



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



Higor Túlio Correa

**Produção de L-asparaginase por fermentação em estado
sólido em diferentes tipos de biorreatores e seleção de
microrganismos**

Uberlândia - MG

Fevereiro de 2019



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Engenharia Química
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



Higor Túlio Correa

Produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido em diferentes tipos de biorreatores e seleção de microrganismos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho

Uberlândia - MG

Fevereiro de 2019

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

C824p 2019 Correa, Higor Túlio, 1994
 Produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido em diferentes tipos de biorreatores e seleção de microrganismos[recurso eletrônico] / Higor Túlio Correa. – Fevereiro de 2019.
 89 p.: il.

Orientador: Ubirajara Coutinho Filho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5516>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia química - Teses. 2. Fermentação - Teses. 3. Enzimas - Teses. 4. Material inerte - Teses. 5. Novas biomassas. I. Coutinho Filho, Ubirajara, 1970-, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

CDU:66.0



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1K, Sala 206 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34)3239-4249 - www.ppgeq.feq.ufu.br - secppgeq@feq.ufu.br



ATA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia.

DEFESA DE: Dissertação de Mestrado Acadêmico, 03/2019, PPGEQ

DATA: 13 de fevereiro de 2019 - 14:00

DISCENTE: 11722EQU006 - Higor Túlio Correa

TÍTULO DO TRABALHO: Produção de L-asparaginase por FES em diferentes biorreatores com seleção de microrganismos

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Desenvolvimento de Processos Químicos

LINHA DE PESQUISA: Engenharia Bioquímica

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Coleta e seleção de cepas e estudo da produção, purificação e utilização de enzimas em processos

Às 14 horas do dia 13 de fevereiro do ano de 2019, na sala 1K228 - *Campus* Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, assim composta: Professores Doutores: Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM; Patrícia Angélica Vieira - PPGEQ/UFU; Vicelma Luiz Cardoso - PPGEQ/UFU e Ubirajara Coutinho Filho - PPGEQ/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa, Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o Candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir, o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o candidato. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado e não estabeleceu novo título para o trabalho.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 16 horas e 50 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Ubirajara Coutinho Filho - PPGEQ/UFU - Orientador

Diego Andrade Lemos - ICTE/UFTM

Patrícia Angélica Vieira - PPGEQ/UFU



Documento assinado eletronicamente por **Ubirajara Coutinho Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/02/2019, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Andrade Lemos, Usuário Externo**, em 13/02/2019, às 16:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Angelica Vieira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 13/02/2019, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vicelma Luiz Cardoso, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/02/2019, às 13:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0996362** e o código CRC **50FDC6B8**.

Aos meus pais José Carlos Correa e Lúcia Helena Correa, pelo amor, incentivo e apoio incondicional. A minha irmã Thaynara Correa pelo companheirismo.

Aos meus amigos que se fizeram presentes em todos os momentos, fornecendo suporte e motivação. À minha namorada Bruna Afonso, pelo apoio e paciência por minha ausência nas horas de estudos.

Agradecimentos

Meu agradecimento em especial ao Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho, meu orientador, pelo apoio irrestrito, por estar sempre a disposição, pelas orientações cruciais para o desenvolvimento do trabalho e por partilhar seu conhecimento e experiência.

Ao doutorando William Vieira da Universidade Federal de Uberlândia do curso de Pós-graduação em Engenharia Química pela parceria e ajuda na realização do projeto de pesquisa.

Aos funcionários, técnicos e professores da Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, que de alguma forma, contribuíram para a minha formação e para a realização desse trabalho.

As instituições de fomento e pesquisa FAPEMIG, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a todos amigos do laboratório do NUCBIO por compartilhar as experiências e o tempo. Aprendi muito com cada um de vocês!

Agradeço aos meus pais e irmã meus maiores exemplos. Sou grato pelo incentivo, dedicação e amor incondicional. Obrigado por estarem sempre ao meu lado!

A minha namorada Bruna Afonso pelo companheirismo, apoio, compreensão, por estar presente em todos os momentos, pelos conselhos e todo carinho para a conclusão dessa jornada.

Aos meus amigos que me inspiraram a me tornar um profissional melhor a cada dia. Obrigado pelo suporte necessário para chegar até aqui.

Enfim, agradeço a todos aqueles que participaram comigo de alguma forma nessa trajetória e que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho.

*“Faça as coisas o mais simples
que você puder,
porém não se restrinja às mais simples”.*
(Albert Einstein)

Resumo

A L-asparaginase é uma enzima de interesse farmacêutico e da indústria de alimentos com diversos usos, com destaque o uso no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) e na contenção de acrilamida presente em alimentos processados em elevadas temperaturas. Embora atualmente a L-asparaginase comercial seja de origem bacteriana, há o interesse em novos microrganismos promissores capazes de produzi-la através de fermentação em estado sólido (FES). Neste trabalho foi investigado a produção de L-asparaginase por FES avaliando diferentes meios inertes, fungos e fontes de nutrientes em dois tipos de biorreatores (estático e rotativo). Na seleção dos microrganismos, foram testadas cinco leveduras (*Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida globosa*, *Cryptococcus victori* e *Leucosporidium scottii*) e três fungos filamentosos (*Penicillium* sp. LAMAI-505, *Fusarium* sp. e o *Monilia sitophila*). Referente aos suportes sólidos inertes, foram avaliados a fibra cerâmica, a espuma de poliuretano e a lã de vidro. Com relação a fonte de nutrientes, foram investigados o uso de glicose, L-asparagina, glicerol e uma solução nutritiva oriunda do *Tenebrio molitor*. No que diz respeito a escolha do microrganismo, o *Penicillium* sp. LAMAI-505 foi selecionado por ser eficiente na produção de L-asparaginase e por ser classificado como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela FDA (administração americana de comidas e drogas), por isso é amplamente aplicado na indústria alimentícia e no uso para produção de medicamentos. No que se refere ao meio inerte, foi observado que o fungo escolhido apresentou melhor adaptação no suporte sólido inerte de fibra cerâmica para obtenção de L-asparaginase, onde o uso de glicose (10 g/L) e L-asparagina (1 g/L) como fonte nutritiva atingiu atividade de 1591,7 U/kg de suporte sólido. Apesar do uso de *Tenebrio molitor* (5 g/100 mL) juntamente com o uso de glicerol (1 g) se tratar de uma biomassa complexa, possibilitou a produção de L-asparaginase (596,7 U/kg de suporte sólido). A aplicação de glicerol e de solução de *Tenebrio molitor* foram realizadas de duas maneiras: a) glicerol aplicado diretamente no suporte sólido inerte, sendo que em condições otimizadas de pH (1,2), concentração da fonte nutritiva (7,5 g de glicerol e 15 g/100 mL de *Tenebrio molitor*) e tempo (48 horas) atingiu atividade de 3391,7 U/kg; b) glicerol aplicado diretamente na solução nutritiva nas condições otimizadas de pH (1,2), concentração da fonte nutritiva (15 g/L de glicerol e 10 g/100 mL de *Tenebrio molitor*) e tempo (48 horas), atingiu atividade de 2666,7 U/kg de suporte sólido. Desta forma, optou-se por utilizar na FES com suporte sólido inerte o glicerol aplicado diretamente na solução nutritiva, devido a grande economia materiais adicionadas, sendo esta usada no biorreator rotativo (mantido a 5 rpm), que em condição otimizada obteve atividade de L-asparaginase de 2758,3 U/kg de suporte sólido.

Palavras-chave: L-asparaginase, fermentação em estado sólido, novas biomassas, materiais sólidos inertes.

Abstract

L-asparaginase is an enzyme of pharmaceutical interest and the food industry with several uses, highlighting the use of non-treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and the containment of acrylamide present in processed foods at high temperatures. Although commercial L-asparaginase is currently of bacterial origin, there is interest in promising new microorganisms capable of producing it by solid state fermentation (FES). In this work we investigated the production of L-asparaginase by FES evaluating different inert media, fungi and nutrient sources in two types of bioreactors (static and rotary). In the selection of the microorganisms, five yeasts (*Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida globosa*, *Cryptococcus victori* and *Leucosporidium scotti*) and three filamentous fungi (*Penicillium* sp., LAMAI-505, *Fusarium* sp. and *Monilia sitophila*). Regarding the inert solid supports, the ceramic fiber, the polyurethane foam and the glass wool were evaluated. Regarding the source of nutrients, the use of glucose, L-asparagine, glycerol and a nutrient solution from the *Tenébrio molitor* were investigated. As regards the choice of the micro-organism, *Penicillium* sp. LAMAI-505 was selected for being efficient in the production of L-asparaginase and being classified as GRAS (generally recognized as safe) by the FDA (American Food and Drug Administration), so it is widely applied in the food industry and in use for production of medicines. As regards the inert medium, it was observed that the selected fungus presented better adaptation in the inert solid support of ceramic fiber to obtain L-asparaginase, where the use of glucose (10 g/L) and L-asparagine (1 g/L) as nutrient source reached activity of 1591.7 U/kg of solid support. Although the use of thermocycler (5 g/100 ml) together with the use of glycerol (1 g) was a complex biomass, it enabled the production of L-asparaginase (596.7 U/kg support solid). The application of glycerol and solution of *Tenébrio molitor* was carried out in two ways: a) glycerol applied directly to the solid inert support, under optimized conditions of pH (1,2), concentration of nutrient source (7.5 g of glycerol and 15 g/100 ml of *Tenébrio molitor*) and time (48 hours) reached activity of 3391.7 U/kg; b) glycerol applied directly to the nutrient solution under optimized conditions of pH (1,2), concentration of the nutrient source (15 g/L glycerol and 10 g/100 mL of *Tenébrio molitor*) and time (48 hours) , reached activity of 2666.7 U/kg of solid support. In this way, it was chosen to use in FES with solid inert support the glycerol applied directly to the nutrient solution, due to the great economy added materials, being used in the rotary bioreactor (maintained at 5 rpm), which in optimized condition obtained L activity -asparaginase of 2758.3 U/kg of solid support.

Keywords: L-asparaginase, solid state fermentation, novel biomass, inert solid materials.

Lista de ilustrações

Figura 1 – História da descoberta da atividade anti-linfoma da enzima L-asparaginase	31
Figura 2 – Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase	32
Figura 3 – Representação esquemática da LLA no plasma sanguíneo	33
Figura 4 – Caminhos propostos para a formação de acrilamida após a degradação de Strecker do aminoácido asparagina na presença de produtos dicarbonílicos da reação de Maillard.	35
Figura 5 – Larvas desidratadas do <i>Tenébrio molitor</i>	40
Figura 6 – Fibra cerâmica utilizada na FES como suporte inerte	42
Figura 7 – Espuma de poliuretano utilizada na FES como suporte inerte	43
Figura 8 – Biorreatores com aeração superficial sem agitação	45
Figura 9 – Biorreatores com aeração forçada e sem agitação	45
Figura 10 – Biorreatores com aeração superficial e com agitação	46
Figura 11 – Biorreatores com aeração forçada e com agitação	46
Figura 12 – Fluxograma referente ao material e os métodos utilizados	49
Figura 13 – Suportes sólidos inertes	51
Figura 14 – Moagem das larvas de <i>Tenébrio molitor</i>	52
Figura 15 – Características e dimensões do biorreator rotativo aplicado em FES-SI	53
Figura 16 – Reações para a quantificação de L-asparaginase	54
Figura 17 – Procedimento de análise da L-asparaginase	55
Figura 18 – Teste com Leveduras com uso da espuma de poliuretano como suporte sólido	59
Figura 19 – Teste comparativo entre Leveduras e o <i>Penicillium</i> sp. LAMAI-505 com uso de diferentes suportes sólidos	60
Figura 20 – Microscopias eletrônicas	61
Figura 21 – Teste comparativo entre os fungos filamentosos: <i>Penicillium</i> sp. LAMAI-505, <i>Fusarium</i> sp. e <i>Monilia sitophila</i> com uso de diferentes suportes sólidos	62
Figura 22 – Teste com o <i>Penicillium</i> sp. com o uso do <i>Tenébrio molitor</i> como biomassa na fibra cerâmica	64
Figura 23 – Compilação de gráficos de superfície de resposta da interação entre as variáveis pH, glicerol e <i>T. molitor</i> .	68
Figura 24 – Uso do <i>Tenébrio molitor</i> como biomassa e influência do glicerol na superfície do suporte inerte	69
Figura 25 – Análises das FES com glicerol na superfície do suporte inerte	70
Figura 26 – Análise de FES variando o pH	71
Figura 27 – Análise de FES variando com o tempo	72
Figura 28 – Uso do <i>Tenébrio Molitor</i> como biomassa e influência do glicerol na solução nutritiva	73

Figura 29 – Análises das FES com com glicerol na solução nutritiva	74
Figura 30 – Análise de FES variando o pH	75
Figura 31 – Análise de FES variando com o tempo	76
Figura 32 – Análise de FES no biorreator rotativo variando com o tempo	77

Lista de tabelas

Tabela 1 – Uso de enzimas em fármacos	29
Tabela 2 – Microrganismos testados	50
Tabela 3 – Planejamento experimental	55
Tabela 4 – Combinações entre glicerol na superfície do suporte inerte e <i>Tenébrio molitor</i>	56
Tabela 5 – Combinações entre glicerol na solução nutritiva e <i>Tenébrio molitor</i>	56
Tabela 6 – Resultados da otimização da produção de L-asparaginase.	66
Tabela 7 – Resultados estatísticos	67
Tabela 8 – Combinações entre glicerol na superfície do suporte inerte e <i>Tenébrio molitor</i>	70
Tabela 9 – Combinações entre glicerol na solução nutritiva e <i>Tenébrio molitor</i>	73

Lista de abreviaturas e siglas

CRM	Centro de Recurso Microbianos
EC	<i>Enzime Commission</i>
FDA	Administração Americana de Comidas e Drogas
FES	Fermentação Estado Sólido
FES-SI	Fermentação Estado Sólido com Suporte Inerte
FS	Fermentação Submersa
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
IARC	International Agency for Research Cancer
IC	Imobilização de Células
LAMAI	Código de armazenamento no CRM
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MI	Microrganismo imobilizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
SOBOPE	Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica

Lista de símbolos

%	Porcentagem
α	Alfa
μ	Micro ou 10^{-6} unidade de medida
(v / v)	Volume por Volume
Λ	Atividade de L-asparaginase
δ	Leitura de Absorbância
θ	Tempo de incubação (minuto)
U/Kg	Unidade por Kilograma
Vol_{Ext}	Volume da solução de extração (mL)
$Vol_{Amostra}$	Volume da amostra de análise (mL)
$F_{Diluição}$	Fator de diluição da amostra

Sumário

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Introdução	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1	Enzimas	29
3.2	Contextualização histórica da L-asparaginase	30
3.3	L-asparaginase	31
3.3.1	Uso terapêutico	32
3.3.1.1	Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)	33
3.3.2	Uso na indústria de alimentos	34
3.4	Fungos	35
3.4.1	Leveduras	36
3.4.2	Fungos filamentosos	37
3.5	Produção da L-asparaginase	38
3.5.1	Fermentação submersa (FS)	38
3.5.2	Fermentação em estado sólido (FES)	38
3.6	Nova fonte nutritiva	39
3.7	Suportes inertes	41
3.7.1	Fibra cerâmica	41
3.7.2	Espuma de poliuretana	42
3.7.3	Lã de vidro	43
3.8	Biorreatores	44
3.8.1	Biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Microrganismos testados para a produção de L-asparaginase	50
4.2	Suportes sólidos utilizados inicialmente na FES	50
4.3	Preparação do meio nutritivo por hidrólise	51
4.4	Fermentação em estado sólido com suporte inerte (FES-SI)	52
4.5	Análise da L-asparaginase	53
4.6	Planejamento experimental	55

5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1	Seleção de microrganismos e meio sólido inerte	59
5.2	Estudo da nova fonte nutritiva na produção de L-asparaginase	63
5.3	Otimização da produção da enzima L-asparaginase por FES empregando o planejamento experimental com composto cen- tral rotacional 2^3	65
5.4	Produção de L-asparaginase avaliando o efeito da hidrólise em conjunto com a adição de glicerol	69
5.4.1	Adição de glicerol na superfície do meio sólido	69
5.4.2	Adição de glicerol na solução nutritiva	72
5.5	Otimização com o uso do biorreator rotativo	76
6	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

1 Introdução

1.1 Introdução

Enzimas são proteínas ou macromoléculas biológicas que são produzidas por organismos para provocar uma reação bioquímica específica, por apresentar atividade biocatalítica, catalisam e aumentam a velocidade de ocorrência de reações químicas (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002). As enzimas destinadas aos usos terapêuticos devem possuir um alto grau de pureza, especificidade e farmacocinética, como a L-asparaginase que pode ser encontrada em microrganismos, plantas, animais e no soro de certos roedores, porém não é encontrada em seres humanos (DORIYA et al., 2016; VIDYA et al., 2017).

A L-asparaginase (L-asparagina amido hidrolase E.C.3.5.1.1) é uma enzima do grupo das amidases, que catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina à ácido L-aspártico e amônia, por isso apresenta aplicação clínica no tratamento de malignidades do sistema linfóide e da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (CUNHA et al., 2018; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2017).

Na indústria de alimentos a L-asparaginase apresenta grande potencial na redução da produção de acrilamida, produto nocivo a saúde produzido em alimentos processados em elevadas temperaturas (PEDRESCHI et al., 2011). A acrilamida é classificada como um provável carcinógeno humano que é formada a partir da reação de Maillard em alimentos com altos teores de açúcares redutores na presença de L-asparagina durante seu preparo térmico (SUN et al., 2016).

Ainda que a obtenção desta enzima possa vir de um grande agrupamento de fontes naturais, os microrganismos tem a preferência para a produção em larga escala de L-asparaginase e seu uso em aplicações clínicas e industriais (GUPTA; DASH; BASAK, 2009a; IZADPANA et al., 2018). Nos dias atuais a produção de L-asparaginase em escala industrial é feita através da fermentação submersa (FS) com as bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; SAEED et al., 2017).

Contudo, a enzima proveniente de microrganismos procarióticos apresenta alguns problemas devido a incompatibilidade com o sistema humano, como hipersensibilidade e inativação imunológica (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007). Sendo assim se torna crucial a procura de novas origens de microrganismos produtores dessa enzima, visando amenizar os efeitos colaterais indesejados resultantes da L-asparaginase bacteriana. Microrganismos eucarióticos para produção da enzima, como os fungos filamentosos e leveduras, são usados na tentativa de minimizar os efeitos colaterais e suprir o mercado global com o tratamento da LLA (CACHUMBA et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

A FS é empregada devido a efetiva difusão microbiana no meio, disponibilidade dos nutrientes e boa transferência de massa e calor no processo fermentativo, entretanto, é um processo de alto custo operacional, carece de grandes demandas de energia. Além do mais produz pouco com alta liberação de efluentes quando comparada com a fermentação em estado sólido (FES) (DORIYA et al., 2016; IRFAN et al., 2016).

A FES é um processo fermentativo, que acontece sobre um meio sólido insolúvel que age como suporte físico e como fonte de nutrientes para os microrganismos, contendo apenas água capaz de garantir o crescimento microbiano e as atividades metabólicas das células, dentro da capacidade de retenção de água do substrato sólido (DURAND; BROISE; BLACHERE, 1988; SINGHANIA et al., 2009). A FES apresenta diversas vantagens, dentre elas a alta produtividade e reprodutibilidade, alta estabilidade do produto, baixa repressão catabólica e baixa contaminação bacteriana (ZHAO et al., 2018).

Dentre os tipos de FES a fermentação em estado sólido em suporte inerte (FES-SI) vem sendo utilizada por ser um método limpo e de grande potencial para reutilização do suporte inerte, além das fáceis condições operacionais (KOURKOUTAS; KANELLAKI; KOUTINAS, 2006). A manta de fibra cerâmica é um material que tem alta aplicabilidade para a FES-SI visando encontrar novos tipos de reatores. Sendo assim, por se tratar de material versátil, de fácil manipulação, por possuírem células abertas, permeáveis a gás e líquido, possibilitando a geração de materiais mais puros, as fibras cerâmicas são ótimas opções de suporte sólido para a FES-SI.

A busca pela obtenção e otimização de novos procedimentos e fontes para produção de L-asparaginase voltou a ser especulada devido a um recente episódio no mercado brasileiro referente a falha no abastecimento, ameaçando o tratamento de centenas de pacientes (FIOCRUZ, 2016). Através desse perigo de desabastecimento, a Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica realizou um acordo junto ao Ministério da Saúde, para a compra do medicamento visando suprir a demanda, mantendo o tratamento dos pacientes (SOBOPE, 2016a; SOBOPE, 2016b).

Com isso, se nota a importância de se encontrar novas formas de obtenção da L-asparaginase para reduzir os custos operacionais e aumentar a disponibilidade da enzima. Logo, o presente trabalho tem por objetivo geral testar e selecionar um microrganismo eucariótico, entre leveduras e fungos filamentosos, o mais adequado para o desenvolvimento do trabalho, empregando o processo de fermentação em estado sólido em biorreatores, utilizando suporte inerte com meio nutritivo, buscando as condições ótimas de processo, com a maior de produção de L-asparaginase.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Produzir L-asparaginase por fermentação em estado sólido (FES) explorando o uso de diferentes microrganismos, biomassas e suportes inertes, buscando condições ótimas de processo.

2.2 Objetivos específicos

- Testar e selecionar o meio inerte (espuma de poliuretana, fibra cerâmica e lã de vidro) mais promissor para a realização da FES, para a aplicação do microrganismo e produção da enzima L-asparaginase;
- Estudar a produção de L-asparaginase pelas leveduras (*Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida globosa*, *Cryptococcus victori* e *Leucosporidium scotti*) e pelos fungos filamentosos (*Penicillium* sp. LAMAI-505, *Fusarium* sp. e o *Monilia sitophila*) testados por FES;
- Investigar a eficiência das fontes nutritivas: glicose, L-asparagina, glicerol e solução de *Ténebrio molitor*, para a obtenção de L-asparaginase.
- Avaliar as condições de pH e tempo de processo.
- Avaliar a FES nas condições otimizadas em diferentes biorreatores, estático e rotativo.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Enzimas

Enzimas são proteínas que catalisam reações bioquímicas. Com isso, sustentam o pilar catalítico do metabolismo sendo indispensáveis para a saúde geral e também se fazem presentes em inúmeros processos produtivos. São responsáveis por catalisar diversas reações químicas que são essenciais para a manutenção da vida, apresentando uma vasta heterogeneidade de especificidades de substrato e reação. Assim, as enzimas se tornaram fontes de pesquisas intensivas e multidisciplinares para diversas áreas em todo mundo (ALMONACID; BABBITT, 2011; IZADPANAHA *et al.*, 2018).

