A condição ótima com 4,5 mL de água e 2 dias de fermentação resultou em uma atividade de L-asparaginase igual a 414,89 U/kg.

5.2.7 - Avaliação da adição de água ao longo da fermentação

Para verificar se a adição de água ao longo da fermentação seria vantajosa, foram realizados testes adicionando-se água destilada ao longo do tempos de fermentação. As condições realizadas e os resultados destes ensaios estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Avaliação da adição de água ao longo da fermentação.

	Água adicionada (mL)	Tempo para adição de água (Dias)	Tempo de fermentação (Dias)	Atividade L-asparaginase (U/kg)
E1	4,5	1,5	3	300
E2	4,5	1,5 - 3,0	4,5	470,889
E3	4,5	1,5 - 3,0 - 4,5	6	388
E4	4,5	1,0 - 2,0	3	354,889
E5	3	1,5	3	268,222
E6	3	1,5 - 3,0	4,5	314,889
E7	3	1,5 - 3,0 - 4,5	6	232,667
E8	6	1,5	3	307,111
E9	6	1,5 - 3,0	4,5	522,889
E10	6	1,5 - 3,0 - 4,5	6	291,333
E11	2	1,5 - 3,0 - 4,5	6	519,667

Pode-se concluir pelos resultados expostos na Tabela 27 que a adição de água ao longo da fermentação gerou melhor atividade de L-asparaginase (522,889 U/kg). No entanto, o

aumento da atividade não justifica o maior tempo de fermentação (4,5 dias), uma vez que produção por unidade tempo foi de 116,19 U/kg, e a condição otimizada pela rede neural artificial foi de 175,00 U/kg.

5.2.8 - Precipitação de protease e avaliação do aproveitamento desta enzima no processo de produção da L-asparaginase

A precipitação das enzimas foi realizada conforme o item 4.2.6. Os resultados da recuperação de L-asparaginase e protease estão dispostos, respectivamente, nas Figuras 23 e 24.

Figura 23: Recuperação da L-asparaginase por etanol a) L-asparaginase não precipitada; b) L-asparaginase recuperada no meio sólido.

