

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Aline Bacelar Gonçalves

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E CRESCIMENTO APICAL EM FUNGOS
FILAMENTOSOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE**

Diamantina
2017

Aline Bacelar Gonçalves

**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E CRESCIMENTO APICAL EM FUNGOS
FILAMENTOSOS PRODUTORES DE L-ASPARAGINASE**

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

Orientadora: Prof.^a. Dra. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela.

**Diamantina
2017**

Ficha Catalográfica - Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Jullyele Hubner Costa CRB-6/2972

G635a Gonçalves, Aline Bacelar.
2017 Assimilação de nitrogênio e crescimento apical em fungos filamentosos produtores de L-asparaginase / Aline Bacelar Gonçalves – Diamantina, 2017.
149 p. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela

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

1. L-asparaginase. 2. Enzimas terapêuticas. 3. Fungos Filamentosos. 4. Penicillium sp. 5. Fusarium sp. I. Vanzela, Ana Paula de Figueiredo Conte. II. Título.

CDD 615

Elaborada com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

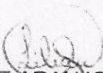
ALINE BACELAR GONÇALVES

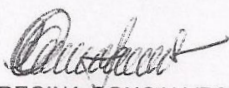
**ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO E CRESCIMENTO APICAL DE FUNGOS
FILAMENTOSOS PRODUTORES DE ASPARAGINASE**

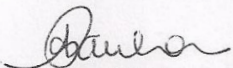
Dissertação apresentada ao
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE

Orientador : Prof.^a Dr.^a Ana Paula De
Figueiredo Conte Vanzéla

Data da aprovação : 30/09/2016


Prof.^a Dr.^a LILIAN DE ARAUJO PANTOJA - UFVJM


Prof.^a Dr.^a RUBIA REGINA GONCALVES SIVIERI - UFVJM


Prof.^a Dr.^a ANA PAULA DE FIGUEIREDO CONTE VANZÉLA - UFVJM

DIAMANTINA

Aos meus pais, os primeiros que
responderam os meus muitos porquês.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão é antes de tudo a Deus, porque sem Ele nada do que foi feito se fez.

Sou imensamente grata a minha família, meus pais Luiz e Nilcileia, meus irmãos Alana e André, a vó Rosa e todos que participaram dos bastidores de tudo que foi construído e por quem qualquer esforço vale a pena. Amo vocês!

Agradeço também a minha orientadora, a Prof.^a Dra. Ana Paula de Figueiredo Conte Vanzela, por partilhar seu conhecimento e experiência. Aprendi muito com suas palavras e suas aulas, mas acima de tudo com seu exemplo. Minha sincera gratidão!

Agradeço a todos amigos do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia, Nahyara Wandscheer Veron, Ana Carolina Ferreira Maia, Suedali Villas Bôas Coelho Barata, Jorge Rueda Ardila e Tiago José da Silva, por compartilhar as experiências e o tempo. Aprendi muito com cada um de vocês!

Agradeço a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nas pessoas de seus professores e funcionários, por permitirem essa valiosa experiência. A contribuição de cada um é inestimável.

Agradeço às professoras Dra. Lilian de Araújo Pantoja e Dra. Rúbia Regina Gonçalves Sivieri, pelas importantes contribuições realizadas durante a defesa deste trabalho e que permitiram melhoras significativas nesta versão final. Muito obrigada!

Agradeço também a Kelly Cristina Kato, a Mércia Letice Lozer de Amorim e ao José Joaquim Sá Teles que auxiliaram na realização dos experimentos e contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de mestrado.

Agradeço aos amigos e colegas que também participaram desse momento de desconstrução e reconstrução. A todos muito obrigada!

*“Deus sábio, nós reconhecemos
que a nossa ciência e a nossa arte
e todo conhecimento humano
da verdade toda é pequena parte.”*

Thomas Troeger

RESUMO

O tratamento das leucemias é desafiador por vários aspectos, entre os quais podem ser destacados os efeitos adversos e a obtenção de opções terapêuticas de alta qualidade e de custos razoáveis. A utilização da enzima L-asparaginase como agente terapêutico, limita a fonte exógena de asparagina, da qual as células malignas dependem para o metabolismo celular e para a sobrevivência. Essa é uma opção que oferece menores riscos ao paciente e às células saudáveis, que são capazes de sintetizar este aminoácido. Neste cenário o objetivo deste trabalho foi selecionar, entre fungos filamentosos, linhagens produtoras da enzima L-asparaginase. O estudo também buscou avaliar o efeito da variação da fonte de carbono e da razão carbono-nitrogênio no crescimento e na expressão da atividade enzimática, a fim de desenvolver meios de cultivo para o processo produtivo. Realizou-se também um estudo do crescimento apical das três linhagens selecionadas, duas do gênero *Penicillium sp.* e uma do gênero *Fusarium sp.*, em diversos meios de cultivo. O conhecimento gerado sobre as linhagens produtoras e os demais estudos realizados permitiram a obtenção de um meio de cultivo que possibilitou a produção enzimática em até $11,45 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ com a linhagem de *Fusarium sp.*