Por serem utilizadas como catalisadores as enzimas apresentam importantes aplicações em sistemas biológicos e em processos industriais, como por exemplo em produções do ramo alimentício, de celulose e papel e farmacêutico (PRADHAN; PADHY; SAHOO, 2017). Na produção de fármacos são empregadas em diversas aplicações, como mostrado na Tabela 1. Comumente as enzimas utilizadas na biotecnologia são advindas de microrganismos, que por sua vez podem ser selecionados na natureza, ou, modificados geneticamente para ganhar eficiência na produção da enzima de interesse (BARROS; SERAFINI; AZEVEDO, 2001).

Tabela 1 – Uso de enzimas em fármacos

Enzima	Fonte	Nome comercial	Uso terapêutico
Urato oxidase	<i>Aspergillus avus</i>	Uricozyme	Gota
Lipase	<i>Rhizopus arrhizus</i>	—	Auxiliar digestivo
Lisozima	Clara de ovos	Murazyme	Antibiótico
Colagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	Santyl Collagenase	Úlceras de pele
L-asparaginase	<i>Escherichia coli</i>	Elspar	Leucemia linfoblástica aguda (LLA) e outras

Fonte: Adaptado de AEHLE (2007), Cruz *et al.* (2008).

O uso de microrganismos para obtenção de enzimas em escala industrial, consegue se destacar em relação a outros sistemas biológicos, pela capacidade de aproveitar materiais residuais industriais como fonte de nutrientes e crescimento, alto rendimento a partir na ma-

nipulação gênica e otimização das condições de cultivo (HAIKI; RAKSHIT, 2003; ORLANDELLI et al., 2012).

As enzimas são categorizadas em seis grupos: oxidorredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Além disso, podem ser designadas por nomes que obedecem a uma sistemática e são divididas em duas partes: uma indicando o substrato e a outra indicando a natureza da reação, feita de acordo com o Enzyme Commission (E.C). Normalmente no nome da respectiva enzima é acrescentado o sufixos (ase) (CUESTA et al., 2015).

3.2 Contextualização histórica da L-asparaginase

A enzima passou a ser alvo de pesquisas a partir de estudos que colaboraram para a descoberta de que a L-asparaginase poderia ser aplicada como agente antineoplásico, sendo o estudo pioneiro realizado por CLEMENTI (1922), que estudou linfoma em mamíferos e observou que o soro sanguíneo de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) ocasionava a morte dos linfomas, apresentando um alto potencial antitumoral, sem afirmar quais moléculas ou compostos estavam envolvidos nesta atividade.

KIDD (1953a), com seus estudos descobriram que o constituinte ativo do soro, com atividade contra o linfoma, tinha origem proteica, o autor verificou também por meio de estudos in vivo em camundongos e em coelhos, que o soro do porquinho da Índia era efetivo em promover a remissão do crescimento das células de linfoma.

A partir da descoberta sobre o potencial do uso da L-asparaginase por meio do trabalho do KIDD (1953b), aumentou o número de pesquisas realizadas no mundo todo, porém apenas em 1961 com os estudos de Broome que houve evidências de que o constituinte proteico ativo no soro que era responsável pelos efeitos antitumorais era proveniente da enzima L-asparaginase (BROOME, 1963a; BROOME, 1963b).

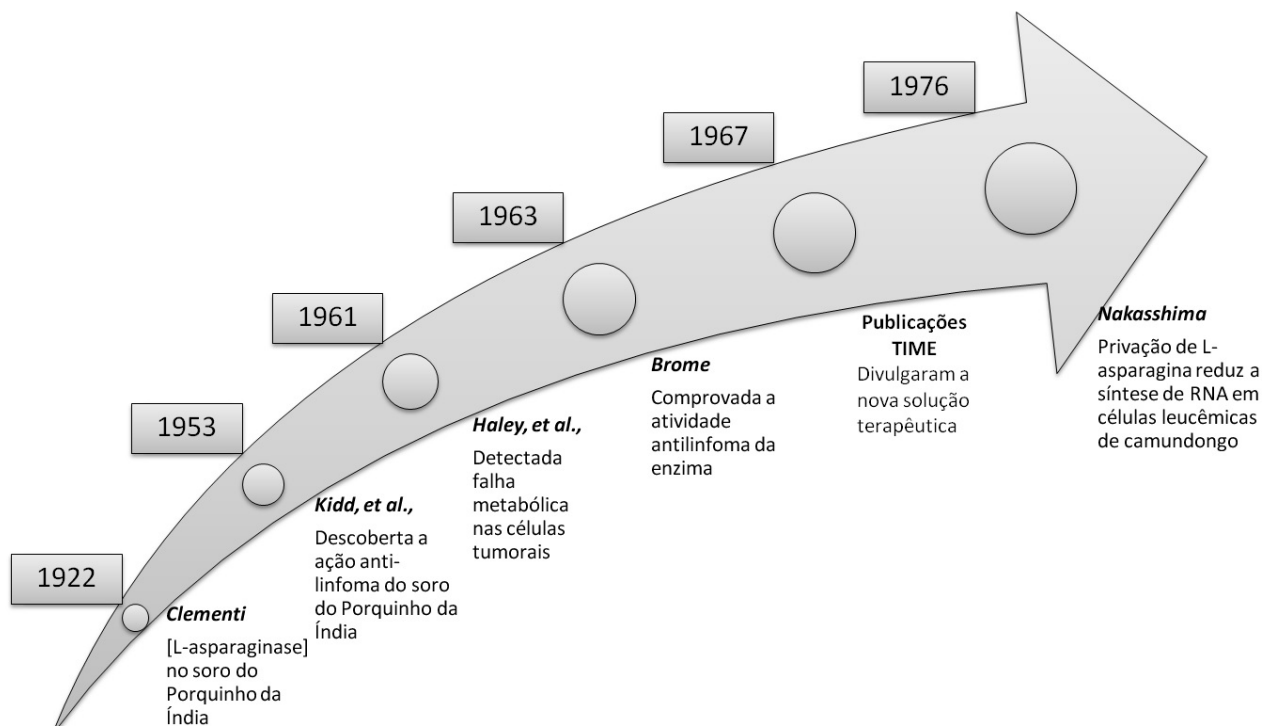
Pouco antes disso, em 1961 uma pesquisa apontou para um significado bioquímico que poderia ser aproveitado na quimioterapia, quando HALEY, FISCHER e WELCH (1961) notaram que a L-asparagina, que é um aminoácido não essencial para seres humanos, contribuía de forma efetiva no crescimento de linfoblastos e pela reprodução dessas células. Visto que, as células tumorais necessitam desse aminoácido para seu crescimento, indicando uma incapacidade de síntese dessas células, ou um papel não usual no metabolismo. Resultados que foram consolidados anos depois ao se notar que a síntese de RNA era prejudicada quando havia uma privação de L-asparagina, em células leucêmicas de camundongo (NAKASHIMA et al., 1976).

Em abril de 1967, foi publicado uma matéria intitulada “Secret from the Guinea Pigs” na seção Health Medicine, na renomada revista Time, que foi descoberto um novo tratamento contra algumas formas de câncer, na qual declarava que um menino de 9 anos, portador de

leucemia linfoblástica aguda (LLA), conseguiu se curar da doença. A criança que apresentava um quadro avançado foi tratada com a enzima purificada obtida da bactéria *Escherichia coli*. A notícia criou muitas expectativas sobre as novas abordagens do tratamento da LLA, causando grande repercussão (TIME, 1967a).

Nesse mesmo ano em publicações posteriores, ressaltavam que precisava ter cautela sobre a cura do câncer, onde uma criança chegou a óbito durante o tratamento com a enzima, devido ao desenvolvimento de um quadro alérgico em paralelo com uma pneumonia, demonstrando que a cura ainda não havia sido alcançada. No final desse mesmo ano um editorial foi publicado questionando, contra quais tipos de câncer a enzima era efetiva, se era efetiva em pacientes como apontavam os testes laboratoriais e quais seriam seus efeitos colaterais. E já havia evidências de que os casos de leucemias seriam particularmente os maiores beneficiados com o tratamento (TIME, 1967b; TIME, 1967c; TIME, 1967d). A Figura 1 mostra a linha do tempo que descreve a contextualização histórica da L-asparaginase.

Figura 1 – História da descoberta da atividade anti-linfoma da enzima L-asparaginase



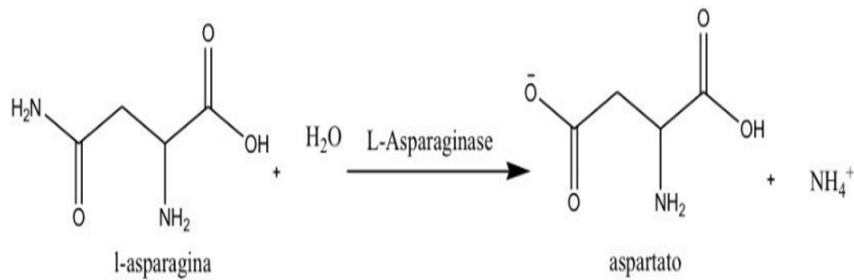
Fonte: Adaptado de [Goncalves \(2017\)](#).

3.3 L-asparaginase

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) é a enzima que tem a capacidade de hidrolisar o grupo amida da cadeia do aminoácido L-asparagina, obtendo como produtos da reação o ácido aspártico e amônia (CHOW; TING, 2015). A enzima catalisa a hidrólise do nitrogênio do grupo

amida da cadeia lateral do aminoácido, cortando parte do suprimento das células tumorais impedindo assim que essas cresçam e ganhem força, diminuindo o desenvolvimento do câncer usando o aminoácido L-asparagina (BERG, 2011), como mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Reação catalisada pela enzima L-Asparaginase



Fonte: Adaptado de Narta, Kanwar e Azmi (2007).

A reação enzimática de hidrólise realizada pela L-asparaginase esgota rapidamente os níveis celulares de asparagina no corpo. Nas células normais, L-asparagina não é um aminoácido essencial, pois é possível sintetizá-lo através da L-asparagina sintetase, sendo essa enzima a única disponível para a síntese do aminoácido. Como algumas células tumorais não conseguem garantir seu próprio fornecimento de asparagina, a resposta ao tratamento com a L-Asparaginase é efetiva, visto que as células são dependentes de uma oferta extracelular do aminoácido (DHALE; MOHAN-KUMARI, 2014).

A L-asparaginase tem sido utilizada como um biofármaco anti-tumoral clinicamente satisfatório para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda e sarcoma linfático (PIETERS et al., 2011). Na indústria de alimentos é utilizada no controle de acrilamida em produtos processados em altas temperaturas.

3.3.1 Uso terapêutico

Há mais de trinta anos a enzima L-asparaginase vem sendo utilizada como agente quimioterapêutico para o tratamento de leucemia linfoblástica aguda, pois consegue transformar a L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia (FARAG et al., 2015). Resultando em no esgotamento da asparagina, um suprimento exógeno do qual é necessário para o crescimento de certos tumores (GUPTA; DASH; BASAK, 2009a).

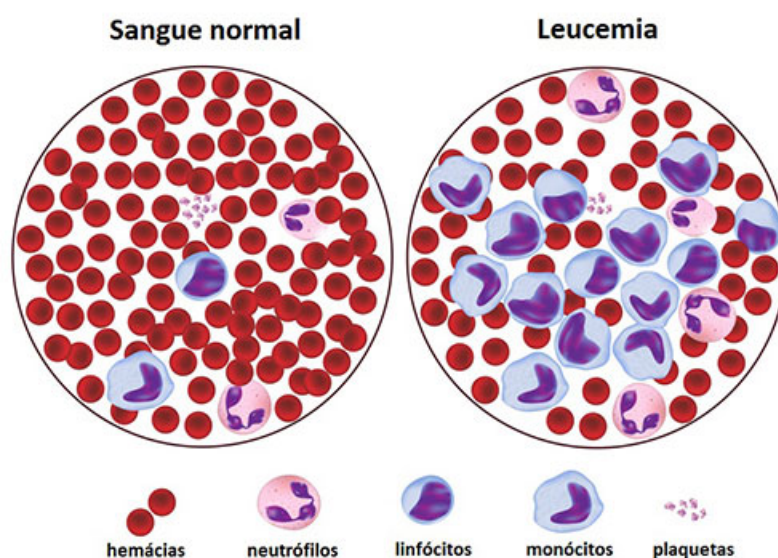
Atualmente, a L-asparaginase disponível comercialmente possui duas origens: *Escherichia colie* e *Erwinia carotovora*, ambas as L-asparaginases são produzidas por fermentação submersa em grande escala (IZADPANAHAH et al., 2018). No Brasil a L-asparaginase provém da fermentação submersa utilizando a *Escherichia colie*, e seu nome comercial é Elspar[®], esse medicamento quando utilizado por longos períodos, podem acarretar em hipersensibilidade nos pacientes, podendo gerar reações alérgicas e anafilaxia (DIVINO, 2015).

As aplicações terapêuticas em que a *L-asparaginase* é comumente indicada são para o tratamento: da doença de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda principalmente em crianças, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda e leucemia linfocítica crônica, tratamento com linfossarcoma, reticulossarcoma e melanossarcoma (THENMOZHI et al., 2011).

3.3.1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

A LLA é um tipo de câncer que se desenvolve nas células linfóides da medula, células essas que dão origem aos linfócitos. A neoplasia maligna de linfócitos causa cerca de 30% de todos os cânceres diagnosticados em crianças com idade inferior a 15 anos. A troca entre as células hematopoiéticas normais pelas células leucêmicas (blastos), assim como o crescimento descontrolado destas células no tecido linfóide e em sítios extramedulares são os principais sintomas da LLA (ALMEIDA, 2015; BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; ONCIU, 2009), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Representação esquemática da LLA no plasma sanguíneo



Fonte: Adaptado de Divino (2015).

Os sintomas da doença podem variar muito entre os portadores, onde está relacionada com os graus de anemia, neutropenia e trombocitopenia, alterações laboratoriais comuns dos pacientes com LLA, além da presença de infiltração leucêmica extra-medular (KEBRIAEEI; ANASTAS; LARSON, 2003; LEITE et al., 2007). Porém apresenta como principal sintoma o aparecimento de blastos, que tomam o lugar das células hematopoiéticas normais, assim como pelo aumento exagerado destas células no tecido linfóide (NEHMY et al., 2011; ONCIU, 2009).

Com diagnósticos mais precisos, desenvolvimento de novos medicamentos e protocolos terapêuticos mais aperfeiçoados, se nota um progresso na remissão e sobrevida dos pacientes, onde em meados dos anos 60 os índices de sobrevida era de 10%, já nos dias atuais tem médias de 75% (CHEOK; EVANS, 2006; HENZE, 2008; PUI; EVANS, 2006).

Entre as drogas com potencial para o tratamento da LLA, a enzima L-asparaginase é uma das mais utilizadas pela capacidade de converter o aminoácido L-Asparagina em ácido aspártico (SHRIVASTAVA et al., 2016). Para conseguir atingir rápidos níveis de crescimento as células malignas necessitam de grandes teores de asparagina, sendo assim estas células neoplásicas necessitam usufruir de níveis desse aminoácido acima do que é produzido pela própria célula, precisando buscar no soro sanguíneo para satisfazer sua grande demanda (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

Por ter se mostrado eficiente no processo de esgotamento extracelular de L-asparagina, a L-asparaginase, o tratamento da LLA passa pelo processo de quimioterapia com essa enzima, sendo injetada de forma intravenosa ou intramuscular, visando a inibição da síntese proteica em linfoblastos e induz à apoptose da população de células neoplásicas (ALMEIDA, 2015; FERNANDEZ et al., 2013). A importância da L-asparaginase como agente antitumoral despertou a atenção dos pesquisadores, levando à busca de novas formas de produção dessa enzima.

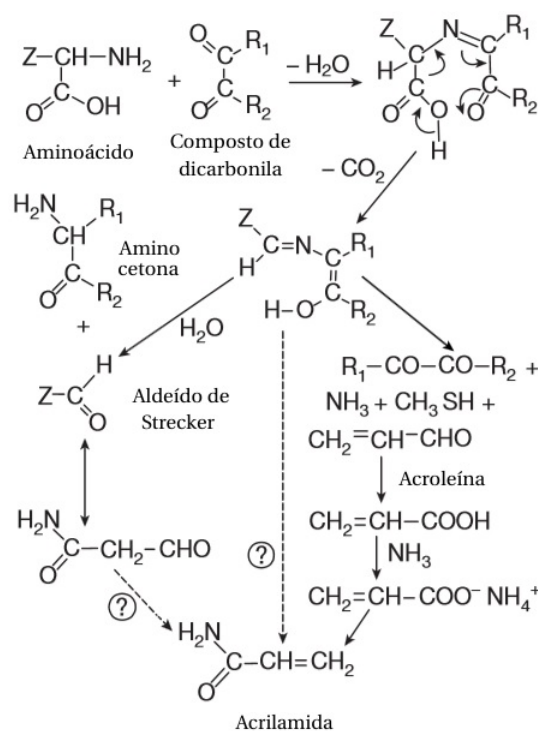
Um grande desafio durante o tratamento de neoplasias malignas está relacionado com o fato de que a dose da quimioterapia necessária para destruir as células malignas, muitas vezes têm toxicidade alta para as células normais. Este fato acarreta no aumento da procura de tratamentos mais específicos (FERNANDEZ et al., 2013).

3.3.2 Uso na indústria de alimentos

Desde 1964 sabia-se que a acrilamida apresentava potencial tóxico a seres vivos, durante anos seu potencial carcinogênico também foi investigado quando finalmente, em 1994, a International Agency for Research Cancer (IARC), associada à Organização Mundial da Saúde OMS, acrescentou a acrilamida à sua lista de agentes potencialmente carcinogênicos para humanos (IARC, 2017).

A acrilamida é formada através da reação de Maillard, na qual normalmente é descrita como uma reação de sacarídeos provedores de compostos carbonílicos e o grupo amida dos aminoácidos (Figura 4). No caso da acrilamida, os doadores de grupos carbonila são representados pela redução de sacarídeos, enquanto os grupos amina se originam de um aminoácido particular, a L-asparagina (ZYZAK et al., 2003).

Figura 4 – Caminhos propostos para a formação de acrilamida após a degradação de Strecker do aminoácido asparagina na presença de produtos dicarbonílicos da reação de Maillard.



Fonte: Adaptado de [Stadler et al. \(2002\)](#).

Ao comparar distintas maneiras de mitigação com várias efetividades, se nota que o tratamento com enzima L-asparaginase é um meio progressivo de precaver a formação de acrilamida. Devido ao fato de que a formação da acrilamida vem de dois precursores principais, a L-asparagina e os açúcares redutores. A L-asparaginase suprime um deles ao hidrolisar a L-asparagina em ácido L-aspártico. Além disso, o uso da enzima não traz impacto algum em relação as propriedades qualitativas e sensoriais dos produtos finais e por se tratar de enzima sua aplicação é relativamente simples no processamento ([CIESAROVA, 2016](#)).

A aplicação da enzima L-asparaginase na indústria alimentícia, é efetiva na redução dos teores de acrilamida, reduzindo o efeito carcinogênico dos alimentos processados a elevadas temperaturas ([FARAG et al., 2015](#)). Por apresentar diversas aplicações industriais, as enzimas expandiram de forma significativa no mercado global. Aparecendo em destaque as enzimas com aplicação no setor de alimentos e bebidas, pois ocupam o maior espaço do mercado ([DEWAN, 2014](#)).

3.4 Fungos

Avalia-se que atualmente o reino Fungi contenha, cerca de 1,5 milhão de espécies que habitam praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta. Por volta de 70.000 já

foram caracterizadas até hoje, estando dentre elas as causadoras de micoses em humanos, de doenças em plantas cultivadas e as de importância biotecnológica (OLIVEIRA, 2010). Os fungos são divididos em diversas classes de diferentes filos onde os cinco principais filos do reino fungi são o *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota* e *Chytridiomycota* (VOLK, 2013).

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, que se alimentam a partir de matéria orgânica inanimada ou através parasitose em hospedeiros vivos. Estes microrganismos participam de processos desejáveis ou adversos na vida do ser humano. Em resumo, esses microrganismos são classificados em leveduras, que se apresentam sob a forma unicelular, e em bolores (mofos), que são pluricelulares e filamentosos. Os filamentos são formados por um agrupamento de estruturas tubulares, conhecidas como hifas, que quando em conjunto, formam o micélio (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Os microrganismos do Reino Fungi possuem características distintas entre si, no entanto se nota similaridades em comum que os diferenciam dos demais reinos, apontando que os fungos em variados setores das atividades humanas apresentam notória importância. Sendo assim, a Micologia se dividiu em múltiplas especialidades com reflexos em diversas vertentes da biotecnologia, envolvendo produtos químicos e farmacêuticos, comestíveis, laticínios, bebidas alcoólicas de todos os tipos, devido, em grande parte, às propriedades fermentativas e enzimáticas (OLIVEIRA, 2014).

A fabricação de alimentos, a utilização na indústria farmacêutica, o processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, a produção de enzimas de interesse industrial e na biotransformação, são atividades que os fungos são comumente empregados. Além disso, apresentam eficiência no seu uso em práticas agrícolas e ecológicas, visto que realizam a manutenção e o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, tal como outros microrganismos patogênicos (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

3.4.1 Leveduras

Leveduras são fungos unicelulares, de aparência oval ou esférica, não filamentosas, que apresentam tamanho variável entre 1 a 5 μ e largura de 5 a 30 μ de comprimento, são imóveis, se reproduzem por brotamento ou por esporulação. Sua célula constitui-se em parede celular, membrana citoplasmática, o núcleo, os vacúolos e a mitocôndria (GUIMARAES, 2005; JR; CHAN; KRIEG, 1997; TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Para completar seu ciclo de vida é necessária a presença de água, fontes de carbono (açúcares, sais de ácidos orgânicos, glicerina ou etanol), nitrogênio, oxigênio e minerais. Possuem metabolismo anaeróbio facultativo desenvolvendo suas atividades na ausência ou presença de oxigênio, tendo preferência de ambientes com faixa de pH neutro ou pouco ácida

(GUIMARAES, 2005; JR; CHAN; KRIEG, 1997).