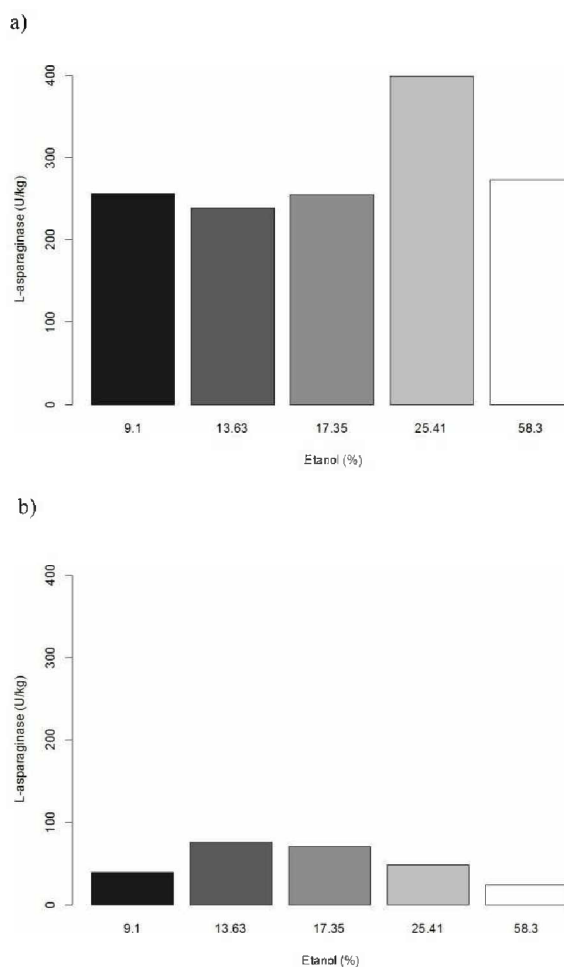
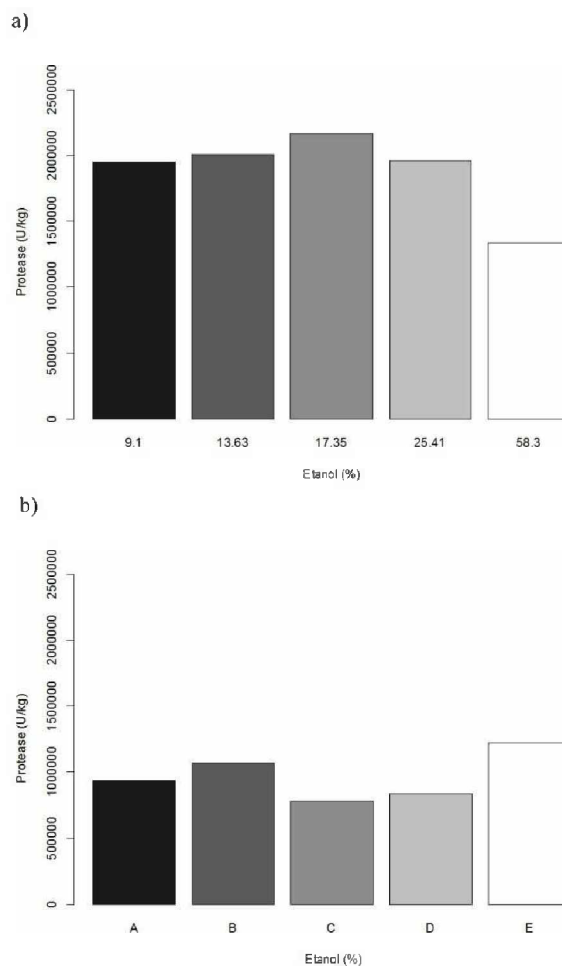


Figura 24: Recuperação da Protease por etanol: a) protease não precipitada; b) protease recuperada no meio sólido.



De acordo com os resultados da precipitação é possível afirmar que nenhuma das concentrações de etanol testadas foi capaz de separar totalmente a L-asparaginase da protease, uma vez que a atividade de ambas as enzimas continuou maior no sobrenadante do que no corpo de fundo do material centrifugado.

A atividade da L-asparaginase é consideravelmente maior no sobrenadante para todas as concentrações de etanol testadas. Diferentemente do que ocorre para protease, em que a atividade da enzima no sólido é a metade da atividade da enzima no sobrenadante, o que possibilita o aproveitamento da protease precipitada.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÕES

As evidências encontradas no presente trabalho permitem afirmar que as leveduras *Candida shake*, *Candida globosa*, *Leucosporidium scotti*, *Cryptococcus victoriae* e *Pichia guilliermondii* apresentaram:

- Resultados satisfatórios para a produção glicolípideos em fermentações submersas, com destaque para as leveduras *Candida globosa* (L75) e *Leucosporidium scotti* (L120) que produziram 12,9 g/L e 7,5 g/L de biossurfactante, respectivamente .
- Redução da tensão superficial de 62 mN/m para 42-45 mN/m.
- Altos índices de emulsificação em óleos vegetais e óleos hidrocarbonados.
- Biossurfactantes estáveis em relação à temperatura, pH e salinidades.

Os biossurfactantes purificados apresentaram CMC variando de 500mg/L a 700mg/L, e são candidatos adequados para o uso de biossurfactantes em processos industriais.

A pesquisa para a produção de L-asparaginase mostrou-se promissora utilizando-se o fungo *Aspergillus terreus* (PCI 1.7A). A produção por fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz conduziu a duas condições ótimas de produção:

- 12 mL de água e fermentação por 6 dias, sendo a atividade de L-asparaginase de 450 U/kg;
- 4,5 mL de água e fermentação por 2 dias, sendo a atividade encontrada para a L-asparaginase igual à 350 U/kg;

A condição ótima utilizando 4,5 mL e dois dias de fermentação gera 2,3 vezes mais enzimas por unidade de tempo quando comparada à outra condição ótima.