Palavras Chave: L-asparaginase; Enzimas terapêuticas; Fungos Filamentosos; Leucemia Linfocítica Aguda; *Penicillium sp.*; *Fusarium sp.*

ABSTRACT

The treatment of leukemia is challenging in many ways, including the adverse effects and obtaining treatment options of high quality and reasonable cost. The use of L-asparaginase enzyme as a therapeutic agent limits the exogenous source of asparagine, which the malignant cells depend for cellular metabolism and survival. This option offers lower risk to patients and healthy cells, which are able to synthesize this amino acid. Therefore, the objective of this work was to select among filamentous fungi, producing strains of L-asparaginase enzyme. The study also aimed at evaluating the effect of varying the carbon source and carbon-nitrogen ratio in the growth and expression of the enzymatic activity to develop culture media for the production process. It was also carried out a study of the apical growth of the three strains selected, two of the genus *Penicillium sp.* and one *Fusarium sp.*, cultivated in various culture media. The knowledge about the growth of the strains studied in different nutritional sources and other studies allowed obtaining a culture medium that enabled the enzyme production of $11.45 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ by *Fusarium sp.*

Keywords: L-asparaginase; Therapeutic enzymes; Filamentous fungi; Acute lymphoblastic leukemia; *Penicillium sp.*; *Fusarium sp.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 - História da descoberta da atividade antineoplásica da enzima L-asparaginase..... | 42 |
| Figura 2 - Reação catalisada pela enzima L-asparaginase | 44 |
| Figura 3 - Via Catabólica da Asparagina ao oxaloacetato..... | 45 |
| Figura 4 - Mecanismo de Ação da L-asparaginase..... | 46 |
| Figura 5 - Custo de importação de L-asparaginase entre 1997 e 2016..... | 50 |
| Figura 6- Fungos filamentosos selecionados para a produção de L-asparaginase. | 55 |
| Figura 7 – Faixa de Viragem do indicador de pH Azul de Bromotimol. | 57 |
| Figura 8 – Metodologia de obtenção e inóculo de disco micelial empregado na triagem de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase..... | 57 |
| Figura 9 - Germinação e Crescimento apical por duas metodologias | 64 |
| Figura 10 – Formação do halo de expressão da atividade de L-asparaginase em meio Czapek-Dox modificado | 70 |
| Figura 11 – Índice de atividade enzimática determinado em culturas de linhagens fúngicas.. | 72 |
| Figura 12 – Expressão da atividade de L-asparaginase pelas linhagens de fungos filamentosos selecionadas pelo seu potencial para a produção enzimática. | 74 |
| Figura 13 - Morfologia macroscópica da linhagem <i>Penicillium sp.</i> T6.2. | 76 |
| Figura 14 - Morfologia macroscópica da linhagem <i>Penicillium sp.</i> T8.3. | 78 |
| Figura 15 - Morfologia macroscópica da linhagem <i>Fusarium sp.</i> T22.2..... | 80 |
| Figura 16 - Teste de Ehrlich | 81 |
| Figura 17 - Aspectos micromorfológicos do <i>Penicillium sp.</i> T6.2 | 82 |
| Figura 18 - Aspectos micromorfológicos do <i>Penicillium sp.</i> T8.3..... | 83 |

| | |
|--|-----|
| Figura 19 – Estruturas reprodutivas de <i>Fusarium sp.</i> T22.2..... | 84 |
| Figura 20 - Aspecto micromorfológico do <i>Fusarium sp.</i> T22.2. | 85 |
| Figura 21 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo filamentosso <i>Penicillium sp.</i> T6.2. | 86 |
| Figura 22 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo filamentosso <i>Penicillium sp.</i> T8.3. | 87 |
| Figura 23 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo filamentosso <i>Fusarium sp.</i> T22.2. | 88 |
| Figura 24 – Sequência ITS da linhagem <i>Penicillium sp.</i> T8.3 e análise comparativa com o programa BLAST..... | 89 |
| Figura 25 – Sequência ITS da linhagem <i>Fusarium sp.</i> T22.2 e análise comparativa com o programa BLAST..... | 91 |
| Figura 26 - Perfil de crescimento do <i>Penicillium sp.</i> T6.2 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio..... | 97 |
| Figura 27 - Perfil de Crescimento do <i>Penicillium sp.</i> T8.3 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio..... | 98 |
| Figura 28 - Perfil de Crescimento do <i>Fusarium sp.</i> T22.2 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio..... | 98 |
| Figura 29 – Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre o índice de atividade de L-asparaginase | 100 |
| Figura 30– Germinação e crescimento apical de <i>Penicillium sp.</i> T6.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH ₄) ₂ SO ₄ ; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. | 103 |
| Figura 31– Germinação e crescimento apical de <i>Penicillium sp.</i> T6.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – | |

(NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato..... 104

Figura 32 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura..... 106

Figura 33– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato. 107

Figura 34– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura..... 110

Figura 35 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato..... 111

Figura 36 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura..... 113

Figura 37– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol;

Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato..... 114

Figura 38 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. 117

Figura 39 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato. 118

Figura 40– Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. 120

Figura 41 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato..... 121

Gráfico 1 – Curva analítica de amônio para dosagem de L-asparaginase e Amônio. Equação da reta: $y = 0,0155x$; $R^2 = 0,9848$ 138

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Meios utilizados no estudo do efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão de L-asparaginase | 62 |
| Tabela 2 – Meios utilizados para análise da germinação e do crescimento apical das linhagens de fungos filamentosos selecionados..... | 63 |
| Tabela 3 – Composição dos meios utilizados para produção de L-asparaginase..... | 65 |
| Tabela 4 – Crescimento radial de linhagens de fungos em meio Czapek-Dox. | 71 |
| Tabela 5 - Características macro e micromorfológicas de <i>Penicillium sp.</i> T6.2..... | 75 |
| Tabela 6 - Características macro e micromorfológicas do <i>Penicillium sp.</i> T8.3..... | 77 |
| Tabela 7 - Características Macromorfológicas do <i>Fusarium sp.</i> T22.2 | 79 |
| Tabela 8 - Características Micromorfológicas do <i>Penicillium sp.</i> T6.2..... | 81 |
| Tabela 9 - Características Micromorfológicas do <i>Penicillium sp.</i> T8.3..... | 83 |
| Tabela 10 - Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Penicillium sp.</i> T6.2 cultivados em meio sólido..... | 105 |
| Tabela 11- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Penicillium sp.</i> T6.2 cultivados em meio líquido sob agitação. | 108 |
| Tabela 12 - Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Penicillium sp.</i> T8.3 cultivados em meio sólido..... | 112 |
| Tabela 13- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Penicillium sp.</i> T8.3 cultivados em meio líquido. | 115 |
| Tabela 14- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Fusarium sp.</i> T22.2 cultivados em meio sólido. | 119 |
| Tabela 15- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do <i>Fusarium sp.</i> T22.2 cultivados em meio líquido..... | 122 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 16 – Atividade de L-asparaginase após 30 min de tempo reacional incubado a 37°C. Linhagens cultivadas em meio líquido estacionário a 30°C, após 24h, 48h e 72h. Valores expressos em U/ml/min. Linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 cultivadas nos Meios B1, B2 e B3 | 123 |
| Tabela 17– Concentração de amônio no sobrenadante. Linhagens cultivadas em meio líquido estacionário a 30°C, após 24h, 48h e 72h. Valores expressos em µg/ml. Linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 em cultivadas nos Meios B1, B2 e B3. | 125 |
| Tabela 18– Dados da curva analítica de dosagem de L-asparaginase. ABS: leituras de absorvância realizadas; \bar{X} : média; e SD: desvio padrão das leituras. | 137 |
| Tabela A 1 – Meio Czapek-Dox | 139 |
| Tabela A 2 – Meio Czapek-Dox Modificado..... | 139 |
| Tabela A 3– Meio Czapek Extrato de Levedura – CYA | 140 |
| Tabela A 4– Meio Czapek Extrato de Levedura – MEA..... | 140 |
| Tabela A 5 – Meio Czapek Extrato de Malte – ME2..... | 140 |
| Tabela A 6 – Meio Yeast Extract Sucrose – YES..... | 141 |
| Tabela A 7 – Caseína Sacarose – CAS (Equivalente ao meio CREA)..... | 141 |
| Tabela A 8 – Solução de L-Asparagina 0,04M..... | 142 |
| Tabela A 9 – Solução Tampão Tris-HCl (pH7,2) 1M | 142 |
| Tabela A 10 – Solução de Ácido Tricloroacético (TCA) 1,5M..... | 142 |
| Tabela A 11– Solução Tampão Tris-HCl 1M pH7,2 | 142 |
| Tabela A 12 – Reagente de Ehrlich | 142 |
| Tabela A 13 – Solução Tampão Fosfato de Potássio (pH=7,2) 0,05M | 143 |
| Tabela A 14 – Solução Tampão Fosfato de Sódio (pH=6) 100mM | 143 |
| Tabela A 15 – Solução de p-formaldeído 1% | 143 |