São facilmente encontradas no ambiente natural e tem a *Saccharomyces cerevisiae* como principal representante, pois foi considerada o microrganismo mais estudado no mundo atualmente. Com relação a utilização das leveduras para a produção de L-asparaginase a *Saccharomyces cerevisiae* produz dois tipos da enzima, uma intracelular (L-asparaginase I) e outra periplasmática (L-asparaginase II), sendo que a segunda apresenta maior viabilidade para uso em medicamentos por possuir melhor estabilidade e atividade que se aproxima do pH fisiológico (FERRARA et al., 2004).

3.4.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos apresentam alta facilidade em se desenvolverem em substratos simples e de baixo custo, e por exibirem grande aptidão em produzir inúmeros metabólitos, despertam grande interesse para uso biotecnológico. Esse tipo de fungo é comumente utilizado na produção da enzima L-asparaginase por FES, pois várias espécies se mostraram positivas, entre elas pode ser destacadas as espécies do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Cladosporium* (KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; NAKAHAMA et al., 1973; PATRO et al., 2014; SHRIVASTAVA et al., 2012).

O *Penicillium* sp. o *Fusarium* sp. e o *Monilia sithophila* utilizado na FES apresenta forma filamentosa que é constituída pelo conjunto de estruturas tubulares, denominadas de hifas. Estas hifas quando agrupadas constituem uma estrutura denominada de micélio (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Os microrganismos do gênero *Penicillium* são vistos como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pela FDA (administração americana de comidas e drogas), por isso é amplamente aplicado na indústria alimentícia e no uso para produção de medicamentos (SCHUBER et al., 2012). As espécies de *Penicillium* desde a descoberta da penicilina, são intensamente estudadas, por gerarem inúmeros metabólitos secundários com potencial farmacêutico, inclusive a produção de enzimas, como a L-asparaginase (PETIT et al., 2009).

O gênero *Fusarium*, exibe vasta diversidade em relação a atributos, morfológicos, fisiológicos e ecológicos, esse fato justifica a existência desses microrganismos na maioria dos nichos ecológicos e nas mais diversas regiões geográficas do mundo (LAZAROTTO, 2013). No trabalho realizado por CHOW e TING (2015), foi observado que dentre os microrganismos testados as espécies de *Fusarium* e *Penicillium* foram os mais eficientes para obtenção de L-asparaginase, este resultado pode ser explicado devido o reflexo da diversidade de endófitos nas quatro plantas testadas (fontes dos microrganismos utilizados pelos autores) como os estados teleomorfo e anamorfo de ascomicetes (filo dos fungos citados) tipicamente dominam as populações endófitas.

O fungo filamentoso *Monilia sitophila* que também recebe o nome de *Neuspora*

sitophilia faz parte do gênero *Neurospora*, apresenta alta capacidade e velocidade de crescimento em inúmeros tipos de resíduos sólidos, por se mostrar ideal para a obtenção de enzimas industrialmente importantes (SYED et al., 2016), podendo ser aplicado para a produção da enzima L-asparaginase.

3.5 Produção da L-asparaginase

Nesta sessão é exposta as formas de fermentação utilizadas para obtenção da enzima L-asparaginase, em que os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio de cultivo. Sendo denominados de processos em estado sólido ou fermentação em estado sólido (FES) – caracterizados pela ausência de água livre no meio – ou de processos submersos – em que há a presença de água livre no meio.

3.5.1 Fermentação submersa (FS)

A FS é um processo onde em meio líquido otimizado com nutrientes, se insere microrganismos visando o crescimento e desenvolvimento do mesmo para obtenção de bioprodutos com alto valor agregado. Tal processo possui equipamentos bem estabelecidos, reatores fechados contendo meio de fermentação e alta concentração de oxigênio e dão preferência ao uso de bactérias, pois são mais adaptadas a locais com umidade elevadas (DORIYA et al., 2016; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013).

No processo submerso, há também facilidade de aumento de escala e de modificações no regime de operação, podendo ser executado em regime descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo (POLIDORO, 2009).

Nos dias atuais a obtenção de L-asparaginase é comumente realizada por FS, devido à homogeneidade do processo e por apresentar controle das condições ambientais relativamente simples. Contudo, esse processo apresenta desvantagens como altos custos de produção, energia e custo operacional e baixos rendimentos do produto, geração de efluentes em excesso e, com isso, grandes volumes de águas residuais (CACHUMBA, 2017).

3.5.2 Fermentação em estado sólido (FES)

A FES é apresentada como processo fermentativo que acontece na ausência ou quase ausência de água, sendo essa apenas suficiente para proporcionar o crescimento microbiano e as atividades metabólicas de suas células, em um meio sólido e inerte que o desempenha o papel de suporte físico e como fonte de nutrientes necessários para a manutenção da vida do microrganismo (ALJAMMAS; FATHI; ALKHALAF, 2018).

Algumas vantagens do processo de FES são as principais motivações para utilização do processo, como o aproveitamento de materiais e resíduos agroindustriais como suporte

inerte; devido a quase ausência de água se torna um meio mais resistente a contaminação bacteriana; os custos para instalação, manutenção e de processo são inferiores ao processo de FS; alta produtividade e estabilidade do produto; o tamanho do reator para sua execução é pequeno, ocupando assim pequenos espaços e não necessita de tecnologias avançadas (ALJAMMAS; FATHI; ALKHALAF, 2018; ZHAO et al., 2018).

Os fungos filamentosos são os microrganismos mais adaptados ao processo de FES, devido ao fato de se adaptarem com maior facilidade em superfícies sólidas com menor teor de água porque as condições de cultivo são similares às encontradas no seu ambiente natural. Contudo o processo de produção industrial por FES é considerado difícil por causa de problemas de controle de fermentação, padronização de produtos e conhecimento limitado sobre a siologia e morfologia dos microrganismos (DORIYA et al., 2016).

A maior atração referente a essa tecnologia é a viabilidade sobre a utilização de substratos sólidos para a biotransformação, na presença de microrganismos específicos, para a produção de bioprodutos com alto valor agregado, como por exemplo enzimas, biosurfactantes, biopesticidas, bioplásticos, fármacos e outros (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; CERDA et al., 2019; EL-BAKRY et al., 2015; JIMENEZ-PENALVER et al., 2016). Este biotratamento pode ser empregado também na produção de alimentos visando favorecer os compostos bioativos presentes, como vitaminas e fenólicos que apresentam atividade antioxidante (STARZYNSKA-JANISZEWSKA et al., 2019).

3.6 Nova fonte nutritiva

O *Tenébrio molitor* conhecido popularmente como bicho-da-farinha pertence à ordem Coleoptera (besouros) e família Tenebrionidae (nome comum "darkling beetle"), uma família cosmopolita de besouros com mais de 20.000 espécies e como todos insetos holometabólicos atravessam quatro estágios durante a vida: ovo, larva, pupa e adulto (YANG et al., 2018).

Suas larvas são obtidas de forma simples devido a facilidade em reproduzir e alimentar. Por apresentar alto teor proteico em sua composição, são utilizadas como fonte de alimento para animais, incluindo pássaros, répteis, pequenos mamíferos, batráquios e peixes. Comumente são servidas vivas, contudo também são vendidos enlatados, secos ou em pó (MARIOD; MIRGHANI; HUSSEIN, 2017; VELDKAMP et al., 2012).

As larvas do bicho-da-farinha (Figura 5), quando comparadas a comida tradicional rica em proteína como a carne, se destaca por ser uma valiosa fonte de nutrientes em quantidades mais rentáveis para o organismo humano. Quando no estado de pó contém de 50% a 52% de proteína e aprovaram todos os regulamentos da Food and Drug Administration para uso como ingrediente alimentar (KIM; JUNG, 2013), apresentando boa qualidade para ser aplicado como suplemento de refeições tradicionais. Com isso, espera-se que as larvas de *T. molitor*

sejam usadas em vários alimentos no futuro próximo (SIEMIANOWSKA et al., 2013).

Figura 5 – Larvas desidratadas do *Tenébrio molitor*



Fonte: Autor, (2018).

Normalmente as larvas medem em média 2,5 cm, já na fase adulta estão chegam a 1,25 e 1,80 cm de comprimento (BRYNING; CHAMBERS; WAKEFIELD, 2005). Dias após a eclosão dos ovos as larvas ganham aspecto amarelado e produzem um exoesqueleto duro e quitinoso. Uma larva adulta pesa cerca de 0,2 gramas e tem de 25 a 35 mm de comprimento, sendo elas que servem de uso como alimento humano em algumas partes do mundo. A pupa é o estágio intermediário entre a fase de larva e a forma adulta, apresentando de 12 a 18 mm de comprimento e de cor branca cremosa. Na fase adulta o besouro começa a colocar ovos 4-17 dias após a cópula (AGUILAR-MIRANDA et al., 2002).

No trabalho realizado por Zhao et al. (2016), os autores avaliaram e caracterizaram o extrato proteico das larvas e relataram que as larvas secas liofilizadas continham cerca de 33% de gordura, 51% de proteína bruta e 43% de proteína verdadeira com base na matéria seca. O verdadeiro teor de proteína do extrato de proteína foi de cerca de 75%, com uma taxa de extração de 70% sob condições otimizadas de extração. Os autores relataram que o extrato de proteína era uma boa fonte de aminoácidos essenciais.

Por conterem alta concentração de proteína as larvas do *T. molitor* apresenta diversas aplicações de uso em diferentes áreas, como uma boa fonte de agente espumante à base de proteínas, que pode ser aplicado na fabricação de concreto leve (FALLIANO et al., 2018); suas proteínas também podem ser convertidas em poliureia (PANINI et al., 2017) e tem grande

potencial para uso como biomassa, servindo como fonte de nutrientes para microrganismos em processos fermentativos.

3.7 Suportes inertes

O uso de materiais inertes são de suma importância para o processo de FES, pois eles permitem o confinamento físico das células em uma região definida de espaço, onde o material celular realiza suas atividades catalíticas nos processos de operação, sendo isso o processo de Imobilização Celular (IC). A maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação (FREEMAN; LILLY, 1998). Além de suporte físico esses materiais podem servir como fonte nutritiva para o microrganismo.

3.7.1 Fibra cerâmica

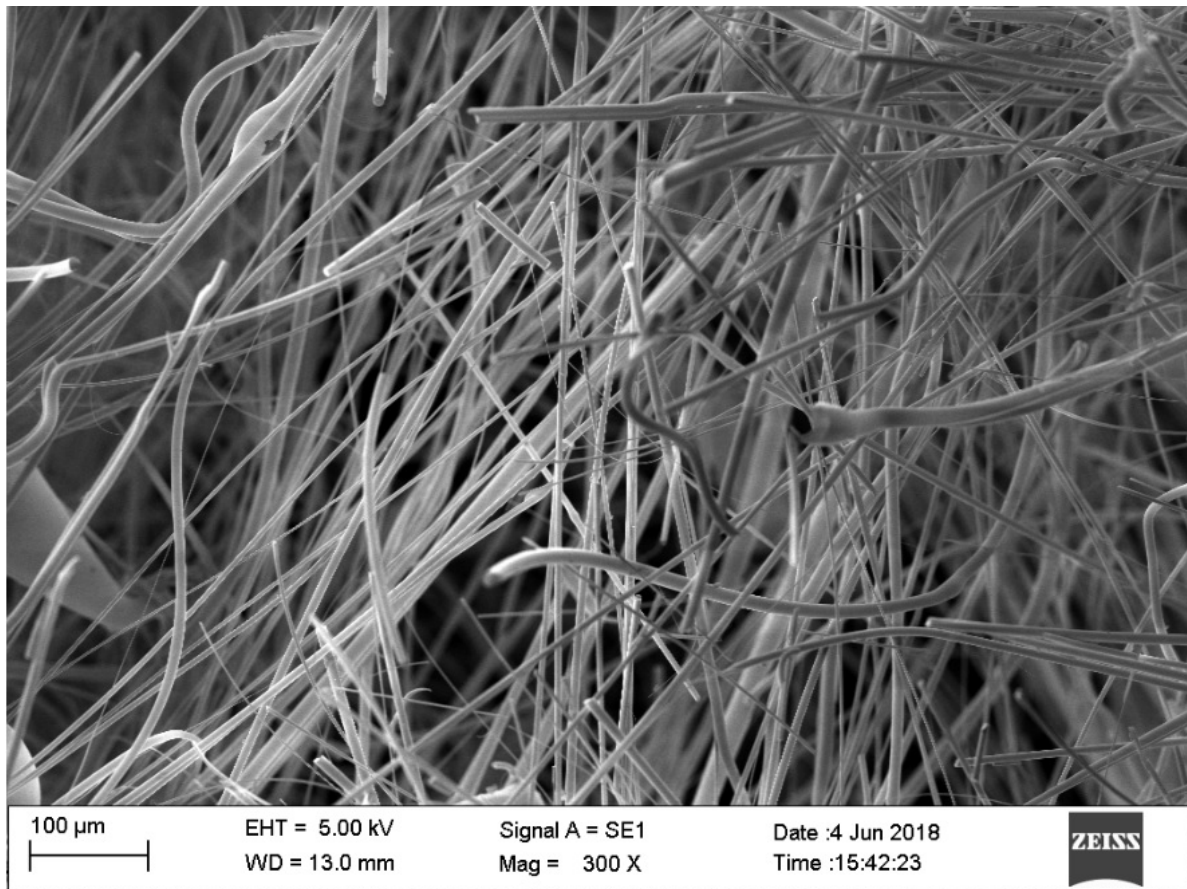
Fibras cerâmicas apresentam aplicação como materiais de reforço devido às suas propriedades únicas de alto módulo elástico e durabilidade quando exposta a elevadas temperaturas. Suas propriedades fazem delas valiosas para uso em aplicações estruturais automotivas, aeroespaciais e resistentes ao calor (YALAMAC; SUTCU; BAHARBASTURK, 2017).

Uma aplicação importante das fibras cerâmicas é o uso como material isolante resistente a altas temperaturas sob a forma de mantas para prevenção de fogo, além de componentes resistentes ao calor conta com atributos de baixa condutividade térmica, resistência a choques térmicos e resistência elétrica em altas temperaturas (SEDAGHAT; TAHERI-NASSAJ; NAGHIZADEH, 2006).

Por possuir estrutura extremamente densa e compacta, a fibra cerâmica se apresenta como eficiente material para a realização de "matrizes vivas", sendo capazes de confinar microrganismos e reuni-los em maiores quantidades nos poços de matrizes de alto rendimento. Esse passo se tornou fundamental para o início de novas aplicações que são promissoras no campo da microbiologia industrial e enzimologia, bem como microbiologia alimentar, que demandam de réplicas em grande escala (BRAGAZZI et al., 2015).

A Figura 5 mostra uma imagem de microscopia eletrônica de varredura da fibra cerâmica.

Figura 6 – Fibra cerâmica utilizada na FES como suporte inerte



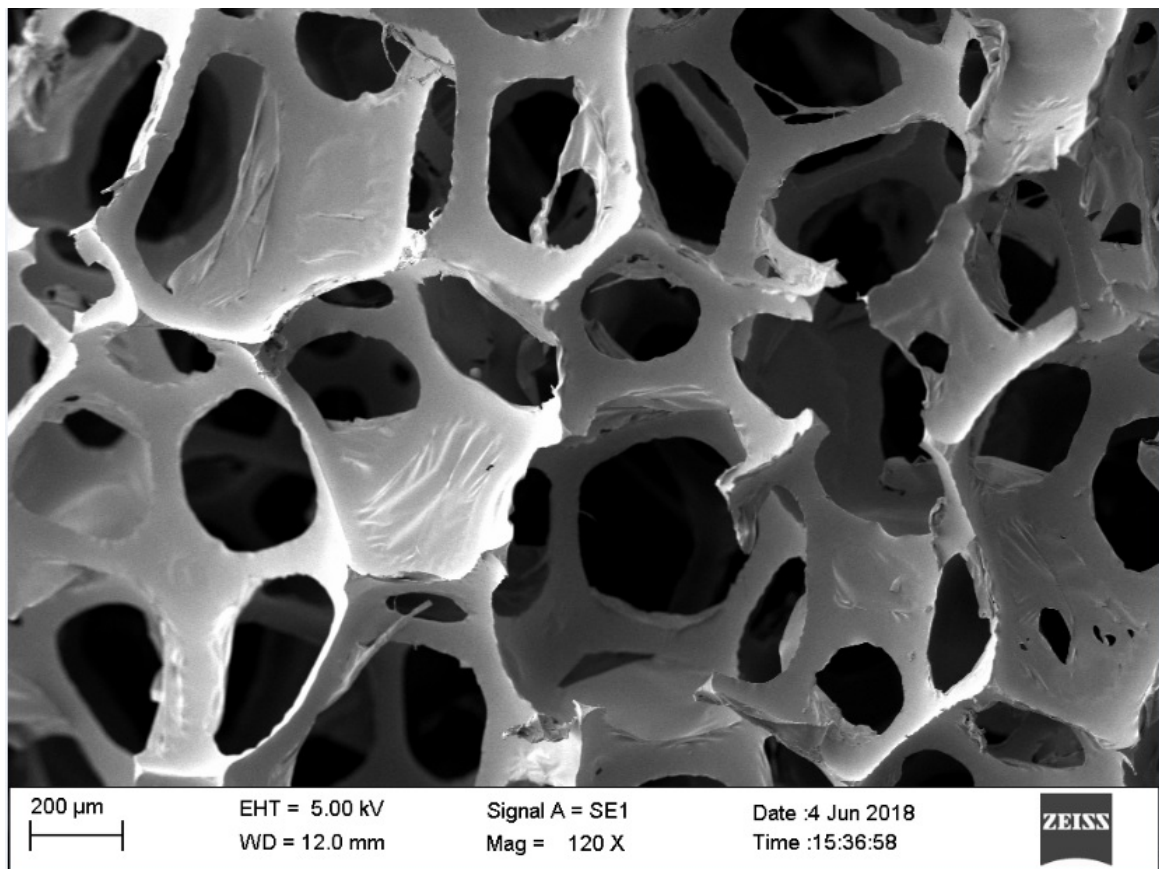
Nota: Fonte: Autor, (2018).

3.7.2 Espuma de poliuretana

As espumas de poliuretana são polímeros versáteis devido à variedade dos grupos constitutivos e da possibilidade de polimerização controlada, o que permite a adaptação do processo e da composição para a obtenção de materiais para as mais variadas exigências (ZECK, 2004).

A viabilidade do uso da espuma de poliuretana como suporte inerte ocorre devido sua estrutura porosa e bem definida, que consegue proporcionar a infiltração e o egresso de líquidos e gases de forma mais fácil (Figura 6). Além do que, apresenta características físicas eficientes junto ao processo de fermentação como maciez, resistência mecânica e resiliência, favorecendo o crescimento microbiano, pois consegue favorecer devido sua estrutura uma boa transferência de massa e calor (CORCUERA et al., 2010).

Figura 7 – Espuma de poliuretana utilizada na FES como suporte inerte



Fonte: Autor, (2018).

3.7.3 Lã de vidro

As fibras de vidro possuem em valores entre 5 e 20 microns de diâmetro e suas superfícies não são livres de falhas. Apresentam boa estabilidade dimensional, não sofrem fluência, são consideradas inertes e também apresentam imunidade a ataques biológicos e tem boa resistência aos ataques químicos, não são inflamáveis e têm boas propriedades elétricas. Devido as suas boas propriedades mecânicas e as vantagens acima citadas as fibras de vidro são bastante difundidas, porém uma de suas desvantagens são as irritações que causam ao entrar em contato com a pele humana (DE; WHITE, 1996).

Por poder apresentar a desvantagem de causar coceira e incômodo ao entrar em contato com a pele humana, o mercado oferece esse material em forma de manta do tipo manta ensacada com polietileno, manta aluminizada, manta revestida com feltro para construções metálicas e manta de fibro-cerâmica para tubulações e equipamentos com temperaturas elevadas (DE; WHITE, 1996).

3.8 Biorreatores

Os biorreatores são equipamentos frequentemente utilizados nas Engenharias Química e Bioquímica por serem capazes de converter matérias-primas em produtos a partir do uso de microrganismos, células animais ou vegetais ou enzimas. São construídos para as mais diversas necessidades de produção, visando proporcionar condições ótimas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio, possibilitando o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos para obtenção dos produtos de interesse (ALVES, 2010).

Com o avanço da tecnologia os biorreatores são projetados com a capacidade de monitorar em tempo real e controlar de forma automatizada as condições ambientais, como controle de dióxido de carbono dissolvido e oxigênio, temperatura e pH por CO_2 ou adição de ácido ou base. Possui também técnicas referentes ao manuseio do sistema fechado e filtração de gás para reduzir os riscos de contaminação cruzada e microbiana (MISHRA et al., 2016).

Os biorreatores podem ser divididos em dois grandes grupos: os biorreatores de fase aquosa contínua, utilizados em processos submersos, e os biorreatores de fase não-aquosa, próprios para cultivo em estado sólido. Os biorreatores para processos em estado sólido são discutidos em detalhes no item seguinte.

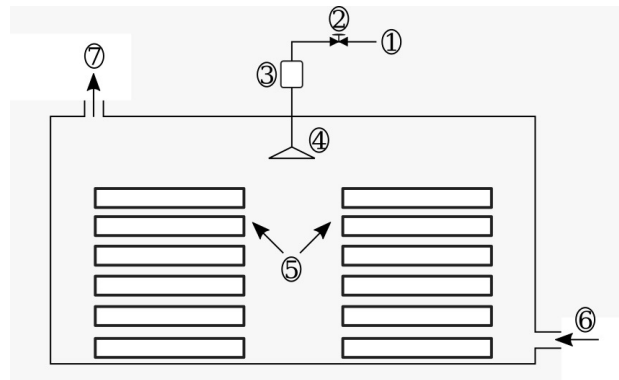
3.8.1 Biorreatores utilizados na fermentação em estado sólido

A agitação e a aeração são os principais fatores avaliados para o desenvolvimento dos biorreatores para fermentação em estado sólido, onde a agitação tem como objetivo homogeneizar todo conteúdo do biorreator, causando efeito positivo na transferência de massa e calor. A aeração contribui no acesso facilitado de oxigênio ao microrganismo, como também tem aplicação como método de controle de temperatura e umidade do meio de cultivo (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

Os principais tipos de biorreatores para processos fermentativos em estado sólido, são classificados em quatro grupos, diferenciando entre si a partir das técnicas de funcionamento em relação ao modo de agitação e aeração.