Além disso, o fungo PC 1.7A (*Aspergillus terreus*) é produtor de protease o que permite a produção conjunta de L-asparaginase e de protease possibilitando a ampliação da economia do processo de produção da L-asparaginase pelo aproveitamento da protease.

CAPÍTULO 7 - SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimização da produção dos biossurfactantes usando as leveduras já selecionadas neste trabalho;
- Ampliar os estudos e caracterizar os biossurfactantes produzidos;
- Ampliar os estudos de produção de L-asparaginase e protease, utilizando outros substratos;
- Otimizar a produção conjunta de L-asparaginase e protease.
- Testar concentrações de etanol maiores que 60% visando a maior separação das enzimas por precipitação em diferentes concentrações.

CAPÍTULO 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUD, A. K. DE S. **Estudo do controle de qualidade do processo de produção de L-asparaginase por *Zymomonas mobilis***. 2005. 220 p. Tese (Doutorado em Ciência em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, 2005.

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

AL RABAYAH; JADDOUH, S.; AMIREH, A. Cost minimization analysis of Peg-L-Asparaginase versus E.Coli L-Asparaginase in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: A jordanian perspective. **Value in Health**, v. 19, n. 7, p. A721–A722, 2016.

ALBERTS, B. et al. **Biología Molecular de la Célula**. 5. ed. Castilian-Spanish: Omega, 2010.

Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 5, 2009.

ÁLVARO DE CAMPOS, HETERÔNIMO DE F. P. Tabacaria. **Presença - Folha de Arte e Crítica**, v. 39, 1928.

ANJUM, F. et al. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 262–269, 2016.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23–29, 15 jun. 2012.

AZIZI, D.; GHARABAGHI, M.; SAEEDI, N. Optimization of the coal flotation procedure using the Plackett–Burman design methodology and kinetic analysis. **Fuel Processing Technology**, v. 128, p. 111–118, 2014.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 101–107, 11 dez. 1998.

BUZZINI, P.; MARGESIN, R. **Cold Adapted Yeasts - Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance**. New York - EUA: Springer, 2014.

CAMEOTRA, S. S. et al. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1, p. 261–280, 2010.

CASTANHA, R. F. et al. Optimization of lipids production by *Cryptococcus laurentii* 11 using cheese whey with molasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 379–387, 2014.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 171, n. 2, p. 501–505., 1947.

CHAUD, L. C. S. et al. Improvement in extracellular protease production by the marine antarctic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7. **New Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 807–814, 2016.

CHEN, J. et al. Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 3, p. 501–506, 3 jul. 2006.

CHI, Z. et al. Bio-products produced by marine yeasts and their potential applications. **Bioresource Technology**, v. 202, p. 244–252, 2016.

CHOW, Y. 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, nov. 2015.

CIESAROVÁ, Z. Impact of L-Asparaginase on Acrylamide Content in Fried Potato and Bakery Products. In: CIESAROVÁ, Z. (Ed.). **Acrylamide in Food Analysis, Content and Potential Health Effects**. 1. ed. Academic Press, 2016. p. 405–421.

COUTINHO FILHO, U. **Redes Neurais Artificiais aplicadas à Engenharia Química** Notas de aula, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2015.

CRAN. **AMORE**. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/AMORE/>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

DESAI, J. D.; IBRAHIM, M. B. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47–64, 1997.

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

DIAS, F. F. G. et al. Acrylamide mitigation in French fries using native L-asparaginase from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Food Science and Technology**, v. 76, Part B, p. 222–229, mar. 2017.

DÍAZ DE RIENZO, M. A. et al. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. **New Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 720–726, 25 dez. 2015.

DIVINO, B. S. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de *Saccharomyces cerevisiae* em sistema de expressão heterólogo *Pichia pastoris***. 2015. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, 2015.