| | |
|---|-----|
| Tabela A 16 – Solução padrão de Sulfato de Amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄) 0,5mg/ml..... | 143 |
| Tabela A 17 – Solução de EDTA 0,001M..... | 143 |
| Tabela A 18 – Solução de Tris-HCl 1M pH 8,0..... | 143 |
| Tabela A 19 – Solução de EDTA 0,5M pH 8,0..... | 144 |
| Tabela A 20 – Solução de TE pH 8,0 (10mM de Tris-HCl; 1mM EDTA)..... | 144 |
| Tabela A 21 – Solução de Extração Genômica | 144 |
| | |
| Quadro 1 – Análise comparativa das características morfológicas de <i>Penicillium sp.</i> T6.2, <i>Penicillium roqueforti</i> | 93 |
| Quadro 2 – Análise comparativa das características morfológicas de <i>Penicillium sp.</i> T8.3, <i>Penicillium commune</i> e <i>Penicillium crustosum</i> | 94 |
| Quadro 3 – Análise comparativa das características morfológicas de <i>Fusarium sp.</i> T22.2, <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> | 96 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|---------------|---|---|
| Apud | – | citado por |
| BLAST | – | Ferramenta básica de alinhamento local de sequências (<i>Basic local alignment search tool</i>) |
| CREA | – | MeioCreatina Sacarose (<i>Creatine sucrose</i>) |
| CYA | – | Meio Czapek Extrato de Levedura (<i>Czapek Yeast Autolysate</i>) |
| DNA | – | Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| EC | – | Classificação das enzimas (<i>Enzyme commission</i>) |
| <i>et al.</i> | – | E outros (<i>et alii</i>) |
| FASTA | – | Linguagem de um conjunto de programas para pesquisa em bases de dados de nucleotídeos e proteínas |
| h. | – | Hora |
| IAE | – | Índice de atividade enzimática |
| INCA | – | Instituto Nacional do Câncer |
| ITS | – | Região espaçadora interna transcrita do rRNA (<i>Nuclear ribosomal Internall Transcribed Spacer region</i>) |
| ME2 | – | Ágar extrato de malte 2% (<i>Malt extract 2%</i>) |
| MEA | – | Ágar extrato de malte, fórmula Blakeslee (<i>Blakeslee Malt Extract Autolysate</i>) |
| MEV | – | Microscópio Eletrônico de Varredura |
| MERCOSUL | – | Mercado Comum do Sul |
| Min. | – | Minuto |
| NCBI | – | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NCM | – | Nomenclatura Comum do Mercosul |
| PCR | – | Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| pH | – | Potencial de Hidrogênio |
| RNA | – | Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>) |
| rpm | – | Rotações por minuto |
| rRNA | – | Ácido ribonucleico ribossômico (<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>) |
| SD | – | Desvio padrão (<i>Standard deviation</i>) |
| Trip. | – | Triplicata |
| UI | – | Unidade Internacional |
| YAG | – | Meio Extrato de levedura Glicose (<i>Yeast agar glucose</i>) |
| YES | – | Meio Extrato de levedura Sacarose (<i>Yeast extract sucrose</i>) |

LISTA DE SIMBOLOS

| | | |
|---------------------------|---|--|
| % | – | Porcentagem |
| α | – | Alfa |
| β | – | Beta |
| UI | – | Unidade Internacional |
| U/mL | – | Unidades por mililitro |
| U/g | – | Unidades por grama |
| °C | – | Graus Celsius |
| $\mu\text{M/g}$ | – | Micromolar por grama |
| US\$ | – | Dólar dos Estados Unidos (<i>United States Dollar</i>) |
| R\$ | – | Reais |
| atm. | – | Pressão atmosférica |
| mL | – | Mililitro |
| cm | – | Centímetro |
| mm^2 | – | Milímetro quadrado |
| mm^3 | – | Milímetro cúbico |
| v/v | – | Volume por volume |
| M | – | Molar |
| g | – | unidade de massa (grama) |
| G | – | Unidade de força centrífuga |
| μL | – | Microlitro |
| p/v | – | Peso por Volume |
| g/L | – | Gramas por Litro |
| nm | – | Nanômetros |
| mM | – | Milimolar |
| mg/mL | – | Miligramas por mililitro |
| mg | – | Miligramas |
| $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | – | Microgramas por microlitro |
| $\mu\text{g}/\text{mL}$ | – | Microgramas por mililitro |
| U/mL.min | – | Unidade por mililitro por minuto |
| μm | – | Micrômetro |
| μg | – | Microgramas |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 33 |
| 2.1 Biodiversidade e recursos biotecnológicos..... | 33 |
| 2.2 <i>Fungos e biotecnologia</i> | 33 |
| 2.2.1 <i>Classificação e identificação dos fungos</i> | 34 |
| 2.2.2 <i>Gênero Penicillium</i> | 37 |
| 2.2.3 <i>Gênero Fusarium</i> | 37 |
| 2.2.4 <i>Crescimento apical</i> | 39 |
| 2.3 Saúde e biotecnologia..... | 39 |
| 2.3.1 <i>Leucemias</i> | 40 |
| 2.3.2 <i>L-asparaginase</i> | 42 |
| 3 OBJETIVOS | 53 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 53 |
| 3.2 Objetivos específicos | 53 |
| 4 METODOLOGIA..... | 55 |
| 4.1 Linhagens e manutenção | 55 |
| 4.2 Triagem de fungos produtores de L-asparaginase | 56 |
| 4.3 Análise morfológica e molecular das linhagens fúngicas produtoras de L-asparaginase | 58 |
| 4.3.2 <i>Teste de Ehrlich</i> | 59 |
| 4.3.3 <i>Morfologia microscópica por microcultivo</i> | 59 |
| 4.3.4 <i>Morfologia microscópica por microscopia eletrônica de varredura</i> | 60 |
| 4.3.5 <i>Análise molecular</i> | 60 |
| 4.4 Perfil de crescimento das linhagens selecionadas em função da fonte de nitrogênio | 61 |
| 4.5 Efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão da atividade de L-asparaginase | 62 |