O primeiro grupo são os biorreatores com aeração superficial e sem agitação, no qual é composto por bandejas, que são dispostas em diversas formas e confeccionadas por diferentes materiais. Podem ser dispostos em locais climatizados e/ou ventilados, estufas de bancada ou bandejas individuais. Os principais tipos de biorreatores desse grupo são: a câmara climatizada; estufa; bandeja individual e saco plástico (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006). A Figura 8 mostra um exemplo do primeiro grupo de biorreatores, o biorreator leito estático do tipo bandeja.

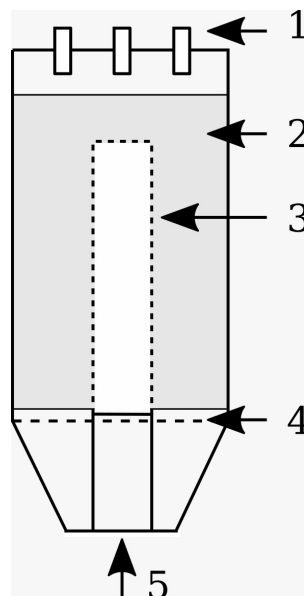
Figura 8 – Biorreatores com aeração superficial sem agitação



Nota: 1- Entrada de água, 2- Válvula de controle de entrada de água, 3- Lâmpada UV, 4- Umidificador de ar, 5- Bandejas de FES, 6- Entrada de ar e 7- Saída de ar. Fonte: Adaptado de Mitchell, Krieger e Berovic (2006).

Os biorreatores com aeração forçada e sem agitação compõe o segundo grupo, que compreende os reatores de leito empacotado, onde o meio de cultivo se mantém estático. A Figura 9 ilustra um exemplo desse tipo de biorreator, que mostra o leito empacotado com tubo central perfurado ao longo do eixo central, visando fornecer trajetórias preferenciais do ar no eixo central do meio de cultivo (ROBINSON; NIGAM, 2003).

Figura 9 – Biorreatores com aeração forçada e sem agitação

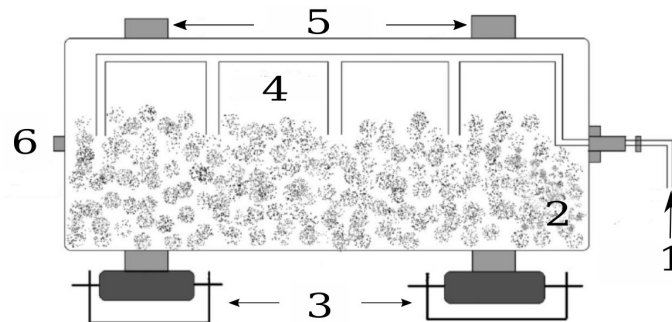


Nota: 1- Saída de ar, 2- Suporte sólido da FES, 3- Tubo central furado, 4- Suporte de sustentação furado para o meio sólido e 5- Entrada de ar. Fonte: Adaptado de ROBINSON e NIGAM (2003).

O terceiro grupo são os biorreatores com aeração superficial e com agitação, onde os biorreatores de tambor rotativo são os principais representantes (Figura 10), onde a rotação

do casco do biorreator expõe o meio de cultivo ao fluxo gasoso, responsável pela remoção do calor e dos gases gerados pelo metabolismo microbiano (ROBINSON; NIGAM, 2003).

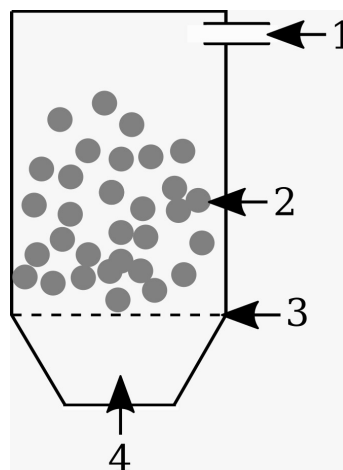
Figura 10 – Biorreatores com aeração superficial e com agitação



Nota: 1- Entrada de ar, 2- Suporte sólido para FES, 3- Rolos, 4- Bicos de ar, 5- Aros laterais e 6- Eixo de rotação do biorreator. Fonte: Adaptado de ROBINSON e NIGAM (2003).

Por último os biorreatores com aeração forçada e com agitação, que viabiliza o controle de uma maior gama de parâmetros, como: temperatura, teor de umidade e fluxo do ar injetado, intensidade de mistura (rpm), facilidade de adição de água e outros aditivos do processo. Este tipo de biorreator normalmente pode ser operado em dois modos: os misturados continuamente e os misturados intermitentemente. Como por exemplo, neste biorreator o ar é injetado numa velocidade suficiente para manter em suspensão as partículas de substrato Figura (11). Por ter grande vazão de ar, a remoção de calor do leito não é problemática, mas o uso de leitos fluidizados implica em altos custos de operação (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

Figura 11 – Biorreatores com aeração forçada e com agitação



Nota: 1- Saída de ar, 2- Suporte sólido para FES, 3- Suporte de sustentação furado para o suporte sólido e 4- Entrada de ar. Fonte: Adaptado de Mitchell, Krieger e Berovic (2006).

Os biorreatores utilizados nos processos fermentativos em estado sólido não atingiram o mesmo nível de desenvolvimento observado nos biorreatores utilizados no processo fermentativo em estado líquido. Isso se observa, pois é maior a dificuldade de manutenção da uniformidade do substrato e o controle da temperatura no reator, visto que na maioria dos casos o substrato sólido não é um bom condutor de calor (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

4 Material e Métodos

No presente trabalho todos os ensaios experimentais foram realizados em triplicata, sendo que a média foi utilizada como valor representativo e os erros ilustrados nos gráficos referem-se aos desvios-padrões.

O fluxograma indicado na Figura 12 exhibe como foi realizada as etapas de execução do trabalho. Para a seleção do microrganismo, foram testadas cinco leveduras e três fungos filamentosos, visando encontrar nos ensaios o fungo mais adequado para a produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido (FES), com as condições impostas referente a suporte inerte, meio nutritivo, pH e tempo de fermentação. Em relação ao suporte sólido inerte, foram avaliadas três matrizes sólidas distintas, sendo escolhida aquela que o fungo tenha apresentado mais afinidade para seu crescimento e desenvolvimento proporcionando maiores produções de L-asparaginase. Para a avaliação do meio nutritivo, foram testadas duas fontes, a glicose contando com a adição de L-asparagina e o *Tenébriomolitor* com a adição de glicerol, com intuito de verificar se são eficientes como fonte nutritiva para os microrganismos.

Figura 12 – Fluxograma referente ao material e os métodos utilizados



Fonte: Autor, (2018).

4.1 Microrganismos testados para a produção de L-asparaginase

Os microrganismos produtores de L-asparaginase testados foram cinco leveduras e três fungos filamentosos, indicados na Tabela 2. As culturas foram armazenadas em placa de Petri de vidro devidamente esterilizada, com meio nutritivo de Czapek sólido, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO₃, 2,0; K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄, 0,5; KCl, 0,5; FeSO₄, 0,01; Sacarose, 30,0; Agar, 20,0.

Tabela 2 – Microrganismos testados

Microrganismos	Código
<i>Pichia guilliermondii</i>	L21
<i>Candida sake</i>	L52
<i>Candida globosa</i>	L75
<i>Cryptococcus victori</i>	L92
<i>Leucosporidium scotti</i>	L120
<i>Penicillium</i> sp.LAMAI-505	P
<i>Fusarium</i> sp.	F
<i>Monilia sitophila</i>	M

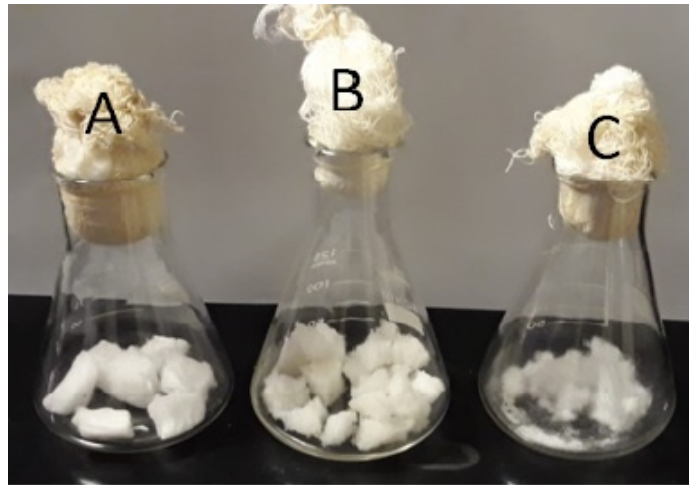
Fonte: Autor, (2018)

Para a utilização das células dos microrganismos testados após período de cultivo (todo material celular contido na placa de Petri), foi realizada a preparação do pré-inóculo para a FES, onde ocorreu a transferência celular para reatores cônicos com capacidade de 250 mL com uma solução de 100 mL de Czapek, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO₃, 2,0; K₂HPO₄, 1,0; MgSO₄, 0,5; KCl, 0,5; FeSO₄, 0,01; Sacarose, 30,0, previamente autoclavados a 121°C durante 20 minutos. O cultivo em meio líquido foi realizado em mesa agitadora a 150 rpm em temperatura ambiente (25°C) e o tempo de fermentação foi de 48 horas, garantindo o crescimento e o aumento da concentração celular. Após preparação do pré-inóculo, o fermentado foi centrifugado e as células recolocadas em suspensão em 100 mL de água destilada estéril, as quais foram então, utilizadas nas FES. O sobrenadante foi descartado nesta etapa.

4.2 Suportes sólidos utilizados inicialmente na FES

Inicialmente foram utilizados três suportes sólidos na FES para a produção de L-asparaginase: fibra cerâmica, espuma de poliuretana e a lã de vidro. A Figura 13 mostra a imagem dos biorreatores estáticos com capacidade de 125 mL, contendo os suportes sólidos utilizados nas FES.

Figura 13 – Suportes sólidos inertes



Nota: A - Biorreator com suporte sólido inerte de fibra cerâmica; B - Biorreator com suporte sólido inerte de espuma de poliuretana; C - Biorreator com suporte sólido inerte de lã de vidro. Fonte: Autor, (2018).

Os primeiros processos fermentativos foram realizados em biorreatores estáticos isotérmicos com o mesmo volume de sólido, para que a transferência de massa e calor nos suportes sólido fossem iguais ou relativamente próximas. Foi utilizado dois meios líquidos distintos como solução nutritiva. O primeiro a ser utilizado foi o meio Czapek modificado com e sem adição de L-asparagina e glicose, contendo a concentração de nutrientes em g/L de, NaNO_3 , 2,0; K_2HPO_4 , 1,0; MgSO_4 , 0,5; KCl , 0,5; FeSO_4 , 0,01; glicose, 10,0; L-asparagina, 1,0. Já o segundo meio de cultivo foi composto por uma solução nutritiva com os valores de sais iguais aos descritos para o primeiro meio, porém contando com acréscimo de glicerol e a substituição da glicose por uma solução de *Tenébrio molitor*, variando a concentração do mesmo em diferentes ensaios.

Após realizado os testes nos reatores estáticos, a condição que se destacou em relação as demais com relação a escolha do microrganismo, do suporte inerte, do meio nutritivo, condições de pH e tempo de fermentação, foi aplicada em um novo biorreator rotativo, visando aumentar a eficiência na produção de L-asparaginase, visto que melhora a aeração e a agitação do meio em relação aos reatores estáticos.

4.3 Preparação do meio nutritivo por hidrólise

Para a obtenção da solução de *Tenébrio molitor* foi realizada a moagem das larvas secas através do uso de um pistilo (Figura 14), esse procedimento foi realizado visando aumentar a eficiência do processo de hidrólise, deixando o material com maior superfície de contato e facilitando a quebra e inserção dos nutrientes contidos nas larvas para a solução ao fim do processo.

Figura 14 – Moagem das larvas de *Tenébrio molitor*

Fonte: Autor,(2018).

O meio nutritivo apresentava concentrações em g de massa de *Tenébrio molitor* a cada 100 mL de água, sendo assim foi realizado os cálculos prévios de cada ensaio para deixar na concentração requerida o meio nutritivo. O processo de hidrólise foi conduzido utilizando 1% (v / v) de H₂SO₄ a 120°C durante 30 minutos, realizando procedimento semelhante ao aplicado por [Zhao et al. \(2018\)](#), que hidrolisou palha de arroz para obtenção de meio nutritivo.

Após a conclusão do processo de hidrólise foi realizada a filtração da solução com a utilização de uma bomba de sucção, um Kitasato contendo um Funil de Büchner na presença de um papel filtro com poros de 25 µm, obtendo assim o meio nutritivo a ser utilizado na FES.

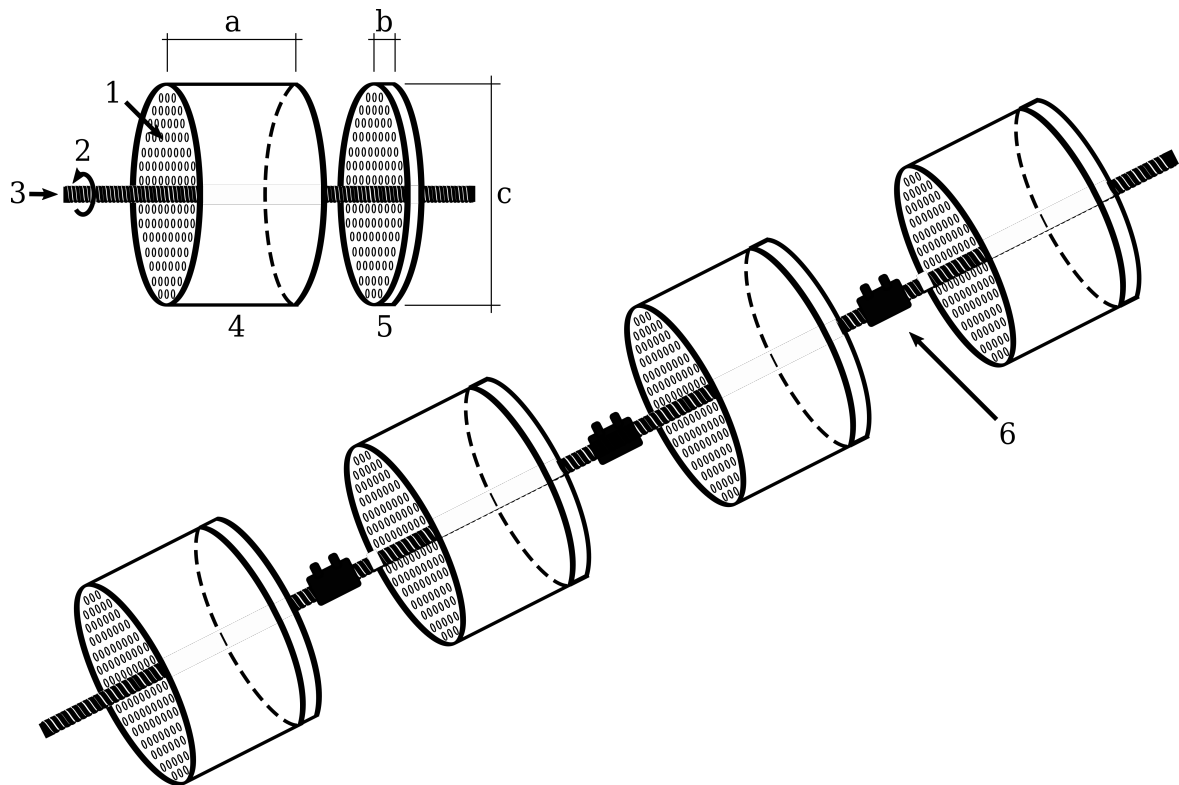
4.4 Fermentação em estado sólido com suporte inerte (FES-SI)

Nas FES-SI foram utilizados diferentes configurações de reatores biológicos isotérmicos na produção de L-asparaginase, correspondendo à fermentação estática (biorreator de bancada) e fermentação com uso de biorreator mantido sob rotação a 5 rpm (biorreator rotativo). O processo fermentativo no reator estático foi utilizado para realização de estudos comparativos das FES em fibra cerâmica, poliuretana e lã de vidro. Além disso, a fermentação estática foi utilizada na otimização do meio nutritivo e das condições operacionais (pH, temperatura, concentração de L-asparagina, concentração de glicose, concentração de *Tenébrio molitor*, glicerol e tempo) com células imobilizadas em FES-SI. Já na FES realizada com biorreator rotativo, apenas a condição otimizada pelo processo anterior foi utilizada.

A Figura 15 mostra as especificações do biorreator de plástico utilizado para a realização da FES-SI da condição otimizada pelo biorreator estático de bancada. Para sua utilização o biorreator rotativo foi submetido a uma rotação contínua de 5 rpm, durante um período de 24, 48, 72 e 96 horas, visando encontrar a melhor condição de atividade de L-asparaginase.

Para facilitar a aplicação do processo fermentativo, e retirada dos pontos a serem analisados, o biorreator foi projetado com a capacidade de ser interligado em série com a possibilidade de remoção ou inserção de pontos, pois a peça descrita com o número 6 na Figura 15 serve para unir os reatores em um único eixo e também tornar possível a desconexão de uma unidade.

Figura 15 – Características e dimensões do biorreator rotativo aplicado em FES-SI

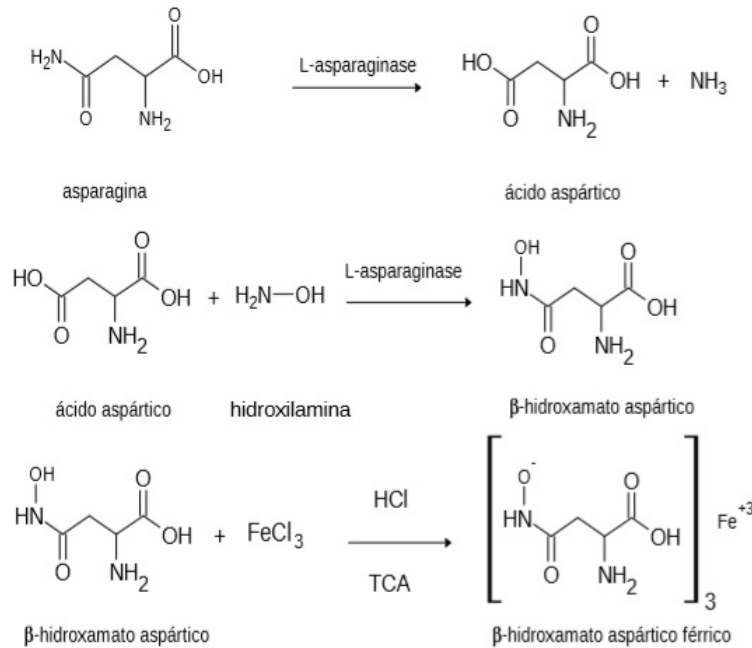


Nota: a - 5 centímetros; b - 0,1 centímetros; c - 6 centímetros; 1 - orifícios capilares para aeração; 2 - rotação de 5 rpm; 3 - eixo sem fim; 4 - corpo do biorreator onde ocorre a FES; 5 - tampa contendo orifícios capilares e 6 - peça de junção para acoplamento dos biorreatores em série.

4.5 Análise da L-asparaginase

A L-asparaginase foi avaliada em ensaios de atividade enzimática utilizando hidroxilamina conforme descrito por [DRAINAS, KINGHORN e PATEMAN \(1997\)](#). A Figura 16 apresenta as reações que ocorrem durante o processo de quantificação da atividade enzimática da L-asparaginase., onde o aminoácido L-asparagina na presença da enzima L-asparaginase é convertida em ácido aspártico e amônia, o ácido aspártico na presença de hidroxilamina é convertido em β -hidroxamato aspártico, que na presença de cloreto férrico em meio contendo ácido tricloroacético e ácido clorídrico é convertido em β -hidroxamato aspártico férrico, sendo essa molécula identificada pela leitura no espectrofotômetro.

Figura 16 – Reações para a quantificação de L-asparaginase



Fonte: Adaptado de [Elshafei et al. \(2012\)](#).

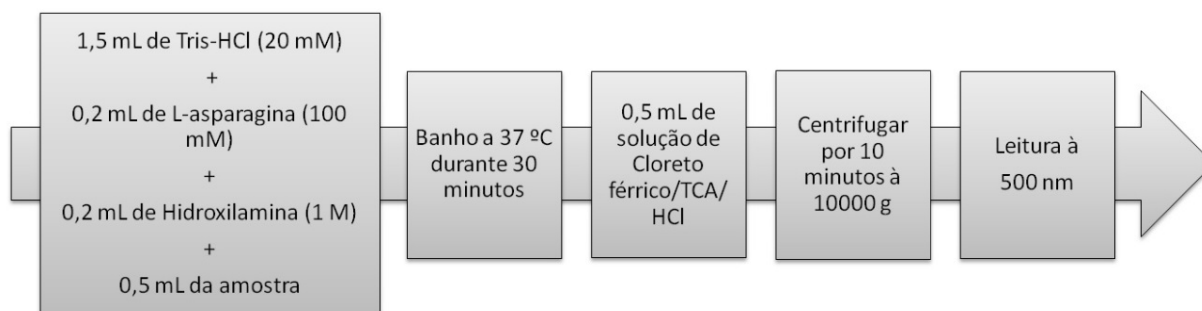
Nestes ensaios, 0,5 mL de amostra de enzima foi misturada em 1,5 mL de tampão Tris-HCl (pH 8,6, 20 mM), 0,2 mL de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL de hidroxilamina (1 M), foi incubada por 30 minutos a uma temperatura de 37 °C. A reação foi terminada com adição de 0,5 mL da solução de cloreto férrico (10%) em meio contendo ácido tricloroacético (5%) e ácido clorídrico (0,66 M). O meio foi centrifugado por 10 minutos (10000 g, Avanti J-26XP Series) e em seguida o teor de ácido β -hidroxilâmico foi obtido por espectrofotometria (500 nm, espectrofotômetro UV-MINI-1240). A unidade enzimática foi denida como 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ de ácido β -hidroxilâmico produzido e a atividade calculada como mostra na Equação 4.1 ([DIVINO, 2015](#); [DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1997](#)).

$$\lambda \left(\frac{U}{kg} \right) = 1000 \times \left(\frac{\delta \times Vol_{Ext} \times F_{Diluição}}{Vol_{Amostra} \times 0,4 \times \theta \times m_{Sólido}} \right) \quad (4.1)$$

Sendo que λ representa a atividade em U/kg, δ é a leitura de absorbância a 500 nm, Vol_{Ext} é o volume de extração, solução tween 80 (1 %), $F_{Diluição}$ é o fator de diluição das amostra que foram analisadas, $Vol_{Amostra}$ é o volume da amostra inserida na reação de análise de L-asparaginase, θ representa o tempo de incubação e o $m_{Sólido}$ é a massa de suporte sólido utilizada na FES.