DOLOWY, W. C. et al. Toxic and antineoplastic effects of L-Asparaginase. **Cancer**, v. 19, n. 12, p. 1913–1919, 1966.

DONIO, M. B. S. et al. Isolation and characterization of halophilic *Bacillus* sp. BS3 able to produce pharmacologically important biosurfactants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 11, p. 876–883, 2013.

DUARTE, A. W. F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial antarctic Samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023–35, 2013.

DUQUE, L. M. **Características dos Fungos**. Disponível em: <<http://goo.gl/zbNM50>>. Acesso em: 10 maio. 2017.

DUVAL, M. et al. Comparison of *Escherichia coli*–asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: Results of a randomized european organisation for research and treatment of cancer—children’s leukemia group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734–2739, 2002.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 171, n. 1, p. 1–9, 1999.

FDA. **Food and Drug Administration**. Disponível em: <<https://goo.gl/XfJ1L>>. Acesso em: 2 mar. 2017.

FERHAT, S. et al. Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1182–1188, 2011.

FERNEDA, E. Redes neurais e sua aplicação em sistemas de recuperação de informação. **Ciência da Informação**, v. 35, n. 1, p. 25–30, 2006.

FERREIRA, A. et al. Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 155, p. 522–529, 1 jul. 2017.

FIECHTER, A. Biosurfactants: Moving towards industrial application. **Trends Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 208–217, 1999.

FLORES, J. C. **Rompimento celular de *Escherichia coli* por pérolas de vidro para liberação de L-asparaginase II**. 2017. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, 2017.

GALINDO-RODRÍGUEZ, G. et al. Do immunoglobulin G and immunoglobulin E anti-L-asparaginase antibodies have distinct implications in children with acute lymphoblastic leukemia: A cross-sectional study. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, 2017.

GREWAL, H. S.; KALRA, K. L. Fungal production of citric acid. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 209–234, 1995.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity : The 1±5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422±1432, 2001.

HEWITT, P. G. **Física Conceitual**. 9. ed. São Paulo - SP: Bookman, 2002.

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

HOLLAND, F. et al. Asparaginase. In: KUFÉ DW, POLLOCK RE, WEICHSELBAUM RR, ET AL (Ed.). **Cancer Medicine**. 5. ed. Hamilton (ON): BC Decker, 2000. p. Chapter 50.

HOLMBERG, K. et al. Polymers in solution. In: **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2. ed. West Sussex, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2002. p. 545.

HOMMEL, R. et al. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 199–205, 1987.

HORVATA, T. Z. et al. The use of *Erwinia asparaginase* for adult patients with acute lymphoblastic leukemia after pegaspargase intolerance. **Leukemia Research**, v. 50, p. 17–20, 2016.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 192–198, 2009.

IARC. **International Agency For Research On Cancer**. Disponível em: <www.gco.iarc.fr/>. Acesso em: 18 mar. 2017.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<http://goo.gl/Ug2dtU>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

INCBIO. **INCBIO**. Disponível em: <<http://goo.gl/oxAPa6>>. Acesso em: 2 maio. 2017.

ISMAIL, W. et al. Characterization of a lipopeptide biosurfactant produced by a crude-oil-emulsifying *Bacillus* sp. I-15. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 84, p. 168–178, out. 2013.

IVSHINA, I. B. et al. Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 711–717, 1998.

JAYUS et al. Studies on bioethanol production of commercial baker's and alcohol yeast under aerated culture using sugarcane molasses as the media. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 493–499, 2016.

JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. In: CHEMISTRY, A.-R. B. T.-S. IN N. P. (Ed.). . **Bioactive Natural Products (Part C)**. Amsterdã, Holanda: Elsevier, 2000. v. Volume 22, p. 245–272.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P. et al. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 115, p. 93–100, 2016.

JOSHI-NAVARE, K.; SINGH, P. K.; PRABHUNE, A. A. New yeast isolate *Pichia caribbica* synthesizes xylolipid biosurfactant with enhanced functionality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 8, p. 1070–1079, 2014.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current science**, v. 77, p. 116–123, 1999.