| | |
|---|------------|
| 4.6 Germinação e crescimento apical das linhagens selecionadas | 62 |
| 4.6.1 <i>Germinação e crescimento apical com utilização de membranas de nitrocelulose</i> | 63 |
| 4.6.2 <i>Germinação e crescimento apical em meio líquido</i> | 64 |
| 4.7 Produção e determinação da atividade de L-asparaginase em meio líquido. 64 | |
| 4.7.1 <i>Determinação da atividade de L-asparaginase.....</i> | 65 |
| 4.7.2 <i>Cálculo da atividade de L-asparaginase</i> | 66 |
| 4.7.3 <i>Determinação da concentração de amônio.....</i> | 68 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 69 |
| 5.1 Triagem de fungos produtores de L-asparaginase..... | 69 |
| 5.2 Análise morfológica e molecular das linhagens fúngicas produtoras de L- asparaginase..... | 74 |
| 5.2.1 <i>Morfologia macroscópica.....</i> | 74 |
| 5.2.2 <i>Teste de Ehrlich.....</i> | 81 |
| 5.2.3 <i>Morfologia microscópica por microcultivo.....</i> | 81 |
| 5.2.4 <i>Morfologia microscópica por microscopia eletrônica de varredura</i> | 84 |
| 5.2.5 <i>Análise molecular</i> | 88 |
| 5.2.6 <i>Análises comparativas entre as linhagens em estudo e espécies conhecidas</i> | 92 |
| 5.3 Perfil de crescimento em função da fonte de nitrogênio | 97 |
| 5.4 Efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão da atividade de L-asparaginase..... | 99 |
| 5.5 Germinação e crescimento apical das linhagens selecionadas | 101 |
| 5.5.1 <i>Germinação e Crescimento Apical do <i>Penicillium</i> sp. T6.2.....</i> | 101 |
| 5.5.2 <i>Germinação e Crescimento Apical do <i>Penicillium</i> sp. T8.3.....</i> | 109 |
| 5.5.3 <i>Germinação e Crescimento Apical do <i>Fusarium</i> sp. T22.2.....</i> | 116 |
| 5.6 Dosagem da atividade de L-asparaginase | 123 |
| 5.6.1 <i>Determinação da atividade de L-asparaginase.....</i> | 123 |
| 5.6.2 <i>Determinação da concentração e Amônio</i> | 125 |

| | |
|--|------------|
| 6 CONCLUSÕES..... | 127 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 129 |
| APÊNDICE | 137 |
| ANEXOS | 139 |
| Anexo A – Meios de Cultivo e Soluções | 139 |
| Anexo B – Preparo do Reagente de Nessler (1000ml) | 145 |

1 INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase, ou L-asparagina amido-hidrolase (EC 3.5.1.1) que catalisa a hidrólise de L-asparagina em L-aspartato e amônia, é utilizada como agente quimioterápico no tratamento da Leucemia Linfocítica Aguda (LLA). Esta enzima foi confirmada como o princípio ativo responsável pela atividade antilinfoma observada no soro do porquinho da Índia por Broome (1963). Posteriormente, teve sua capacidade antineoplásica comprovada e é hoje utilizada mundialmente (PIETERS *et al.*, 2011). O mecanismo de atuação dessa enzima se baseia em uma falha metabólica presente nas células leucêmicas, que, sendo incapazes de produzir asparagina, dependem da obtenção deste aminoácido por captação a partir da circulação sanguínea. A administração de L-asparaginase provoca a depleção de L-asparagina e inviabiliza a sua obtenção exógena, resultando na indução de apoptose em células malignas, com baixo comprometimento de células sadias (ANDO *et al.*, 2005).

Diversos estudos reportam a produção de L-asparaginase por vários micro-organismos, bactérias, leveduras, e fungos (JHA *et al.*, 2012; PETERSON; CIEGLER, 1969). As principais marcas de L-asparaginase que estão comercialmente disponíveis têm origem bacteriana, como a Elspar® produzida por *Escherichia coli*. Entretanto, a L-asparaginase produzida por fungos é mais frequentemente uma enzima extracelular, o que a torna uma opção interessante por facilitar o processo de purificação, diminuindo os riscos de hipersensibilidade decorrente da presença de eventuais vestígios de componentes celulares. Em produtos de origem bacteriana, estes riscos podem ser mais frequentes, uma vez que após a lise celular realizada para obtenção da enzima, a purificação torna-se um processo crítico. Além disso, proteínas fúngicas são mais semelhantes às proteínas dos mamíferos, uma vez que são também seres eucariontes, mais próximos evolutivamente, e, por essa razão, é possível que a frequência das reações imunológicas seja menor. Entretanto, atualmente, o processo de obtenção por fontes bacterianas é o meio mais comum e todas as L-asparaginases disponíveis no mercado têm essa origem. As fontes de produção dessa enzima por linhagens fúngicas é ainda pouco explorada.