A Figura 17 representa o diagrama simplificado das etapas adotadas no procedimento de análise enzimática da L-asparaginase.

Figura 17 – Procedimento de análise da L-asparaginase



Fonte: Adaptado de PINHEIRO (2017).

4.6 Planejamento experimental

Para o desenvolvimento do experimento foi realizado um planejamento composto central rotacional, do tipo 2^k , com três variáveis ($k=3$) e um alfa de 1,68 calculado pela fórmula $\alpha = [2^k]^{1/4}$ e três réplicas centrais, a Tabela 4.6 mostra os níveis e valores reais do planejamento experimental composto central rotacional. Nesse ensaio a aplicação do glicerol foi realizada de forma direta sobre o suporte sólido inerte.

Tabela 3 – Planejamento experimental

Variáveis	$(-)\alpha$	-1	0	+1	$(+)\alpha$
pH	1,98	3,00	4,50	6,00	7,02
Glicerol (g)	1,64	3,00	5,00	7,00	8,36
<i>T. molitor</i> (g/100 mL)	3,91	8,00	14,00	20,00	24,09

Fonte: Autor, (2018)

Na execução do planejamento foram realizados um total de 17 experimentos, com três pontos centrais. A análise da variável resposta, atividade L-asparaginase (U/kg), foi realizada utilizando-se o software R e os resultados foram expressos empregando gráficos de contorno e superfície de resposta e tabela de análise de variância (ANOVA). Após análise estatística, o modelo matemático proposto foi validado, porém optou-se por desenvolver o restante do trabalho utilizando as melhores condições dos ensaios, ou seja, após a realização do ensaio foi selecionada a condição que gerou os melhores resultados para dar continuidade nos testes, visando atingir sua otimização.

Para realização desse método de escolha de melhores condições foi testada duas formas distintas da aplicação da variável glicerol, onde em primeiro momento foi aplicado de

forma direta sobre o suporte sólido inerte. Foi realizada as combinações entre a quantidade de glicerol e as concentrações de *T. molitor*, conforme Tabela 8.

Tabela 4 – Combinações entre glicerol na superfície do suporte inerte e *Tenébrio molitor*

Ensaio	Glicerol (g)	<i>T.molitor</i> (g/100mL)
1	5	5
2	5	10
3	5	15
4	7,5	5
5	7,5	10
6	7,5	15
7	10	5
8	10	10
9	10	15

Fonte: Autor, (2018)

A outra forma para aplicação de glicerol foi seu uso na solução nutritiva, onde agora sua unidade de medida será em g/L, reduzindo o consumo de glicerol em relação ao procedimento anterior. A Tabela 9 traz os 12 ensaios de variações entre glicerol e a biomassa, sendo um intervalo de 5 a 20 g/L para a primeira variável e de 5 a 15 g/100 mL de concentração para a segunda variável.

Tabela 5 – Combinações entre glicerol na solução nutritiva e *Tenébrio molitor*

Ensaio	Glicerol (g/L)	<i>T.molitor</i> (g/100mL)
1	5	5
2	10	5
3	15	5
4	20	5
5	5	10
6	10	10
7	15	10
8	20	10
9	5	15
10	10	15
11	15	15
12	20	15

Fonte: Autor, (2018)

As combinações e os métodos de aplicação dos meios nutritivos foram realizados buscando encontrar uma condição ótima de atividade da L-asparaginase e assim avaliar as variáveis pH e tempo, visando aumentar ainda mais a eficiência de produção da enzima.

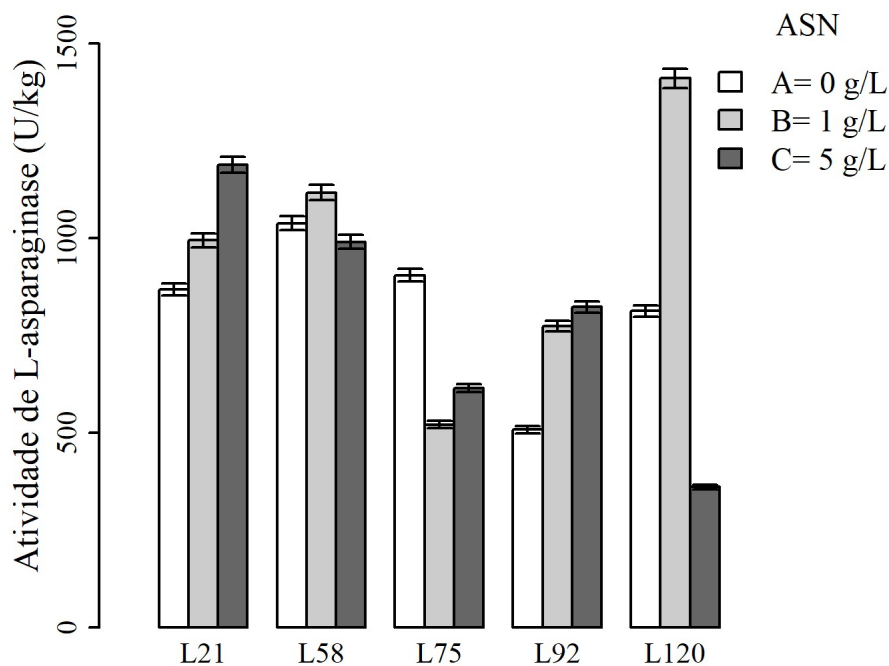
As condições estabelecidas definidas como as condições otimizadas para produção de L-asparaginase extracelular por FES foram utilizadas para experimentos posteriores, os quais avaliaram a produção da enzima em um sistema de FES-SI em biorreator rotativo (Figura 15).

5 Resultados e discussões

5.1 Seleção de microrganismos e meio sólido inerte

A Figura 18 mostra o resultado de produção de L-asparaginase (U/kg) obtido no ensaio realizado para comparação entre as leveduras, com o uso da espuma de poliuretana como suporte sólido. Nota-se que a L21 (*Pichia guilliermondii*) e a L120 (*Leucosporidium scottii*) se destacaram em relação as demais, a primeira levedura conseguiu produzir L-asparaginase com atividade de 1175,8 U/kg de suporte sólido (situação C), e a segunda, atingiu a produção de 1395,8 U/kg de suporte sólido (situação B).

Figura 18 – Teste com Leveduras com uso da espuma de poliuretana como suporte sólido



Nota: ANS - Concentração de L-asparagina adicionada (g/L); condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h); L21 - *Pichia guilliermondii*, L58 - *Candida sake*, L75 - *Candida globosa*, L92 - *Cryptococcus victoriae* e L120 - *Leucosporidium scottii*.

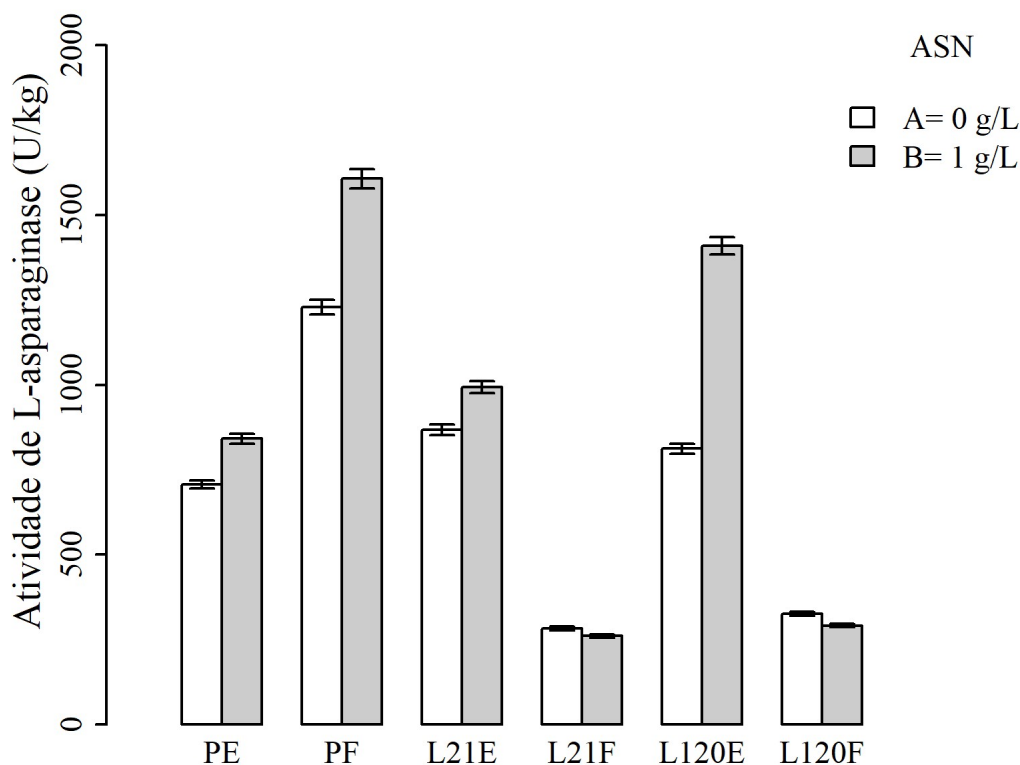
No cenário atual as leveduras aparecem como boas candidatas à produção de L-asparaginase, contudo poucos estudos foram realizados de forma mais acentuada sobre as enzimas de leveduras (VERMA et al., 2007).

Dentre os trabalhos que utilizaram leveduras para a produção de L-asparaginase, IMADA et al. (1973) desenvolveram uma extensa triagem de bactérias, fungos e leveduras visando estipular quais microrganismos conseguiriam produzir quantidades consideráveis de

L-asparaginase. Das 1326 leveduras testadas, por volta de 160 produziram a enzima de forma extracelular. As espécies das leveduras que se destacaram foram: *Candida utilis*, *Hansenula jadinii*, *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus albidus* e *Sporobolomyces roseus*.

Pelos resultados encontrados no presente ensaio comparativo entre as leveduras, a L21 e a L120, foram escolhidas para realização do próximo teste, onde visou-se comparar o uso de dois tipos de suporte sólido inerte, a espuma de poliuretana e a fibra cerâmica e também a comparação com o fungo filamentoso *Penicillium* sp. LAMAI-505. A Figura 19 mostra além dessa comparação, a influência da adição de L-asparagina no processo fermentativo, com concentração de 1 g/L, buscando investigar se a presença desse aminoácido contribui como fonte nutritiva para a produção de L-asparaginase.

Figura 19 – Teste comparativo entre Leveduras e o *Penicillium* sp. LAMAI-505 com uso de diferentes suportes sólidos

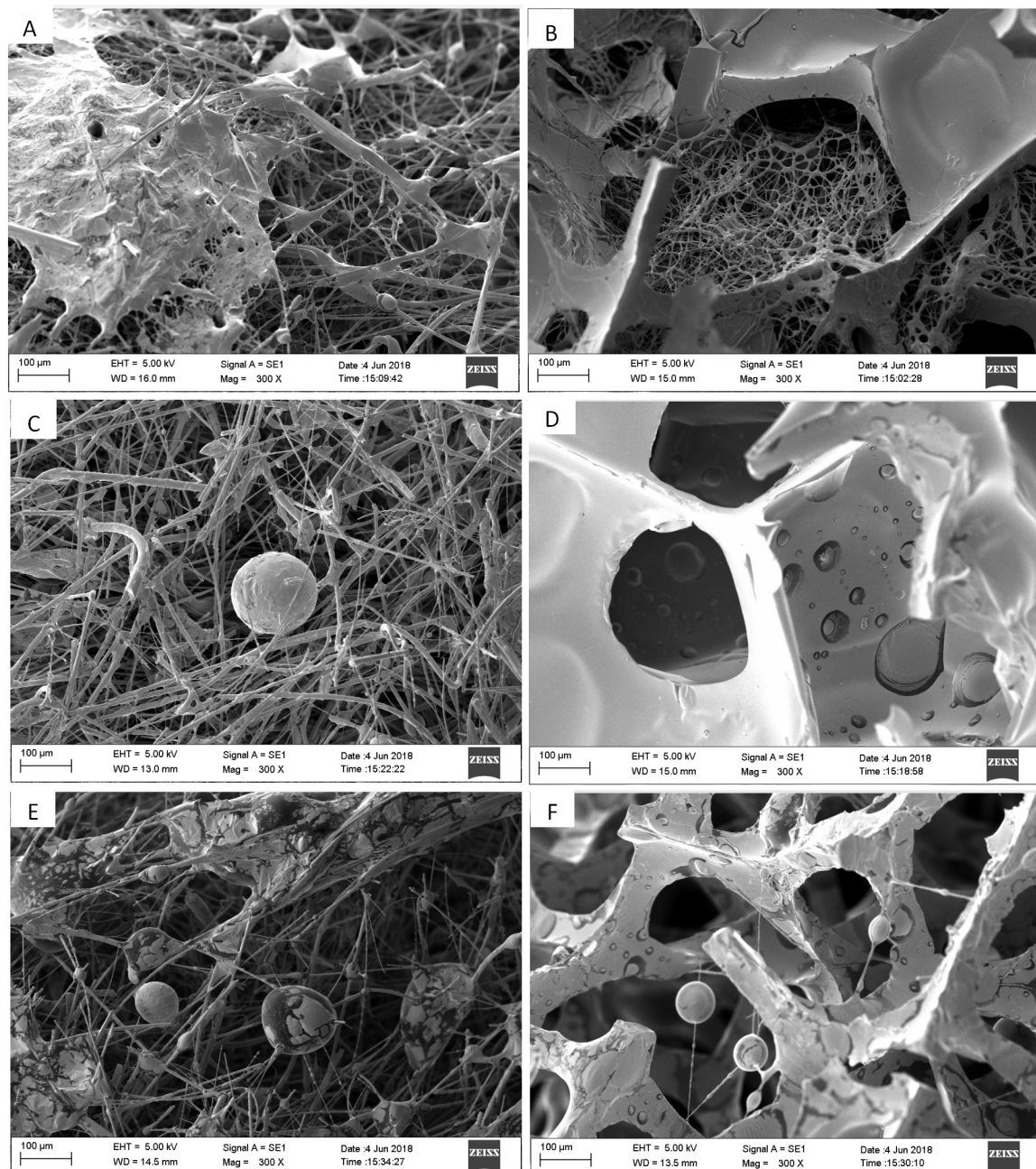


Nota: ANS - Concentração de L-asparagina adicionada (g/L); condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h); L21 - *Pichia guilliermondii*, L120 - *Leucosporidium scotti* e P - *Penicillium* sp. LAMAI-505; E - Espuma de poliuretana, F - Fibra cerâmica.

Ao comparar os resultados apresentados na Figura 19, observa-se que as leveduras foram superiores quando o processo fermentativo teve a espuma de poliuretana como suporte sólido, isso pode ter ocorrido pois a espuma de poliuretana apresenta maior porosidade sendo menos eficiente que a fibra cerâmica para o fungo. Visto que, a fibra apresenta composição mais densa, tornando um ambiente em que o fungo consegue se adaptar melhor, devido

ao fato de assemelhar ao ambiente no qual o fungo é encontrado na natureza. Já com a fibra cerâmica como suporte inerte o *Penicillium* sp. LAMAI-505 foi mais responsivo que as leveduras onde superou a produção da enzima em 12,30% em relação a maior atividade obtida pelas leveduras, atingindo atividade de 1591,7 U/kg de suporte sólido. A Figura 20 representa as microscopias eletrônicas de varredura da fibra cerâmica e da espuma de poliuretana, contendo os microrganismos testados.

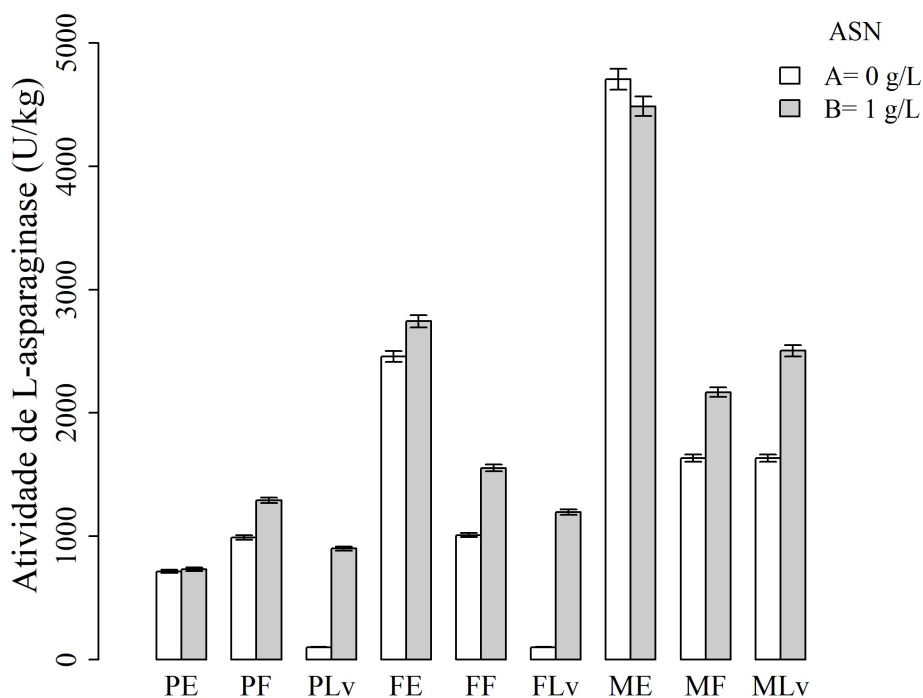
Figura 20 – Microscopias eletrônicas



Nota: A - *Penicillium* sp. LAMAI-505 na fibra cerâmica; B - *Penicillium* sp. LAMAI-505 na espuma de poliuretana; C - L21 na fibra cerâmica; D - L21 na espuma de poliuretana; E - L120 na fibra cerâmica e F - L120 na espuma de poliuretana. Fonte: Autor, (2018).

A partir dos resultados do MEV apresentados na Figura 20, pode-se notar que o crescimento do *Penicillium* sp. LAMAI-505 ocorreu de formas distintas. Onde na fibra cerâmica ele cresceu ocupando a parte superficial, já na espuma de poliuretana seu crescimento foi dentro dos poros, em sua parte interna. Por se assemelhar mais ao ambiente em que o fungo é encontrado no ambiente natural, a condição que houve a maior atividade de L-asparaginase foi a com o uso do *Penicillium* sp. LAMAI-505, na fibra cerâmica como suporte sólido e adição de L-asparagina. Esta última condição foi a escolhida para realização do teste comparativo avaliando mais dois fungos filamentosos o *Fusarium* sp. e o *Monilia sitophila*, nesse ensaio também foi avaliada a lã de vidro para teste de um novo material inerte (Figura 21).

Figura 21 – Teste comparativo entre os fungos filamentosos: *Penicillium* sp. LAMAI-505, *Fusarium* sp. e *Monilia sitophila* com uso de diferentes suportes sólidos



Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h); P - *Penicillium* sp. LAMAI-505, F - *Fusarium* sp., M - *Monilia sitophila*; E - Espuma de poliuretana, F - Fibra cerâmica e Lv - Lã de vidro.

Conforme ilustrado na Figura 21, o *Penicillium* sp. LAMAI-505 se destacou novamente com o uso da fibra cerâmica como suporte inerte na obtenção da atividade de L-asparaginase quando comparado o fungo na espuma de poliuretana e na lã de vidro. Onde com o uso da fibra cerâmica e adição de L-asparagina alcançou atividade de 1479,3 U/kg de suporte sólido. Porém o *Fusarium* sp. e o *Monilia sitophila* apresentaram maior eficácia na produção da enzima. Visto que, quando aplicados na espuma de poliuretana foram, respectivamente, 45,55% e 68,25% mais eficientes em relação a obtenção da atividade de L-asparaginase.

Os fungos filamentosos são os principais microrganismos cultivados em meio sólido,

pelo fato das matrizes sólidas inertes empregadas assemelham-se aos meios naturais nos quais se desenvolvem. Suas formas de desenvolvimento vegetativo são constituídas por hifas aéreas ramificadas, sendo propícias à colonização de matrizes sólidas porosas (ORIOLO, 1987). Os fungos filamentosos também podem suportar pressões osmóticas elevadas (BEUCHAT, 1983), e se desenvolvem em uma faixa de umidade relativa muito ampla, de 12% até 80%, considerando que a umidade relativa depende do nível máximo de retenção de água do material utilizado (LONSANE et al., 1985). Tais características não são encontradas em leveduras e bactérias.

NAKAHAMA et al. (1973) relataram que diversas espécies de *Fusarium* foram capazes de produzir L-Asparaginase, verificando que somente três, das cinquenta estirpes de *Fusarium* testadas não produziram L-Asparaginase com níveis superiores a 0,1 UI/mL. Em seu trabalho IMADA et al. (1973) avaliaram diversas espécies de *Fusarium* e *Penicillium* buscando atividade de L-asparaginase e, obtiveram como resposta de atividade, variações de 0,44 UI/mL com *Penicillium grabulatum* a 1,32 UI/mL com *Penicillium urticae*. Quanto as espécies de *Fusarium*, todas apresentaram valores positivos de produção, um exemplo foi a obtenção da atividade de 0,10 UI/mL com o *Fusarium roseum*.