KHOPADE, A. et al. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 367, n. 1, p. 311–318, 1 fev. 2012.

KIRAN, G. S. et al. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 250–256, 15 out. 2009.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford - Reino Unido: CABI Europe, 2008.

KOSARIC, N. Biosurfactants. In: **Biotechnology Set**. Boca Raton, Florida - EUA.: CRC Press, 2008. p. 659–717.

KRASOTKINA, J. et al. One-step purification and kinetic properties of the recombinant L-asparaginase from *Erwinia carotovora*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 39, n. Pt2, p. 215–221, 2004.

LAVINE, R. L.; DICINTIO, D. M. E. coli L-Asparaginase and insulin release in vitro. **Metabolism**, v. 31, n. 10, p. 1009–1013, 1982.

LEARY, N. O.; PEMBROKE, A.; DUGGAN, P. F. Improving accuracy of glucose oxidase procedure for glucose determinations on discrete analyzers. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 2, p. 298–302, 1992.

LIN, S. C. Biosurfactants: Recent advances. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 66, n. 2, p. 109–120, 1996.

LIU, J. et al. Screening and evaluation of biosurfactant producing strains isolated from oilfield wastewater. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 168–174, 2013.

LOPES, V. DOS S. **Prospecção de biomassas lignocelulósicas para co-produção de etanol de segunda geração e biosurfactante empregando processos químicos e enzimáticos**. 2017. 91 p. Tese (Doutorado em Ciência em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia- UFU, 2017.

MADIGAN; MARTINKO; PARKER. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2004.

MAKKAR, R.; CAMEOTRA, S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 4, p. 428–434, 2002.

MCCREDIE, K. B.; HO, H. D. W. H.; FREIREICH, E. J. L-asparaginase for the treatment of cancer. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 23, n. 4, p. 220–227, 1973.

MCCULLOCH, W. S.; PITTS, W. A logical calculus of the Ideas immanent in nervous activity. **Bulletin of Mathematical Biophysics**, v. 5, p. 115–133, 1943.

MEGHAVARNAM, A. K.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of L-asparaginase by *Fusarium culmorum* (ASP-87). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 124–130, jul. 2017.

MIYAKE, M.; YAMASHITA, Y. Molecular Structure and phase behavior of surfactants. In: **Cosmetic Science and Technology**. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 389–414.

MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 4, p. 867–880, 2014.

MÜLLER, H. J.; BOOS, J. Use of L-asparaginase in childhood ALL. **Critical Reviews in Oncology / Hematology**, v. 28, n. 2, p. 97–113, 3 maio 2017.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, n. 2, p. 183–198, jan. 2005.

NASCIMENTO, T. et al. Extracellular serine proteases by *Acremonium* sp. L1-4B isolated from Antarctica: Overproduction using cactus pear extract with response surface methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 737–744, 2015.

NIH. **Nacional Cancer Institute**. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/>>. Acesso em: 2 maio. 2017.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002.

OLIVEIRA, D. W. F. et al. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 1 jan. 2013.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81–84, 2003.

PANDIT, H. et al. Surfactant protein D inhibits HIV-1 infection of target cells via interference with gp120-CD4 interaction and modulates pro-inflammatory cytokine production. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

PANETTA, J. C. et al. Comparison of native *E. coli* and PEG-asparaginase pharmacokinetics and pharmacodynamics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 86, p. 651–658, 2009.

PETERSEN, J. H. **The Kingdom of Fungi**. 10. ed. Princetown - Oxford: Princeton University Press, 2013.

PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista - UNESP/Rio Claro, 2006.

PLAZA, G. A.; ZJAWIONY, I.; BANAT, I. M. Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 50, n. 1, p. 71–77, 16 jan. 2006.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 72, n. 1, p. 6–15, 2009.