O interesse pelo desenvolvimento e aprimoramento de novas fontes produtoras de L-asparaginase reacendeu-se após um recente problema de abastecimento no mercado brasileiro, ameaçando o tratamento de centenas de pacientes (FIOCRUZ, 2016). Diante do risco de desabastecimento, a Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica firmou uma parceria com o Ministério da Saúde, para a compra do medicamento a fim de garantir o suprimento aos

pacientes (SOBOPE, 2016a, 2016b). Neste cenário, torna-se urgente e necessário o estudo de micro-organismos produtores desta enzima e das melhores condições de cultivo como caminho para a melhoria da produção, da diminuição dos custos e, sobretudo, para a garantia futura da disponibilidade de obtenção desse medicamento no mercado interno. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo selecionar fungos filamentosos produtores de L-asparaginase, avaliar as melhores condições de produção desta enzima, o efeito da variação da fonte de carbono e da razão carbono-nitrogênio no crescimento vegetativo, o perfil de crescimento de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase em diversas fontes de nitrogênio e formular um meio base para o desenvolvimento do processo produtivo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiversidade e recursos biotecnológicos

A biodiversidade brasileira é observada como uma excelente fonte de recursos naturais e potencialmente de recursos biotecnológicos. Presume-se que há no Brasil uma diversidade, entre plantas, animais e micro-organismos, de aproximadamente um milhão e oitocentas mil espécies, e destas apenas cerca de duzentas mil espécies são registradas. Todas essas espécies estão distribuídas além das zonas costeiras e marinhas, nos seis biomas brasileiros: a Amazônia, o cerrado, a caatinga, a mata atlântica, o pantanal e o pampa, que juntos representam um quinto da biodiversidade mundial (MAPA, 2010). Estima-se que apenas um destes biomas, a mata atlântica brasileira, possui cerca 2% de toda biodiversidade do planeta e constitui um verdadeiro mosaico de ecossistemas e um inumerável grupo de espécimes microbianos (LIMA-PERIM *et al.*, 2016). Além de recursos microbiológicos em grande escala que podem ser encontrados em terra e no mar (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015).

Levantamentos da década de 1990 indicaram que é conhecida apenas uma parcela de 5% de todos os fungos filamentosos, com cerca de 70.000 espécies descritas, um conhecimento ainda muito pouco expressivo, mas que aponta as possibilidades de um fascinante campo de investigação praticamente inexplorado (MANFIO, 2009).

2.2 Fungos e biotecnologia

Organismos eucarióticos apresentam uma enorme diversidade, abrangendo grupos taxonômicos muito distintos, desde seres unicelulares do reino protista aos complexos mamíferos do reino animal. Os animais, as plantas e os fungos representam uma pequena parcela desse domínio dos seres vivos, que é em sua maioria totalmente microscópico (STAJICH *et al.*, 2009).

As membranas intracelulares, as organelas, que distinguem esse grupo e que compartimentalizam funções especializadas são um importante diferencial que permite a realização simultânea de diversas tarefas celulares. Essa setorização permite também otimizar recursos energéticos e possibilitar uma grande variabilidade na obtenção de nutrientes e metabolismo (BURKI, 2014).

Os fungos são organismos eucarióticos, que não realizam fotossíntese, podem ser unicelulares, como as leveduras, ou multicelulares como os cogumelos. Esse grupo de seres vivos apresenta uma grande biodiversidade de espécies, com características muito variadas e modo de nutrição heterotrófico. Constituem micro-organismos com significativa importância clínica, ambiental e biotecnológica (BURKI, 2014; CAVALIER-SMITH, 2004; WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990).

A utilização dos fungos para obtenção de produtos de interesse humano, é uma atividade muito antiga cujos indícios remontam ao início da própria história humana. A fermentação de bebidas alcoólicas já registrada no império egípcio, o fermento empregado na panificação e documentado pelos escritos bíblicos, e o consumo de corpos de frutificação por vários povos em tempos remotos, são alguns dos exemplos de como eram aproveitados os fungos ou suas habilidades em processos biotecnológicos (PAPAGIANNI, 2004).

A utilização dos fungos filamentosos para obtenção de enzimas é uma das áreas com grande destaque biotecnológico, seguida da produção de antibióticos e ácidos orgânicos. Nas últimas décadas houve um grande aumento no número de produtos obtidos por fungos com potencialidade comercial (PAPAGIANNI, 2004).

2.2.1 Classificação e identificação dos fungos

Os sistemas de classificação filogenética reconhecem a existência de três grandes grupos de seres vivos: eubactérias, arqueobactérias e eucariontes. Este sistema dos três domínios se distingue em suas bases moleculares e possuem distinções muito mais significativas que as que separam reinos típicos, como os animais e plantas. Proposto por Carl Woese em 1990, esse sistema é amplamente aceito, e apresenta uma organização dos reinos em domínios, onde o domínio eubactérias é ocupada pelas bactérias, o domínio das arqueobactérias é dividido em três reinos, Euryarchaeota, Crenarchaeota e Nanoarchaeota, e domínio Eucarionte que abrange os reinos Animalia, Plantae, Fungi (CICCARELLI et al., 2006; WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990).