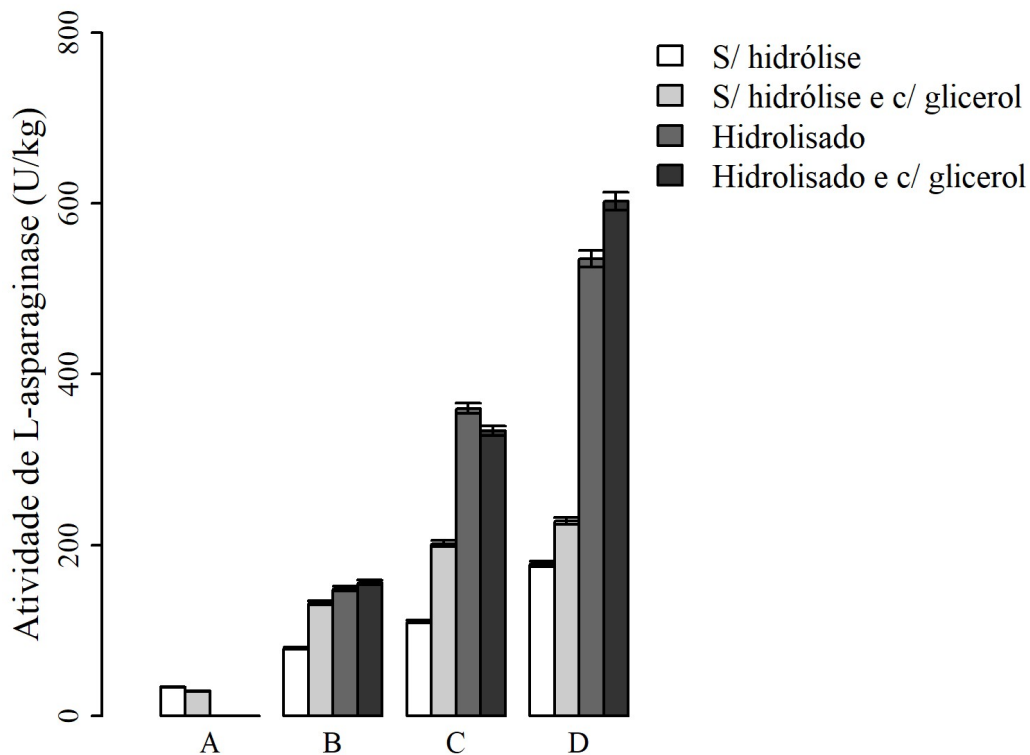
MEGHAVARNAM e JANAKIRAMAN (2017) realizaram experimentos em fermentação estado sólido com o microrganismo *Fusarium culmorum*(ASP-87) e encontraram, em condições otimizadas, a atividade de 1250,0 U/kg de suporte sólido em biomassas de arroz.

Apesar de apresentar menor eficiência na produção de L-asparaginase em relação aos outros fungos testados, foi escolhido o *Penicillium* sp. LAMAI-505 para dar continuidade aos estudos, visto que nos próximos passos foi utilizada uma nova fonte nutritiva, buscando produzir a enzima para aplicação na indústria alimentícia. Esse fungo já é muito utilizado nesse setor, devido ao fato de não produzir subprodutos tóxicos ou nocivos de alguma forma a saúde humana e isto se torna de interesse em aplicações na indústria alimentícia, fato que não pode ser afirmado em relação aos outros fungos em teste. Porém não fica descartada a utilização dos demais fungos para outras aplicações.

5.2 Estudo da nova fonte nutritiva na produção de L-asparaginase

Como o *Penicillium* sp. LAMAI-505 apresentou maior afinidade com o material cerâmico foi escolhido esse suporte sólido para dar seguimento no trabalho, agora buscando realizar testes para verificar a eficiência das larvas *T. molitor* aplicadas como fonte nutritiva para o processo fermentativo. A Figura 22, mostra os resultados obtidos no teste variando as concentrações de *T. molitor*, a presença ou não de hidrólise e glicerol (inserido 1 grama sobre a superfície do material inerte), na resposta de produção de L-asparaginase.

Figura 22 – Teste com o *Penicillium* sp. com o uso do *Tenébrio molitor* como biomassa na fibra cerâmica



Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h); A- 0 g/100 mL, B- 1 g/100 mL, C- 2 g/100 mL e D- 5 g/100 mL de *Tenébrio molitor* na solução nutritiva.

Analisando a Figura 22 pode-se verificar que o ensaio indica que o processo de hidrólise e a presença do glicerol promoveram melhor eficiência de produção de L-asparaginase. É possível observar também que com o aumento da concentração da biomassa promoveu maior produção da enzima, visto que variando a concentração de 2 para 5 g/100 mL de *T. molitor*, ocorreu um aumento de aproximadamente 1,8 vezes da atividade de L-asparaginase.

O resultado positivo da hidrólise é justificado pois esta possibilita a quebra das moléculas presentes nas larvas, disponibilizando mais nutrientes para solução utilizada para realização do processo fermentativo e facilitando assim sua captação pelo microrganismo que está utilizando essa biomassa como fonte nutritiva.

O uso de glicerol como fonte de carbono na produção de L-asparaginase se mostrou efetiva, e este comportamento foi observado em outros trabalhos, como em [Narayana, Kumar e Vijayalakshmi \(2008\)](#), que avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono como a glicose, frutose, maltose, tralose e glicerol na produção de L-asparaginase, sendo que com a utilização do glicerol foi a segunda mais eficiente onde obtiveram atividade de 2,26 UI/mg de peso seco celular, sendo inferior apenas a maltose (3,74 UI/mg).

A utilização do *T. molitor* como fonte nutritiva é algo novo, comumente é utilizado fontes nutritivas para a produção de L-asparaginase a glicose, a lactose, a sacarose, a maltose,

a frutose entre outras fontes. Como visto no trabalho realizado por [Gurunathan e Sahadevan \(2011b\)](#) que avaliaram em seu estudo para obtenção de L-asparaginase de *Aspergillus terreus* MTCC 1782, verificaram que a glicose (0,4%) foi a melhor fonte de carbono para a produção de L-asparaginase (22,61 U/mL) em meio Czapek Dox modificado.

Outros trabalhos são encontrados na literatura utilizando fontes nutritivas diversas, como no trabalho realizado por [Mishra \(2006\)](#), que utilizou resíduos agroindustriais de três leguminosas (farelo de guandu, feijão preto e soja) como biomassa nutritiva e a aplicação do *Aspergillus niger* para o processo de fermentação em estado sólido. O autor obteve a máxima produção da enzima empregando a soja (40,9 ± 3,35 U/g de substrato seco), seguido do farelo de feijão preto e de guandu, com um tempo de fermentação de 96 horas, umidade de 70%, pH 6,5 e temperatura de 30 ± 2°C.

Para a otimização da produção da enzima foi estabelecido um planejamento experimental, em que as variáveis serem analisadas foram: pH, glicerol (g) e concentração de *T. molitor* (g/100 mL).

5.3 Otimização da produção da enzima L-asparaginase por FES empregando o planejamento experimental com composto central rotacional 2³

A Tabela 6 mostra o planejamento composto central rotacional com as variáveis descodificadas, e as respostas da atividade em U/kg de suporte sólido encontradas, que foi realizado visando avaliar diferentes condições para a produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido (FES).

Com o planejamento experimental mostrado na Tabela 6, verifica-se a melhora na produção da enzima L-asparaginase, aumentando consideravelmente a sua atividade em relação ao ensaio preliminar realizado anteriormente (Figura 22), onde agora conseguiu-se obter valor de atividade três vezes maior. O melhor ensaio para a produção de L-asparaginase foi o número 5, que teve atividade de 1942,83 U/kg, com pH de 3,00; glicerol inserido na superfície do suporte inerte de 3,00 gramas e a concentração de *T. molitor* de 20 g/100 mL.

Tabela 6 – Resultados da otimização da produção de L-asparaginase.

Ensaio	pH	Glicerol (g)	<i>T. molitor</i> (g/100 mL)	Atividade (U/Kg)
1	3,00	3,00	8,00	744,83
2	6,00	3,00	8,00	1335,33
3	3,00	7,00	8,00	694,83
4	6,00	7,00	8,00	260,33
5	3,00	3,00	20,00	1942,83
6	6,00	3,00	20,00	1299,33
7	3,00	7,00	20,00	809,50
8	6,00	7,00	20,00	474,33
9	1,98	5,00	14,00	928,33
10	7,02	5,00	14,00	676,00
11	4,50	1,64	14,00	629,50
12	4,50	8,36	14,00	429,50
13	4,50	5,00	3,91	58,17
14	4,50	5,00	24,09	671,00
15	4,50	5,00	14,00	300,33
16	4,50	5,00	14,00	283,67
17	4,50	5,00	14,00	421,17

Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

Com base nesses resultados, foi verificado que as combinações avaliadas geraram condições propícias para que o fungo possa produzir a enzima L-asparaginase. Além disso, sugere-se que estas mesmas condições estimularam a liberação da enzima, pelo fato de que a FES permitiu simular as condições semelhantes ao ambiente no qual se desenvolve naturalmente o fungo.

A análise estatística dos dados foi realizada no software estatístico R, com o qual se obteve o modelo expressado na equação 5.1. Após análise de significância (95%) dos coeficientes, foi obtido os coeficientes mais significativos apresentados na Tabela 7.

$$y = a1 \times X1 + a2 \times X1^2 + b1 \times X2 + b2 \times X2^2 + c1 \times X3 + c2 \times X3^2 + d1 \times X1 \times X2 + e1 \times X1 \times X2 + f1 \times X2 \times X3 + j \quad (5.1)$$

Tabela 7 – Resultados estatísticos

Parâmetros	Estimativa	Desvio-padrão	Valor t	Pr(> t)
a2	191,89	100,95	1,901	0,079736*
b1	-250,60	98,46	-2,545	0,024419**
c1	184,70	98,46	1,876	0,083307*
j	549,46	119,78	4,587	0,000509***

Nota: '**' fatores significativos ao nível de confiança de 90%; '***' fatores significativos ao nível de confiança de 95% e '****' fatores significativos ao nível de confiança de 99%.

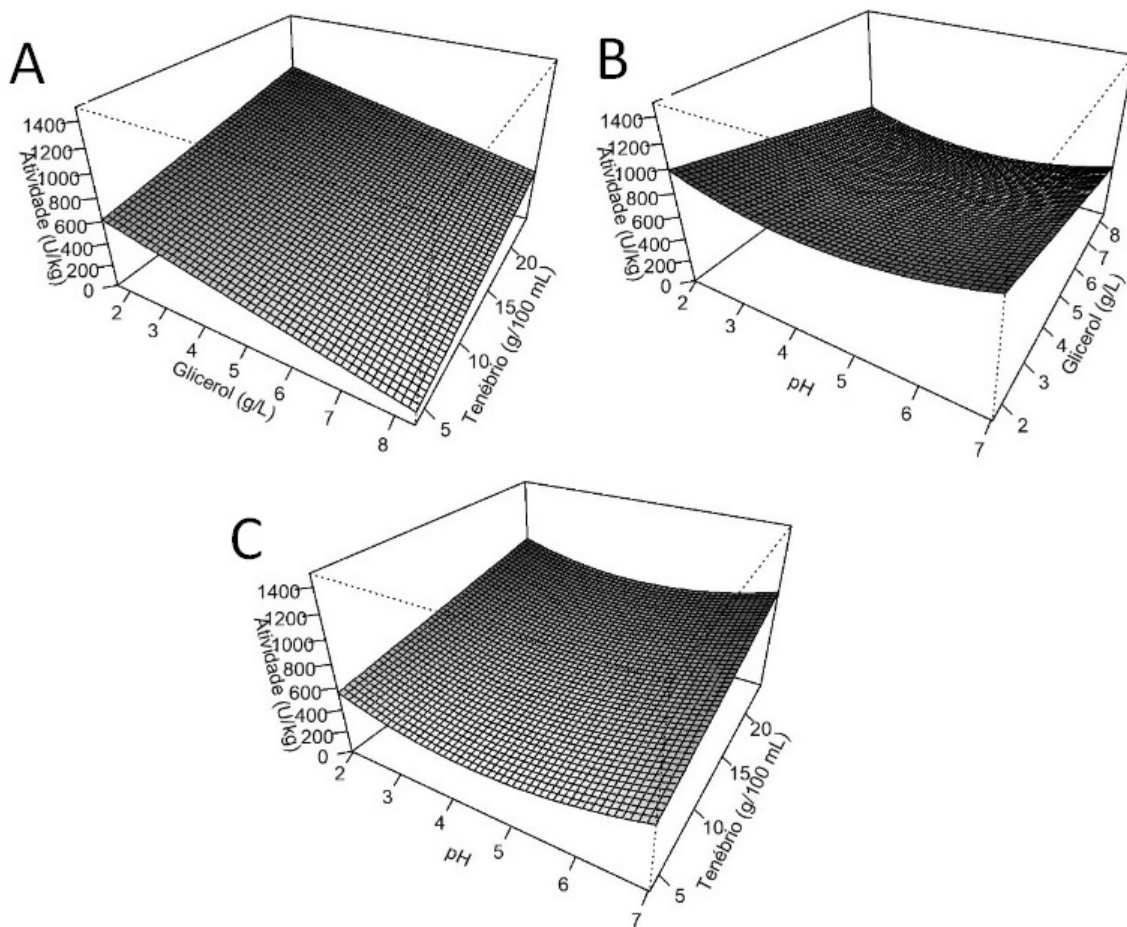
Pela análise da Tabela 7, se nota que todos os parâmetros avaliados foram significativos para $p < 0,1$. A expressão matemática, foi determinada, por análise estatística no programa estatístico R, que permite modelar o processo de produção da enzima L-asparaginase de *Penicillium* sp. LAMAI-505 por FES. O modelo matemático é apresentado na Equação 5.2, na qual X1: pH; X2: glicerol (g); X3: *T. molitor* (g/100 mL).

$$y = a2 \times X1^2 + b1 \times X2 + c1 \times X3 + j \quad (5.2)$$

Para analisar a interação significativa de segunda ordem as variáveis analisadas (pH, glicerol e *T. molitor*), foram feitos gráficos de contorno, os quais são apresentados na Figura 23.

Todas as variáveis testadas influenciaram de forma significativa na produção de L-asparaginase. Na situação A, onde o pH está fixo, se nota que baixas concentrações de glicerol alinhado com 20 g/100 de *T. molitor* geraram as melhores condições de produção da enzima; na situação B, nota-se que com valores baixos de glicerol em conjunto com os valores de pH nos extremos (3,0 e 7,0) responderam bem a produção da enzima. Na situação C, verifica-se que com maiores teores de *T. molitor* e valores de pH extremos se mostrou mais responsiva na produção de L-asparaginase.

Figura 23 – Compilação de gráficos de superfície de resposta da interação entre as variáveis pH, glicerol e *T. molitor*.



Nota: Gráficos de superfície de resposta para otimização da produção de L-asparaginase A - Com pH fixo em 3,0 e a atividade, de glicerol e *T. molitor* variando; B - Com *T. molitor* fixo em 20,0 g/100 mL e atividade, pH e glicerol variando ; C - Com glicerol fixo em 3,0 g e atividade, pH e *T. molitor* variando.

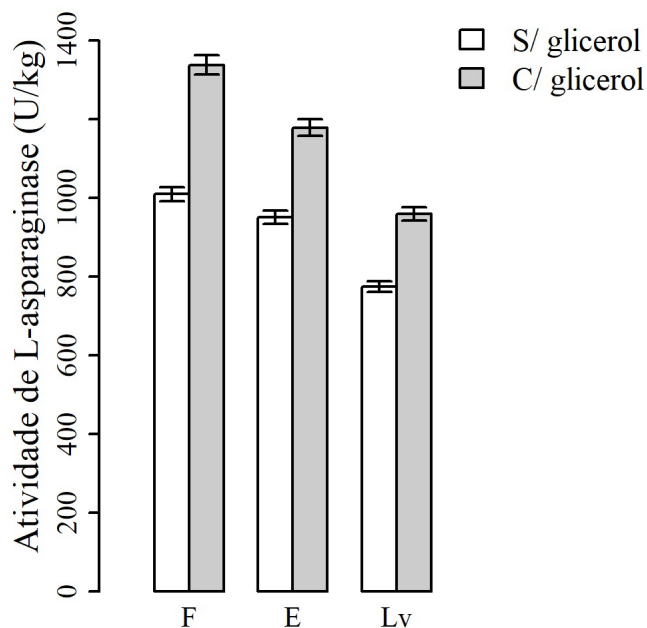
O modelo gerado pelas variáveis pH, glicerol e *T. molitor*, obteve R^2 de 0,5114. O valor observado do R^2 não foi tão responsivo, pelo fato de se tratar de um meio complexo no qual as variáveis não representam todos os fatores que influenciam no processo, pois existe grande possibilidade de que na obtenção da concentração do *T. molitor* por hidrólise, ocorre a produção compostos que estão influenciando a produção de L-asparaginase. Para seguimento do trabalho optou-se por desenvolver os ensaios sem a utilização de um modelo, buscando otimizar explorando a combinação de diferentes intervalos entre as variáveis glicerol e concentração da biomassa nutritiva visando a escolha da condição mais eficiente.

5.4 Produção de L-asparaginase avaliando o efeito da hidrólise em conjunto com a adição de glicerol

5.4.1 Adição de glicerol na superfície do meio sólido

A Figura 24 mostra os resultados obtidos no teste com o *T. molitor* (5 g/100 mL) e glicerol (5 g aplicadas sobre o suporte inerte) como fonte nutritiva. Foi observado que *Penicillium* sp. LAMAI-505 demonstrou mais afinidade com a fibra cerâmica, e também foi mostrado que a adição do glicerol aumentou a eficiência em todos suportes inertes avaliados. No ensaio com adição de glicerol na fibra cerâmica houve a obtenção de atividade de L-asparaginase de 1325,0 U/kg de suporte sólido, sendo 11,95% e 28,30% mais efetiva que os ensaios com a espuma de poliuretana e a lã de vidro, respectivamente.

Figura 24 – Uso do *Tenébrio molitor* como biomassa e influência do glicerol na superfície do suporte inerte



Nota: F - Fibra cerâmica, E - Espuma de poliuretana, Lv - Lã de vidro; condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h); A - Sem incentivo de glicerol, B - Com incentivo de glicerol (5 g).

Foi realizada as combinações entre a quantidade de glicerol e as concentrações de *T. molitor*, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8, buscando encontrar uma condição ótima de atividade da L-asparaginase e assim avaliar as variáveis pH e tempo, visando aumentar ainda mais a eficiência de produção da enzima.

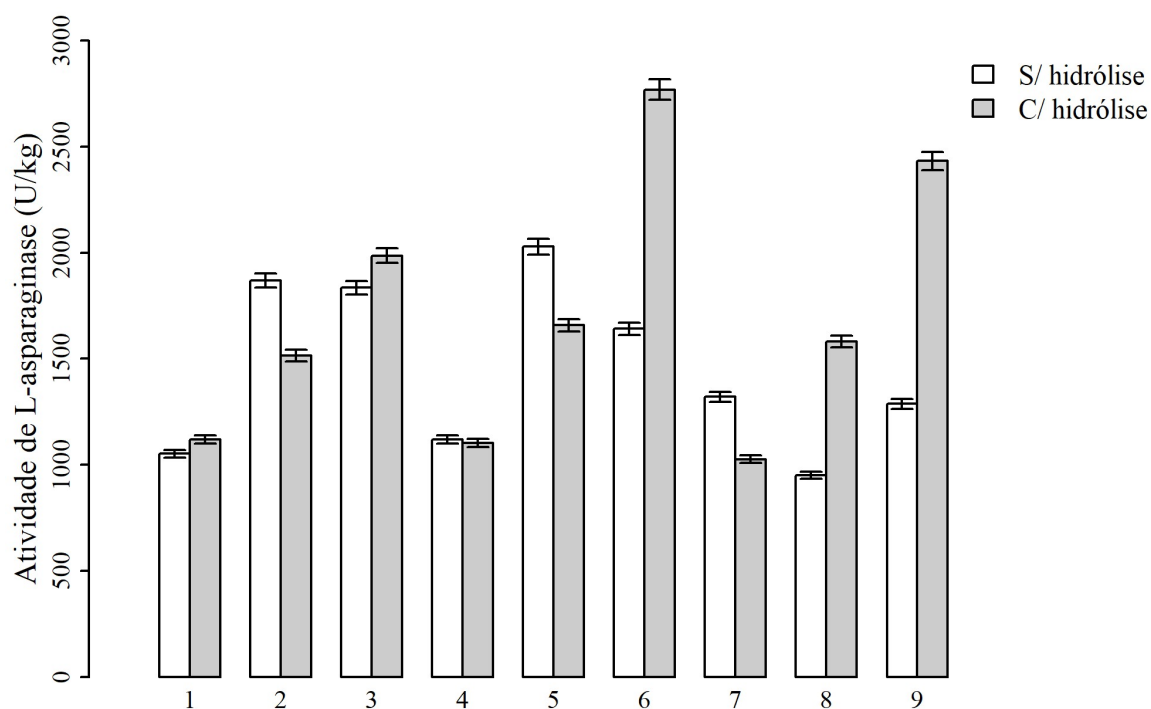
Tabela 8 – Combinações entre glicerol na superfície do suporte inerte e *Tenébrio molitor*

Ensaio	Glicerol (g)	<i>T.molitor</i> (g/100mL)	Atividade de L-asparaginase (U/kg)	
			Sem hidrólise	Com hidrólise
1	5	5	1041,7	1108,3
2	5	10	1850,0	1500,0
3	5	15	1816,7	1966,7
4	7,5	5	1108,3	1091,7
5	7,5	10	2008,3	1641,7
6	7,5	15	1625,0	2741,7
7	10	5	1308,3	1016,7
8	10	10	941,7	1566,7
9	10	15	1275,0	2408,3

Fonte: Autor, (2018)

Como mostrado na Figura 25, a condição 6 hidrolisada foi a mais eficiente na produção de L-asparaginase, atingindo o valor de 2741,7 U/kg de suporte sólido. Pode ser observado também que quando se analisa a hidrólise de todas as condições percebe-se que há um aumento na produção da enzima conforme se aumenta os teores de *T. molitor*. O mesmo não é visto quando na ausência do processo hidrolítico, isso pode ser explicado pelo fato de se tratar de uma biomassa nutritiva complexa, onde quando aplicada sem o tratamento de hidrólise pode se comportar de maneiras diversas, dificultando uma análise mais detalhada do processo.