PUI, C. H. et al. Risk factors for hyperglycemia in children with leukemia receiving L-asparaginase and prednisone. **Journal of Pediatrics**, v. 1, p. 46–50, 1981.

RANDHAWA, K. K. S. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: Challenges and opportunities. In: KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. (Eds.). **Biosurfactants: Production and Utilization: Processes, Technologies, and Economics**. 1st. ed. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 379.

REDDY, S. M. **University Botany I: (algae, fungi, bryophyta And pteridophyta)**. New Delhi-India: New Age International Publishers, 2001.

REPORTLINKER. **Oilfield surfactants - Global market outlook (2015-2022)**. Disponível em: <<http://goo.gl/piZ7WB>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

ROBERSON, J. R. et al. Clinical consequences of hyperglycemia during remission induction therapy for pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 23, n. 2, p. 245–250, 16 out. 2008.

RODRIGUES, L. R. Microbial surfactants: Fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 449, p. 304–316, 2015.

RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Biosurfactants and oil bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 249–252, 1 jun. 2002.

ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. **The Yeasts - Yeast Technology**. 2. ed. London - UK: Academic Press, 1993.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. Characteristic features of surfactants. In: **Surfactants and Interfacial Phenomena**. Nova Jersey - EUA: John Wiley and Sons, 2012. p. 1–38.

ROTH, G. **Produção de L-Asparaginase II recombinante de Erwinia carotovora em cultivos de Escherichia coli em batelada alimentada**. Porto Alegre: 2011. 53 p. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, 2011.

RUFINO, R. D. et al. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34–38, 2014.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Biosurfactant from *Pseudomonas* species with waxes as carbon source – Their production, modeling and properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 31, p. 100–111, 25 nov. 2015.

SÁNCHEZ, A. J. C.; SÁNCHEZ, H. H.; FLORES, M. E. H. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternative. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 22–32, 2013.

SANTOS, D. K. F. et al. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 105, p. 43–50, 2013.

SARAFIN, Y. et al. *Kocuria marina* BS-15 a biosurfactant producing halophilic bacteria isolated from solar salt works in India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 6, p. 511–519, dez. 2014.

SARUBBO, L. A.; FARIAS, C. B. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Co-utilization of canola oil and glucose on the production of a surfactant by *Candida lipolytica*. **Current Microbiology**, v. 54, p. 68–73, 2007.

SCHRAMM, L. L.; STASIUK, E. N.; MARANGONI, D. G. Surfactants and their applications. **Annual Reports Section “C” (Physical Chemistry)**, v. 99, n. 0, p. 3–48, 2003.

SCOTT, M. J.; JONES, M. N. The biodegradation of surfactants in the environment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1508, n. 1–2, p. 235–251, 23 nov. 2000.

SHAH, V. et al. Sphorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4093–4100, 2005.

SHI, R. et al. Biochemical characterization of a novel L-asparaginase from *Paenibacillus barengoltzii* being suitable for acrylamide reduction in potato chips and mooncakes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 93–99, mar. 2017.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1–10, 2016.

SOARES, A. L. et al. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 163–170, 26 abr. 2002.

SOUSA, T. G. C.; et al. Evaluation of biosurfactant production by yeasts from Antarctic. **Chemical Engineering Transactions**, v. 49 547-552, p. 547–552, 2016.

SOUZA, E. C.; PENNA, T. C. V.; OLIVEIRA, P. S. O. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 89, p. 88–94, 2014.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 2015. 125 p. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêutica) - Faculdade de 2015. 125 p. Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, 2015.

STATISTICS MRC. **Surfactants global market outlook - Trends, forecast, and opportunity assessment (2014-2022)**. Disponível em: <<http://goo.gl/ooetPo>>. Acesso em: 6 abr. 2017.

SUBRAMANIAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of science and natura**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

TAFNER, M. A. Redes Neurais Artificiais: Aprendizado e Plasticidade. **Revista Cérebro e Mente**, p. 4, 1998.