A base desta nova recategorização foram os estudos com menor subunidade do ácido Ribonucleico ribossômico (rRNA), que indicou que os seres vivos possuem essencialmente “três tipos” dessas sequências, semelhanças capazes de agrupar reinos muito distintos. As sequências moleculares revelam mais claramente as relações entre táxons e são portanto um critério de classificação mais confiável que as características fenotípicas,

tornando as classificações taxonômicas cada vez menos relacionadas ao organismo e mais voltadas ao nível molecular, uma tendência observada e aparentemente irreversível (WOESE; KANDLERT; WHEELIS, 1990).

Atualmente a organização da árvore filogenética eucariótica é estruturada no conhecimento molecular, a filogenômica, enquanto no passado era principalmente baseada nas características morfológicas e nutricionais, altamente variáveis e muito mais difíceis de se estabelecerem correlações. A filogenômica, por sua vez, reestruturou a classificação das espécies através do alinhamento de centenas de genes, utilizando principalmente o rRNA. Este marcador apresenta diversas vantagens técnicas como possuir facilidade de amplificação e conter regiões hipervariáveis e regiões conservadas. Nestes estudos ficou ainda mais evidente a grande variabilidade dos seres eucarióticos, que podem apresentar diversas habilidades de interação com o ambiente, diferentes formas de nutrição e uma importante disparidade no tamanho genômico (BURKI, 2014).

O campo de classificação dos seres vivos é bastante discutido e frequentemente reorganizado. Como consequência desse rápido avanço há o surgimento de outras possibilidades de organização dos seres vivos, como o trabalho de Cavalier-Smith, que propôs outra classificação baseada em novos achados moleculares. Neste novo modelo os seres vivos poderiam ser agrupados em dois domínios e seis reinos, sendo no domínio Procariota os reinos Eubacteria e Archaeobacteria, e no domínio Eucariota os reinos Protista, Plantae, Fungi e Animalia (CAVALIER-SMITH, 2004).

Nas clades superiores da coroa desta árvore eucariótica, surgem, quase simultaneamente, grupos distintos como os animais, as plantas e os fungos, cujos marcadores disponíveis, não permitiram uma resolução molecular suficientemente capaz de distinguir claramente seu padrão de ramificação. Diversas hipóteses foram propostas para compreensão da organização desta árvore a partir dos dados disponíveis, chegando-se a organização atual de seis “super grupos”: Opisthokonta, Amoebozoa, Excavata, Archaeplastida, Rhizaria e Chromalveolata (BURKI, 2014).

O “supergrupo” da árvore eucariota Opisthokonta é bastante complexo e reúne os animais (Metazoa), os fungos (Fungi) e alguns protistas (BURKI, 2014). O reino Fungi, pertencente a esse “supergrupo”, contribui ativamente para o equilíbrio biológico do planeta e desempenha diversos papéis essenciais para o bem-estar humano em importantes setores como a indústria, a medicina e também a pesquisa científica (STAJICH *et al.*, 2009).

No reino Fungi, sub-reinos podem ser definidos por algumas distinções morfológicas desde grupos menos complexos com presença de flagelos, até grupos

multicelulares com tecidos diferenciados. Entre estes diversos grupos destaca-se o sub-reino Dikarya, onde se encontram os dois maiores filios: Ascomycota e Basidiomycota. Este sub-reino, que abrange aproximadamente 98% de todos os fungos já descritos, conta com uma importante diferenciação dos fungos inferiores, a presença de núcleos que se separam pela formação de septos e permitem o prolongamento das hifas (STAJICH *et al.*, 2009).

Os filios Ascomycota e Basidiomycota, reúnem as espécies dos chamados fungos superiores, e por sua vez, distinguem-se pela presença de esporo sexual endógeno, o ascósporo no filo Ascomycota, ou esporo sexual exógeno, o basidiósporo no filo Basidiomycota. Existem espécies com a presença de hifas ou leveduras unicelulares que ocorrem em ambos filios, indicando que a distinção destes não pode ser restrita à morfologia (STAJICH *et al.*, 2009).

O maior taxon do sub-reino Dikarya, com aproximados 64% dos fungos conhecidos, o filo Ascomycota sobrevive na natureza como sapróbios, mutualistas e parasitas. Os ascomicetos, como são denominados fungos deste filo, do Sub-filo: Pezizomycotina são os mais numerosos e diversificados deste filo (STAJICH *et al.*, 2009).

As linhagens em estudo neste trabalho são classificadas no filo Ascomycota e Sub-filo: Pezizomycotina, nas seguintes classificações:

As linhagens dos *Penicillium sp.* são classificadas: no Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Sub-filo: Pezizomycotina, Classe: Eurotiomycetes, Sub-classe: Eurotiomycetidae, Ordem: Eurotiales, Família: Trichocomaceae, Gênero: *Penicillium* (FRISVAD; SAMSON, 2004; HOUBRAKEN *et al.*, 2014).

A linhagem do *Fusarium sp* é classificada: no Reino: Fungi, Filo: Ascomycota, Sub-filo: Pezizomycotina, Classe: Sordariomycetes, Sub-classe: Hypocreomycetidae, Ordem: Hypocreales, Família: Nectriaceae, Gênero: *Fusarium* (SEVER *et al.*, 2012; WINDELS, 1991).