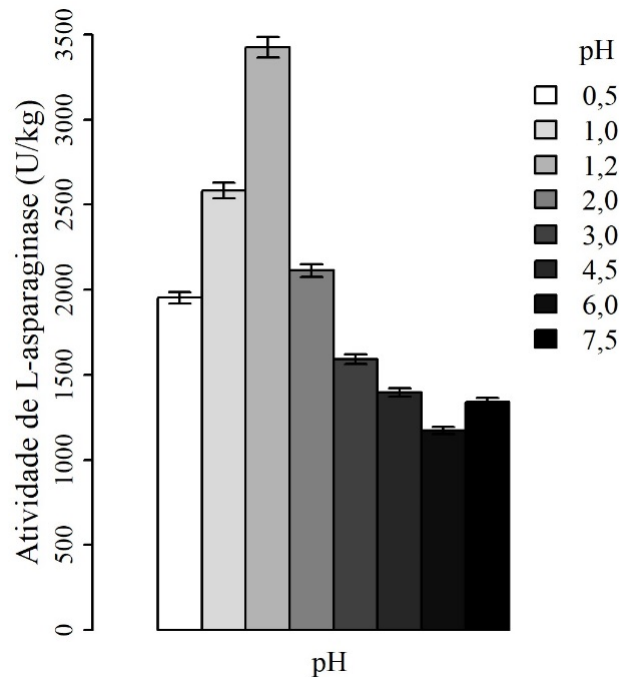
Figura 25 – Análises das FES com glicerol na superfície do suporte inerte



Nota: Condições de temperatura(25°C); tempo de fermentação(48h).

Após verificar que a condição 6 foi a mais responsiva, foi realizado o teste para encontrar o pH ótimo de processo, visando aumentar a produtividade da enzima de interesse (Figura 26). Ao analisar a Figura 26 observa-se que a condição que se mostrou mais eficiente foi a de pH igual a 1,2, como indicado na Figura 26, que representa o pH do meio nutritivo sem a realização de correção, ou seja, após o processo de hidrólise foi medido o pH e a solução nutritiva já foi utilizada no processo fermentativo.

Figura 26 – Análise de FES variando o pH



Nota: Condição 6 da Tabela 8, sendo testada variando a solução nutritiva em diferentes pH); condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

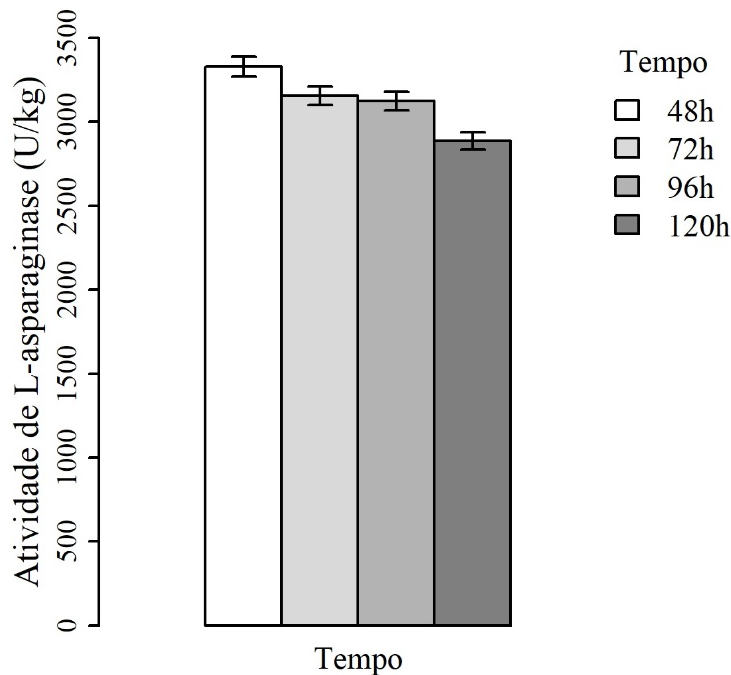
De acordo com as análises dos resultados os melhores ensaios para a produção de L-asparaginase foram em faixas de pH baixas, o que pode ser confirmado através da Figura 26, onde as faixas que se destacaram foram as mais baixas, visto que na condição 2 (pH 1,0), 3 (pH 1,2) e 4 (pH 2,0) atingiram valores de 2558,3; 3391,7 e 2091,7 U/Kg de suporte sólido, respectivamente, mostrando que o fungo preferiu regiões mais ácidas de pH para produção da enzima.

Após verificado a eficiência do processo de hidrólise para melhora do meio nutritivo, a melhor combinação de glicerol e concentração de *T. molitor* e a faixa de pH no qual o fungo se adaptou melhor, foi realizado ensaios variando o tempo de fermentação, visando encontrar melhores resultados para a produção da enzima.

A Figura 27 mostra o ensaio variando em quatro intervalos de tempo o processo fermentativo (48, 72, 96 e 120 h), utilizando a condição 6 (7,5 g de glicerol e 15 g/100 mL de *T. molitor*), juntamente com a condição de pH ótima (pH= 1,2) encontrada na Figura 26.

Conforme mostrado na Figura 27, coincidentemente o tempo de fermentação que foi mais responsivo foi o de 48 horas, o mesmo tempo em que foi realizado os ensaios anteriores, onde conseguiu atingir teores de 3297,3 U/Kg de suporte sólido. Foi observado que com o aumento do tempo de fermentação, a atividade foi sendo reduzida, isso pode ser explicado pelo fato de que os nutrientes presentes foram consumidos, reduzindo o potencial de produção da enzima do fungo.

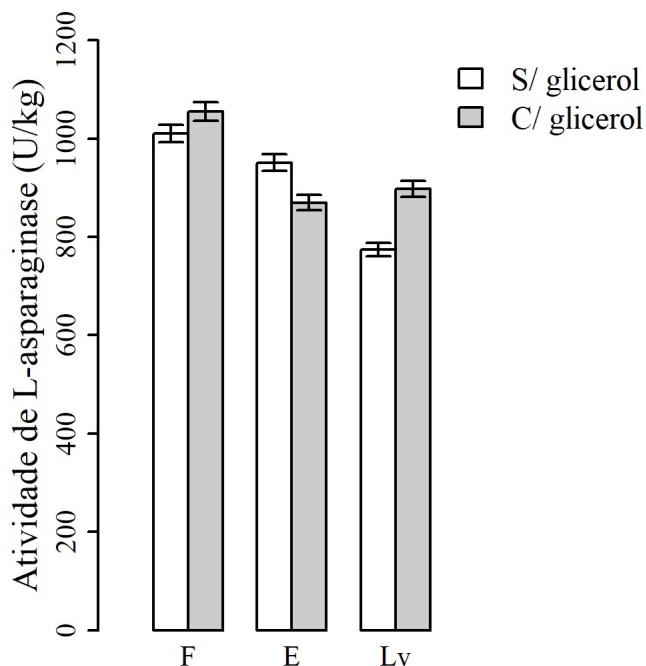
Figura 27 – Análise de FES variando com o tempo



Nota: Condições de temperatura (25°C).

5.4.2 Adição de glicerol na solução nutritiva

A partir desse ponto os ensaios foram realizados utilizando o método de aplicação do glicerol junto a solução nutritiva. A Figura 28 mostra os resultados de atividade de L-asparaginase obtidos ao se comparar a eficiência do *Penicillium* sp. LAMAI-505 nos três suportes sólidos com 5 g/100 mL de *T. molitor* como biomassa e 5 g/L de glicerol. Feito isso foi visto que novamente o fungo foi mais eficiente na fibra cerâmica como material inerte e com a presença do glicerol, onde atingiu teores de 1044,4 U/Kg de suporte sólido, porém a diferença causada pela influência do glicerol diminuiu quando comparado ao ensaio utilizando o glicerol diretamente no suporte sólido. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que a quantidade utilizada de glicerol foi muito reduzida, sendo assim se fez necessário realizar combinações entre glicerol e *T. molitor*, para encontrar faixas otimizadas com maior eficiência de produção da enzima.

Figura 28 – Uso do *Tenébrio Molitor* como biomassa e influência do glicerol na solução nutritiva

Nota: F - Fibra, E - Espuma de poliuretana, Lv - Lã de vidro; condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

A Tabela 9 traz os resultados dos 12 ensaios de variações entre glicerol e a biomassa, sendo um intervalo de 5 a 20 g/L para a primeira variável e de 5 a 15 g/100 mL de concentração para a segunda variável.

Tabela 9 – Combinações entre glicerol na solução nutritiva e *Tenébrio molitor*

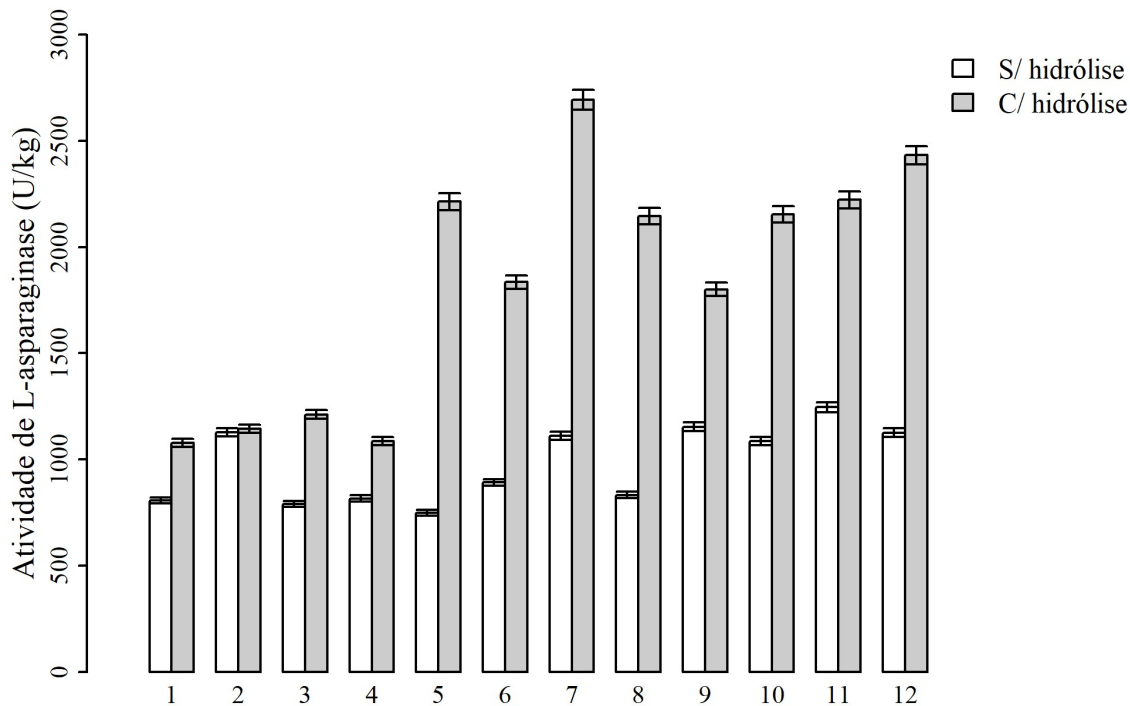
Ensaio	Glicerol (g/L)	<i>T.molitor</i> (g/100mL)	Atividade de L-asparaginase (U/kg)	
			Sem hidrólise	Com hidrólise
1	5	5	800,0	1066,7
2	10	5	1116,7	1133,3
3	15	5	783,3	1200,0
4	20	5	808,3	1075,0
5	5	10	741,7	2191,7
6	10	10	883,3	1816,7
7	15	10	1100,0	2666,7
8	20	10	825,0	2125,0
9	5	15	1141,7	1783,3
10	10	15	1075,0	2133,3
11	15	15	1233,3	2200,0
12	20	15	1115,0	2408,3

Fonte: Autor, (2018)

Por meio da Figura 29, verifica-se que a condição 7, quando na presença de hidrólise

se mostrou mais eficiente na produção de L-asparaginase, obtendo atividade de 2666,7 U/kg de suporte sólido, a condição 5, 11 e 12 também apresentaram bons resultados, obtendo 2191,67; 2200,0 e 2408,3 U/kg de suporte sólido. Ao analisar a influencia da hidrólise nesse presente ensaio foi mais significativa quando comparado ao teste da Figura 25.

Figura 29 – Análises das FES com com glicerol na solução nutritiva

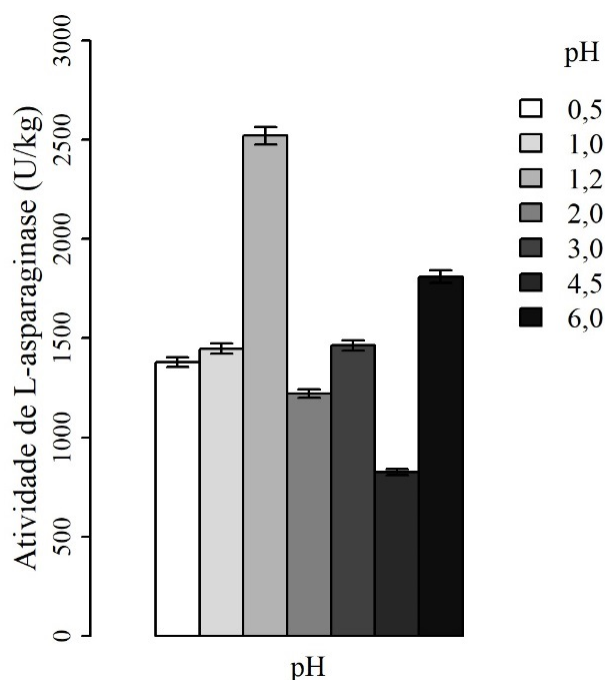


Nota: Condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

Apesar da ocorrência de boas condições além da 7, a mesma foi escolhida como condição a ser otimizada em relação as variáveis pH e tempo, pois a mesma utiliza menores teores de *T. molitor* como biomassa que as condições 11 e 12, e foi mais responsiva que todas outras condições testadas.

A Figura 30 mostra os testes realizados com a condição escolhida (7), buscando encontrar a faixa de pH ótimo para a produção de L-asparaginase, onde entre as 7 faixas de pH testadas, pode ser observado que a melhor condição encontrada foi a 3, onde repetiu o ocorrido no ensaio mostrado na Figura 26, onde o pH de 1,2, que não passou por correções foi o mais eficiente.

Figura 30 – Análise de FES variando o pH



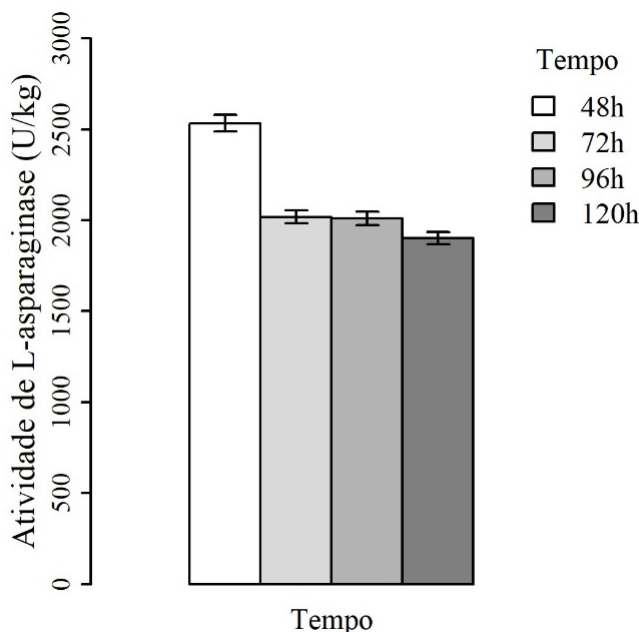
Nota: Condição 7 da Tabela 9 variando a solução nutritiva em diferentes pH); condições de temperatura (25°C); tempo de fermentação (48h).

A condição 3 (pH 1,2) se destacou em relação as outras por obter 2495,9 U/kg de suporte sólido. Porém quando comparado ao ensaio realizado Figura 26, que mostrou que os valores de pH ácidos foram mais eficientes para a produção de atividade de L-asparaginase, não apresentou destaque para as condições ácidas, como observado na outra metodologia.

Após realizado todos os testes para encontrar a melhor condição para atividade de L-asparaginase, foi realizado a variação da mesma no tempo afim de encontrar resultados otimizados de tempo. A Figura 31 mostra o ensaio variando em quatro intervalos de tempo o processo fermentativo (48, 72, 96 e 120 horas), utilizando a condição 7 descrita na Tabela 9, juntamente com a condição de pH ótima encontrada na Figura 30.

O resultado obtido na Figura 31, mostra que no tempo fermentativo de 48 horas foi o que obteve maior eficiência na produção de L-asparaginase, conseguindo atingir teores de 2508,5 U/kg de suporte sólido. Foi observado que com o aumento do tempo de fermentação, semelhante ao procedimento anterior, a redução da atividade de L-asparaginase, isso pode ser explicado pelo consumo do meio nutritivo com o passar do tempo.

Figura 31 – Análise de FES variando com o tempo



Nota: Condições de temperatura (25°C).

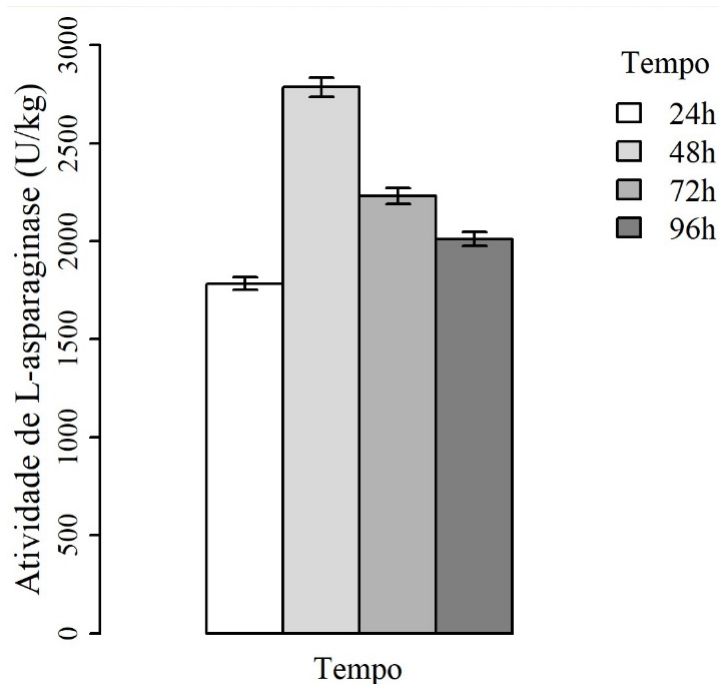
5.5 Otimização com o uso do biorreator rotativo

Para realização do estudo utilizando o biorreator rotativo, optou-se por utilizar a condição otimizada com uso do glicerol diretamente na solução nutritiva, visto que essa metodologia faz com que o uso do glicerol seja muito reduzido quando comparado a aplicação do glicerol de forma direta sobre o material sólido inerte.

A Figura 32 mostra o estudo variando no tempo (24, 48, 72 e 96 horas) referente ao uso da condição otimizada no biorreator estático que contou com uso de 10 g/L de glicerol, 10 g/100 mL *T. molitor*, presença do processo de hidrólise e pH de 1,2.

Ao comparar os resultados obtidos na Figura 32 com os da Figura 30, nota-se que bom o uso do biorreator rotativo nos diferentes tempos de fermentação avaliados, todos foram mais eficientes para obtenção de atividade de L-asparaginase. A condição 2 (48 horas), mostrou-se a mais eficiente na produção de L-asparaginase, conseguindo atingir 2758,3 U/kg de suporte sólido, esse valor apresentou incremento de 9,1% quando comparado ao ensaio de maior eficiência com o uso do biorreator estático. Isso pode ser observado, pois o emprego do biorreator rotativo melhora a transferência de calor e massa no sistema por estar sendo mantido em movimento e a entrada de ar no sistema é facilitado, aumentando o acesso do oxigênio para o microrganismo.

Figura 32 – Análise de FES no biorreator rotativo variando com o tempo



Nota: Condições de temperatura (25°C).

Doriya e Kumar (2018) em seus estudos realizados comparando dois tipos de biorreatores, verificaram a produção de L-asparaginase de *Aspergillus tubingensis* IBBL1, com uso de sementes de algodão como biomassa em biorreator estático de bandeja, após 120 h de fermentação, a maior atividade de L-asparaginase de 16,12 U/gds. Estes autores também verificaram a aplicação do biorreator rotativo com rotação em 1 rpm, que obteve produção máxima de L-asparaginase de 19,96 U/gds.

O uso desse tipo de biorreator mostrou ser eficiente para a produção de L-asparaginase, indicando que o biorreator rotativo possibilita o aumento da escala do processo para obtenção da enzima.

Atualmente não existe reportado na literatura nenhum trabalho de produção de L-asparaginase utilizando o *T. molitor* como fonte nutritiva e nem com o uso da fibra cerâmica como suporte sólido inerte, bem como são poucos os trabalhos que apresentam a produção desta importante enzima de natureza extracelular. Por ser um estudo inovador, ressalta a importância e mérito científico desse trabalho.

6 Conclusões

O presente trabalho possibilitou analisar diferentes aspectos relacionados com as condições de cultivo e seleção de microrganismos na produção de L-asparaginase por fermentação em estado sólido.

As leveduras (*Pichia guilliermondii*, *Candida sake*, *Candida globosa*, *Cryptococcus victori* e o *Leucosporidium scottii*) e os fungos filamentosos (*Penicillium* sp. LAMAI-505, *Fusarium* sp. e o *Monilia sitophila*) testados foram capazes de produzir de L-asparaginase, no entanto os fungos filamentosos se mostraram mais eficientes para o processo de fermentação em estado sólido (FES) que as leveduras.

Em relação aos fungos filamentosos e as matrizes sólidas testadas a espuma de poliuretana e a fibra cerâmica se mostraram eficientes para uso como suporte de FES para a produção de L-asparaginase.

Apesar de se tratar de uma biomassa nutritiva complexa, o uso do *Ténebrio molitor* como meio nutritivo possibilita a produção de L-asparaginase, principalmente quando passa por um processo de preparação de hidrólise.

Referente as formas de aplicação do glicerol, notou-se que os resultados obtidos foram próximos, apresentando proporcionalidade em relação a atividade de L-asparaginase e quantidade de glicerol, onde preferiu-se utilizar o glicerol na solução nutritiva, pois utiliza-se menores concentrações para obtenção de resultados semelhantes.

A otimização realizada através do emprego do biorreator rotativo foi eficiente para a obtenção de atividade de L-asparaginase.