TALLAL, L. et al. *E. coli* L-asparaginase in the treatment of leukemia and solid tumors in 131 children. **Cancer**, v. 25, n. 2, p. 306–320, 1970.

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

VARALAKSHMI, V.; JAYA RAJU, K. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **IJRET: International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, p. 121–129, 2013.

VIDYA, J. et al. Therapeutic enzymes: L-Asparaginases BT - Current developments in biotechnology and bioengineering. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Eds.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. 1. ed. Elsevier, 2017. p. 249–265.

VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9–17, mar. 2017.

WACKER, P. et al. Allergic reactions to E. coli L-Asparaginase do not affect outcome in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 9, p. 627–632, 2007.

WARD, H. M. The nutrition of fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 1, p. 124–142, 1896.

WEBSTER, J.; WEBER, R. **Introduction to Fungi**. Cambridge, NY: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 2007.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms organisms. **Science**, v. 163, p. 150–163, 1969.

WIETCHOREK, P. J. A. G. et al. Assessment of *Zymomonas mobilis* and *Erwinia herbicola* for the anti leukaemia asparaginase production. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 1, p. 31–34, 2013.

WYATT, H. V. Miracle Cure: The story of antibiotics. **Medical History**, v. 35, n. 2, p. 275–276, 1991.

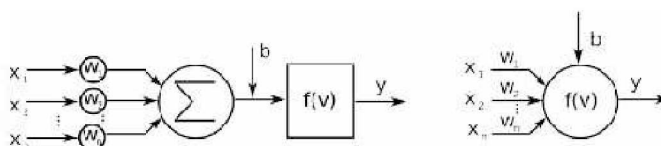
XU, F.; ORUNA-CONCHA, M. J.; ELMORE, J. S. The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. **Food Chemistry**, v. 210, p. 163–171, 1 nov. 2016.

APÊNDICE 1

O desenvolvimento das redes neurais ocorreu na década de 40. O neurofisiologista Warren McCulloch e o matemático Walter Pitts, da Universidade de Illinois foram os pioneiros neste desenvolvimento. Fizeram uma analogia entre células nervosas vivas e o processo eletrônico, criaram um modelo de resistores e amplificadores que representavam as conexões sinápticas de um neurônio biológico (MCCULLOCH; PITTS, 1943; TAFNER, 1998).

Uma rede neural artificial (RNA) é formada por uma camada de entrada, outra de saída e uma ou mais camadas intermediárias ou ocultas (Figura 13). Essa rede de conexões visa transmitir informações entre os neurônios de forma unidirecional .

Figura 25: Rede neural artificial.



Fonte: Coutinho filho, 2015; Lopes, 2017.

Nesta figura são mostradas duas representações para um neurônio artificial. A rede recebe informações (x_1, x_2, \dots, x_n) e a partir destas gera uma resposta (y) . No neurônio v ocorre a soma das informações recebidas multiplicadas pelos seus respectivos pesos (w_1, w_2, \dots, w_n) mais as tendências (b) , formando o que se chama de potencial de ativação (f) , uma função que gera a resposta de interesse (COUTINHO FILHO, 2015; LOPES, 2017).

As variantes de uma rede neural artificial são inúmeras, e combinando-as, pode-se mudar a arquitetura conforme a aplicação. Os itens que compõem uma rede neural artificial são, basicamente:

- conexões entre camadas;
- camadas intermediárias;
- quantidade de neurônios;
- função de transferência;
- algoritmo de aprendizado.

Uma das propriedades mais importantes de uma rede neural artificial é a capacidade de aprender por meio de exemplos e, a partir disso, fazer inferências sobre o que aprendeu, melhorando seu desempenho (FERNEDA, 2006). A utilização de redes neurais

na otimização pode ser realizada pelo uso de métodos heurísticos. O objetivo da otimização é encontrar uma solução ótima para um problema que satisfaça uma ou mais funções objetivo possivelmente sujeitas a um conjunto de restrições (COUTINHO FILHO, 2015; LOPES, 2017).