Referências

- ABREU, J.; ROVIDA, A.; PAMPHILE, J. Fungos de interesse: Aplicações biotecnológicas. *Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review*, v. 21, n. 1, p. 55–59, 2015. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1613>>.
- AEHLE, W. *Enzymes in Industry*. https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&id=VMfYJ-Dep-UCoi=fndpg=PR15ots=tXqgVt2gyPsig=EF9NnQQU65s-RRiSsSmFNAquI6gredir_esc=yv=onepageqf=false:Weinheim:WILEY-VCHVerlagGmbHCo,2007.489p.
- AGUILAR-MIRANDA, E. D. et al. Characteristics of maize flour tortilla supplemented with ground *Tenebrio molitor larvae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, <https://doi.org/10.1021/jf010691y>, v. 50(1), p. 192–195, 2002.
- ALJAMMAS, H. A.; FATHI, H. A.; ALKHALAF, W. Study the influence of culture conditions on rennin production by *Rizhomucor miehei* using solid-state fermentations. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.004>, v. 16(1), p. 213–216, 2018.
- ALMEIDA, R. P. C. D. *AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE L- ASPARAGINASE POR FUNGOS ISOLADOS DO BIOMA CERRADO*. BRASÍLIA, DF, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/18458>>.
- ALMONACID, D. E.; BABBITT, P. C. Toward mechanistic classification of enzyme functions. *Current Opinion in Chemical Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.03.008>, v. 15(3), p. 435–442, 2011.
- ALVES, F. *Modelagem e simulação de Biorreator operando com fungos Trametes versicolor para produção de enzima lacase*. SÃO CAETANO DO SUL, SP, 2010. Disponível em: <<https://maua.br/files/dissertacoes/modelagem-e-simulacao-de-biorreator-operando-com-fungos.pdf>>.
- BARROS, N.; SERAFINI, L.; AZEVEDO, J. L. Biotecnologia na agricultura e na agroindústria. *Guaíba: Agropecuária*, <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>, p. 463, 2001.
- BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. *Environmental Health Perspectives*, <https://doi.org/10.1289/ehp.9023>, v. 115(1), p. 138–145, 2007.
- BERG, H. V. D. Asparaginase revisited. *Leukemia Lymphoma*, <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.537796>, v. 52, n. 2, p. 168–178, 2011.
- BEUCHAT, L. R. Influence of water activity on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*, <https://doi.org/10.4315/0362-028X-46.2.135>, v. 46, n. 2, p. 135–141, 1983.
- BRAGAZZI, N. L. et al. *Chapter Seven - Porous Alumina as a Promising Biomaterial for Public Health*. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.08.003>: Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, 2015. v. 101. ISBN 978-0-12-803367-8.

- BROOME, J. D. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. ii. lymphoma 6c3hed cells cultured in a medium devoid of lasparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. *The Journal of experimental medicine*, <https://doi.org/10.1084/jem.118.1.121>, v. 118, p. 121–148, 1963a.
- BROOME, J. D. Evidence that the l-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects: I properties of the l-asparaginase fo guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. *The Journal of experimental medicine*, <https://doi.org/10.1084/jem.118.1.99>, v. 118, p. 99–120, 1963b.
- BRYNING, G. P.; CHAMBERS, J.; WAKEFIELD, M. E. Identification of a sex pheromone from male yellow mealworm beetles, *Tenebrio molitor*. *Journal of Chemical Ecology*, <https://doi.org/10.1007/s10886-005-7622-x>, v. 31, n. 11, p. 2721–2730, 2005.
- CACHUMBA, J. et al. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. *Brazilian Journal of Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.004>, p. 77–85, 2016.
- CACHUMBA, J. J. M. *Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido*. LORENA, SP, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/97/97132/tde-30062017-200104/pt-br.php>>.
- CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. Production of polyhydroxyalkanoates (phas) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.088>, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.
- CERDA, A. et al. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: A first approach. *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.131>, v. 271, p. 409–416, 2019.
- CHEOK, M.; EVANS, W. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Cancer*, <https://doi.org/10.1038/nrc1800>, v. 6, n. 2, p. 117–227, 2006.
- CHOW, Y.; TING, A. S. Y. Endophytic l-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *Journal of Advanced Research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2014.07.005>, v. 6, n. 6, p. 869–876, 2015.
- CIESAROVA, Z. *Chapter 21 - Impact of L-asparaginase on Acrylamide Content in Fried Potato and Bakery Products*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00021-8>: Acrylamide in Food, 2016. ISBN 978-0-12-802832-2.
- CLEMENTI, A. La desamidation enzymatique de l-asparagine chez les differentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l'organisma. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, <https://doi.org/10.3109/13813452209145156>, v. 19, p. 369–376, 1922.
- CORCUERA, M. et al. Microstruture and properties of polyurethanes derived from castor oil. *Polymer Degradation an Stability*, <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2010.03.001>, v. 95, p. 2175–2184, 2010.
- CRUZ, M. E. M. et al. Enzimas em medicamentos e diagnÓsticos. In: _____. *ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO*. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008. p. 307–331. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>>.

- CUESTA, S. M. et al. The classification and evolution of enzyme function. *Biophysical Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.020>, v. 109, p. 1082–1086, 2015.
- CUNHA, M. C. da et al. Using response surface methodology to improve the l-asparaginase production by *aspergillus niger* under solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.018>, v. 16, p. 31–36, 2018.
- DE, S. K.; WHITE, J. R. *Short Fibre-Polymer Composites*. Woodhead. <https://doi.org/10.1533/9781845698676>: Limited England, 1996.
- DEWAN, S. Global markets for enzymes in industrial applications, report code-bio030h. *BCC Research*, v. 7215, p. 537–545, 2014. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/enzymes-industrial-applications-report-bio030j.html>>.
- DHALE, M. A.; MOHAN-KUMARI, H. P. A comparative rapid and sensitive method to screen l-asparaginase producing fungi. *Journal of Microbiological Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.010>, v. 102, p. 66–68, 2014.
- DIVINO, B. de S. *Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo Pichia pastoris*. São Paulo, SP, 2015. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses/15122015/Bruna_de_Souza_Divino_ME_corrigida.pdf>.
- DORIYA, K. et al. *Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase*. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.05.003>: Advances in Food and Nutrition Research, 2016. v. 78. ISBN 1043-4526.
- DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Solid state fermentation of mixed substrate for l-asparaginase production using tray and in-house designed rotary bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.024>, v. 138, p. 188–196, 2018.
- DRAINAS, C.; KINGHORN, J. R.; PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*, 10.1099/00221287-98-2-493, v. 13, p. 493–501, 1997.
- DURAND, A.; BROISE, D. D. L.; BLACHERE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. *Journal of Biotechnology*, [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(88\)90068-5](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90068-5), v. 8, p. 59–66, 1988.
- DZIEZAK, J. Enzymes: catalyst for food processes. *Food Technology*, <https://doi.org/10.1590/S1516-89132003000200005>, v. 45, p. 78–85, 1991.
- EL-BAKRY, M. et al. From wastes to high value added products: Novel aspects of ssf in the production of enzymes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1010423>, v. 45, n. 18, p. 1999–2042, 2015.
- ELSHAFEI, A. M. et al. Purification, characterization and antitumor activity of l-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* nrc 829. *British Microbiology Research Journal*, 10.9734/BMRJ/2012/1735, v. 2, n. 3, p. 158–174, 2012.
- FALLIANO, D. et al. Experimental investigation on the compressive strength of foamed concrete: Effect of curing conditions, cement type, foaming agent and dry density. *Construction and Building Materials*, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.12.241>, v. 165, p. 735–749, 2018.

- FARAG, A. M. et al. Optimization of production of anti-tumor l-asparaginase by free and immobilized marine aspergillus terreus. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.10.002>, v. 41, p. 295–302, 2015.
- FERNANDEZ, C. et al. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with leukemia. *Int J Clin Exp Med*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3731178/>, v. 6, n. 7, p. 478–487, 2013.
- FERRARA, M. A. et al. Kinetics of asparaginase ii fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* ure2dal80 mutant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1385/ABAB:113:1-3:299>, v. 113, n. 1-3, p. 299–305, 2004.
- FIOCRUZ Fundação Instituto Oswaldo Cruz. *L-asparaginase passará a ser produzido no Brasil pela Fiocruz em 2015*. Brazil, 2016. Disponível em: <<http://www.canal.fiocruz.br>>. Acesso em: 25 Novembro 2018.
- FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, p. 335–345, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00046-5)>.
- GONCALVES, A. B. ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E CRESCIMENTO APICAL EM FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE. DIAMANTINA, MG, 2017. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1452>>.
- GUIMARAES, T. M. *Identificação e seleção de cepas de levedura Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. Curitiba, 2005. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br>>.
- GUPTA, N.; DASH, S. J.; BASAK, U. C. L-asparaginases from fungi of bhitarkanika mangrove ecosystem. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 17, p. 27–30, 2009a. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication>>.
- GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal l-asparaginase. *Chiang Mai Journal of Science*, <https://www.thaiscience.info/journals/Article/CMJS/10905423.pdf>, v. 38, p. 270–279, 2011b.
- HAIKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00033-6), v. 89, p. 17–34, 2003.
- HALEY, E. E.; FISCHER, G. A.; WELCH, A. D. The requirement for l-asparagine of mouse leukemia cells l5178y in culture. *Cancer research*, <https://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/21/4/532.full.pdf>, v. 21, p. 532–536, 1961.
- HENZE, G. Early postinduction intensification therapy is essential in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature clinical practice oncology*, <https://doi.org/10.1038/ncponc1184>, v. 5, n. 9, p. 502–503, 2008.
- IARC International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. France, 2017. v. 59. Disponível em: <<http://http://www.iarc.fr/en/cancertopics/index.php>>. Acesso em: 23 novembro 2018.
- IMADA, A. et al. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, <https://doi.org/10.1099/00221287-76-1-85>, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1973.

- IRFAN, M. et al. Optimization of process parameters for xylanase production by bacillus sp. in submerged fermentation. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.008>, v. 9, p. 139–147, 2016.
- IZADPANA, F. et al. Marine microbial l-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiological Research*, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.011>, v. 208, p. 99–112, 2018.
- JIMENEZ-PENALVER, P. et al. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. *Biochemical Engineering Journal*, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.08.006>, v. 115, p. 93–100, 2016.
- JR, M. J. P.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. *Microbiology*. [S.l.]: São Paulo: Pearson, 1997, 1997. ISBN 978-85-34600196-2.
- KEBRIAIEI, P.; ANASTAS, J.; LARSON, R. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best Pract Res Clin Haematol*, <https://doi.org/10.1053/beha.2002.0224>, v. 15, n. 4, p. 597–621, 2003.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum: I. course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *The Journal of experimental medicine*, <https://doi.org/10.1084/jem.98.6.583>, v. 98, p. 565–582, 1953.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. ii studies on the nature of de active serum constutuent: Histological mechanism of the regression: Tests for effects of guinea pig serum on lymphoma cells in vitro. *The Journal of experimental medicine*, <https://doi.org/10.1084/jem.98.6.565>, v. 98, n. 6, p. 583–606, 1953.
- KIM, H. S.; JUNG, C. E. Nutritional characteristics of edible insects as potential food materials. *Journal of Apiculture*, <https://doi.org/10.3390/foods10020418>, v. 28, p. 1–8, 2013.
- KOURKOUTAS, Y.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. *LWT - Food Sciety and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.02.024>, p. 980–986, 2006.
- KUMAR, N.; RAMASAMY, R.; MANONMANI, H. Production and optimization of l-asparaginase from cladosporium sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.023>, p. 150–158, 2013.
- LAZAROTTO, M. *Identificação e caracterização de (Fusarium spp. e Pestalotiopsis spp. associados a Carya illinoensis no Rio Grande do Sul*. Rio Grande do Sul, RD, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br>>.
- LEITE, E. et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com leucemia linfóide aguda. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, <https://doi.org/10.1590/S1519-38292007000400009>, v. 7, n. 4, p. 413–421, 2007.
- LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(85\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(85)90083-3), v. 7, n. 6, p. 258–265, 1985.
- MARIOD, A. A.; MIRGHANI, M. E. S.; HUSSEIN, I. *Chapter 50 - Tenebrio molitor Mealworm*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809435-8.00050-0>: Unconventional Oilseeds and Oil Sources, 2017. ISBN 978-0-12-809435-8.

- MEGHAVARNAM, A.; JANAKIRAMAN, S. Solid state fermentation: An effective fermentation strategy for the production of l-asparaginase by *Fusarium culmorum* (asp-87). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.001>, p. 124–130, 2017.
- MISHRA, A. Production of l-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, <https://doi.org/10.1385/ABAB:135:1:33>, v. 135, p. 33–42, 2006.
- MISHRA, A. et al. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. *Renewable Energy*, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.010>, v. 4, p. 57–63, 2016.
- MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. *Solid-State Fermentation Bioreactors Fundamentals of Design and Operation*. [http://dx.doi.org/DOI 10.1007/3540312854](http://dx.doi.org/DOI%2010.1007/3540312854): Editora Springer, 2006.
- NAKAHAMA, K. et al. Formation of l-asparaginase by *Fusarium* species. *Journal of General Microbiology*, <https://doi.org/10.1099/00221287-75-2-269>, v. 75, n. 2, p. 269–273, 1973.
- NAKASHIMA, T. et al. Effect of l-asparaginase and asparagine deprivation on rna metabolism in mouse leukemia l 5178y cells in suspension culture. *Cancer Research*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/986238/>, v. 36, n. 10, p. 3616–3621, 1976.
- NARAYANA, K. J. P.; KUMAR, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian Journal Microbiol*, [10.1007/s12088-008-0018-1](https://doi.org/10.1007/s12088-008-0018-1), v. 48, n. 3, p. 331–336, 2008.
- NARTA, U. K.; KANWAR, S. S.; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of l-asparaginase in the treatment of leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.07.009>, v. 61, n. 3, p. 208–221, 2007.
- NEHMY, R. et al. A perspectiva dos pais sobre a obtenção do diagnóstico de leucemia linfóide aguda em crianças e adolescentes: uma experiência no Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-38292011000300010>, v. 11, n. 3, p. 293–299, 2011.
- OLIVEIRA, J. C. de. *Tópicos em Micologia Médica*. [s.n.], 2014. ISBN 85-900986-1-3. Disponível em: <https://controllab.com/pdf/topicos_micologia_4ed.pdf>.
- OLIVEIRA, R. L. e. *Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Piper hispidum*. Manaus, AM, 2010. Disponível em: <<http://www.pos.uea.edu.br>>.
- ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>, v. 23, n. 4, p. 655–674, 2009.
- ORIOU, E. *Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau*. Toulouse, 1987. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/32984305>>.
- ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1346>, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

- PANINI, R. L. et al. Potential use of mealworms as an alternative protein source for pacific white shrimp: Digestibility and performance. *Aquaculture*, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.02.008>, v. 473, p. 115–120, 2017.
- PATEL, R. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. *Enzyme and Microbial Technology*, [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00186-2), v. 31, p. 804–826, 2002.
- PATRO, K. et al. Development of new medium composition for enhanced production of l-asparaginase by *Aspergillus flavus*. *Journal of environmental biology*, http://www.jeb.co.in/journal_issues/201401_jan14/paper24.pdf, v. 35, n. 1, p.295 – 300, 2014.
- PEDRESCHI, F. et al. Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT - Food Science and Technology*, <http://doi:10.1016/j.lwt.2011.02.004>, v. 44, p. 1473–1476, 2011.
- PETIT, P. et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium sp.* isolated from brazilian cerrado soil. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10.2225/vol12-issue4-fulltext-9, v. 12, n. 4, p. 19–40, 2009.
- PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, <https://doi.org/10.1002/cncr.25489>, v. 117, p. 238–249, 2011.
- PINHEIRO, T. M. A. *PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES BIOSSURFACTANTE E L-ASPARAGINASE PELO USO DE FUNGOS*. Uberlândia, MG, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/>>.
- POLIDORO, T. A. *DESENVOLVIMENTO DE BIORREATOR DE TAMBOR ROTATIVO EM ESCALA DE BANCADA*. CAXIAS DO SUL, RS, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ucs.br/>>.
- PRADHAN, D.; PADHY, S.; SAHOO, B. Enzyme classification using multiclass support vector machine and feature subset selection. *Computational Biology and Chemistry*, <http://10.1016/j.compbiolchem.2017.08.009>, v. 70, p. 211–219, 2017.
- PUI, C.-H.; EVANS, W. E. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The new england journal of medicine*, 10.1056/NEJMra052603, v. 354, p. 166–178, 2006.
- RAGHAVARAO, K.; RANGANATHAN, T.; KARANTH, N. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 127–135, 2003. Disponível em: <<https://eurekamag.com/pdf/003/003938792.pdf>>.
- ROBINSON, T.; NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00132-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00132-8), v. 13, p. 197–203, 2003.
- SAEED, H. et al. Molecular cloning, structural modeling and production of recombinant aspergillus terreus l-asparaginase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Macromolecules*, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.110>, 2017.
- SCHUBER, L. C. L. et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de beta-galactosidase. *Evidência - Ciência e Biotecnologia*, <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/evidencia/article/view/1813>, v. 12, n. 1, p. 19–40, 2012.

SEDAGHAT, A.; TAHERI-NASSAJ, E.; NAGHIZADEH, R. An alumina mat with a nano microstructure prepared by centrifugal spinning method. *Journal of Non-Crystalline Solids*, <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2006.02.068>, v. 352, n. 26-27, p. 2818–2828, 2006.

SHRIVASTAVA, A. et al. Recent developments in l-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, [http://www.croh-online.com/article/S1040-8428\(15\)00003-7/pdf](http://www.croh-online.com/article/S1040-8428(15)00003-7/pdf), v. 100, p. 1–10, 2016.

SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of l-asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.672943>, v. 42, n. 6, p. 299–305, 2012.

SIEMIANOWSKA, E. et al. Larvae of mealworm (*Tenebrio molitor L.*) as european novel food. *Agricultural Sciences*, 10.4236/as.2013.46041, v. 4, n. 6, p. 287–291, 2013.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 10.1016/j.bej.2008.10.019, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SOBOPE Sociedade brasileira de Oncologia Pediátrica. *Desabastecimento de L-asparaginase*. Brazil, 2016. Disponível em: <http://sobope.org.br/apex/f?p=106:13:14287896637375::NO::DFL_PAGE_ID:661>. Acesso em: 25 Novembro 2018.

SOBOPE Sociedade brasileira de Oncologia Pediátrica. *Parceria entre SOBOPE e MS garante tratamento para leucemia infantil*. Brazil, 2016. Disponível em: <http://sobope.org.br/apex/f?p=106:13::NO::DFL_PAGE_ID:901>. Acesso em: 25 Novembro 2018.

SOUZA, P. M. et al. Optimization and purification of l-asparaginase from fungi: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.006>, v. 120, p. 194–202, 2017.

STADLER, R. H. et al. Acrylamide is formed in the maillard reaction. *NATURE*, <https://doi.org/10.1038/419448a>, v. 419, p. 448–449, 2002.

STARZYNSKA-JANISZEWSKA, A. et al. Mould starter selection for extended solid-state fermentation of quinoa. *LWT - Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.055>, v. 99, p. 231–237, 2019.

SUN, Z. et al. A novel bacterial type ii l-asparaginase and evaluation of its enzymatic acrylamide reduction in french fries. *International Journal of Biological Macromolecules*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.031>, v. 92, p. 232–239, 2016.

SYED, F. et al. Preparation and characterization of a green nano-support for the covalent immobilization of glucoamylase from *Neurospora sitophila*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.07.002>, v. 162, p. 309–317, 2016.

THENMOZHI, C. et al. L-asparaginase production by mangrove derived bacillus cereus mab5: optimization by response surface methodology. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60132-6](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60132-6), v. 4, n. 6, p. 486–491, 2011.

TIME. Secret from the guinea pigs. *TIME*, <http://content.time.com/time/subscriber/article>, v. 89, n. 15, p. 67–68, 1967a.

- TIME. Fingerprints from the virus. *TIME*, <http://content.time.com/time/subscriber/article>, v. 89, n. 15, p. 70, 1967b.
- TIME. Enzyme v. leukemia. *TIME*, <http://content.time.com/time/subscriber/article>, v. 90, n. 1, p. 77, 1967c.
- TIME. Answers about l-asparaginase. *TIME*, <http://content.time.com/time/subscriber/article>, v. 90, n. 23, p. 65, 1967d.
- TORTORA, G.; CASE, C.; FUNKE, B. *Microbiologia*. 12. ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2017. v. 3. Disponível em: <<https://docero.com.br/doc/nxc1v8>>.
- VELDKAMP, T. et al. *Insects as a sustainable feed ingredient in pig and poultry diets - a feasibility study*. Wageningen UR Livestock Research, 2012. ISBN 1570 - 8616. Disponível em: <<https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/livestock-reports/428703>>.
- VERMA, N. et al. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. *Critical Reviews in Biotechnology*, <https://doi.org/10.1080/07388550601173926>, v. 27, p. 45–62, 2007.
- VIDYA, J. et al. *Therapeutic Enzymes: L-asparaginases*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00012-9>: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, 2017. ISBN 978-0-444-63662-1.
- VOLK, T. *Pilot-Scale Gas Double-Dynamic Solid-State Fermentation for the Production of Industrial Enzymes*. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00062-9>: Reference Module in Life Sciences Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition), 2013. v. 3. 624–640 p.
- YALAMAC, E.; SUTCU, M.; BAHARBASTURK, S. *Fiber Technology for Fiber-Reinforced Composites*. Woodhead Publishing, 2017. ISBN 978-0-08-101871-2. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/C2015-0-05497-1>>.
- YANG, S.-S. et al. Ubiquity of polystyrene digestion and biodegradation within yellow mealworms, larvae of tenebrio molitor linnaeus (coleoptera: Tenebrionidae). *Chemosphere*, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.078>, v. 212, p. 262–271, 2018.
- ZECK, S. *Utilização de espumas uretânicas no tratamento de óleo mineral isolante contaminado com PCB*. Curitiba, PR, 2004. Disponível em: <www.teses.usp.br/teses>.
- ZHAO, T. et al. Semi-hydrolysis with low enzyme loading leads to highly effective butanol fermentation. *Bioresource Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.056>, v. 264, p. 335–342, 2018.
- ZHAO, X. et al. Yellow mealworm protein for food purposes - extraction and functional properties. *PLOS ONE*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147791>, v. 11(2): e0147791., 2016.
- ZHAO, Y. et al. Effects of solid-state fermentation and proteolytic hydrolysis on defatted soybean meal. *LWT - Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.008>, v. 97, p. 496–502, 2018.
- ZYZAK, D. V. et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, <http://10.1021/jf034180i>, v. 51, p. 4782–4787, 2003. 16.