O gênero *Fusarium sp* foi anteriormente classificado no antigo filo Deuteromycota, e em decorrência da ausência de reprodução sexual eram denominados fungos imperfeitos, uma a classificação antiga não representava um táxon natural. Esta classificação reposiciona o gênero no Filo Ascomycota (WINDELS, 1991).

2.2.2 Gênero *Penicillium*

Este gênero está amplamente distribuído por todo o planeta, pode ser encontrado no solo, vegetação, no ar e em alimentos. Desempenha importante papel na decomposição de matéria orgânica, e, portanto, estão também em evidencia na produção de várias enzimas. Desde a descoberta o gênero em 1809, já foram descritas mais de 200 espécies. Tendo como significado do nome “escova”, decorrente do formato característico do conidióforo, os fungos do gênero *Penicillium sp.* representam um importante grupo de micro-organismos úteis na indústria de produtos biotecnológicos (FRISVAD; SAMSON, 2004; HOUBRAKEN *et al.*, 2014; VISAGIE *et al.*, 2014).

Entre as enzimas de interesse comercial produzidas por espécies de *Penicillium sp.*, encontram-se lipases, pectinases, xilanases. Um outro exemplo são as dextranases produzidas por *Penicillium funiculosum*, empregadas na indústria do açúcar para retirada do dextrânio do caldo de cana. Há também registros da produção de lignina, peroxidase e lacase por *Penicillium commune*. O gênero *Fusarium* também é um representante de fungo produtor de lipase (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Fungos filamentosos do gênero *Penicillium sp.* são frequentemente encontrados em alimentos nas regiões de clima temperado. Apesar de largamente presentes no ambiente, especialmente em alimentos e silagens, algumas espécies estão relacionadas a doenças em animais, em decorrência da produção de micotoxinas, como por exemplo a neurotoxina roquefortine C, produzida por *Penicillium roqueforti* (BOYSEN; JACOBSSON; SCHNÜRER, 2000). Outro exemplo é o *Penicillium commune*, que é amplamente encontrado na deterioração de queijos, e significa uma preocupação para a indústria produtora desse alimento (HANSEN; LUND; CARSTENSEN, 2003).

2.2.3 Gênero *Fusarium*

Este gênero apresenta grande diversidade de espécies amplamente distribuídas por todos os continentes em ambientes naturais e artificiais, considerados ubíquos, podem ser encontradas em plantas, solo e água (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

Algumas espécies de *Fusarium* também podem ser de interesse clínico por serem capazes de produzir esteroides e serem capazes de interferir no ciclo sexual de outros fungos (MIROCHA; CHRISTENSEN; NELSON, 1968) .

Diversas espécies deste gênero são conhecidas por sua patogenicidade em plantas, que comprometem diversos cultivos agrícolas como a cana (LIN *et al.*, 2014), trigo, arroz e banana, sendo inclusive apontado como a principal causa de colapso econômico em algumas comunidades rurais (STAJICH *et al.*, 2009). A fitopatogenicidade de algumas espécies do gênero, provoca anualmente graves prejuízos, na ordem de bilhões de dólares, ao segmento agrônomo decorrente das perdas por adoecimento dos cultivos provocados por esses microorganismos. Também é preocupante a presença desses fungos em alimentos devido a capacidade de produção de micotoxinas, metabólitos secundários que são biologicamente ativos e que podem ser muito tóxicos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

Em humanos as espécies desse gênero estão associadas a infecções superficiais como ceratites e onicomicoses, que geralmente acometem indivíduos imunocomprometidos (WANG *et al.*, 2011). Entretanto podem ocorrer, ainda que muito menos frequentemente, infecções oportunistas muito graves em indivíduos com imunodeficiência severa, como comprometimento cerebral onde as taxas de mortalidade alcançam 100% dos casos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

Assim, as doenças causadas por estes fungos, denominadas fusarioses, podem se manifestar desde infecções superficiais a casos de infecções disseminadas fatais. Felizmente os quadros mais frequentes são as ceratites, causadas por inoculação traumática ou por contato direto, sendo geralmente tratáveis por antibioticoterapia. As ceratites acontecem predominantemente em regiões de clima quente, relatadas em países como a Índia, China e Brasil, sendo o uso indiscriminado de antibióticos uma provável condição predisponente. Alguns tipos de fusarioses também foram associados a quadros de neutropenia prolongada causada por tratamentos contra neoplasias sanguíneas, há também indícios que o uso crônico de corticoides, cirurgias, transplantes e terapias citotóxicas altamente agressivas, sejam alguns importantes fatores de risco para o surgimento destas fusarioses. Estas espécies são causadoras de infecções em plantas, o acometimento de humanos raramente está associado a indivíduos hígidos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

2.2.4 Crescimento apical

A produção de enzimas por fungos filamentosos é uma atividade de alto valor comercial, o que significa a grande demanda por um processo produtivo eficiente nas condições mais simples possíveis. Atingir essas condições é uma tarefa de muitas dimensões pois a produção da enzima de interesse depende não somente das características particulares do micro-organismo, mas também da natureza do inoculo e das condições químicas e físicas do cultivo (PAPAGIANNI, 2004).

A fim de alcançar as melhores taxas de produção cada fungo pode exigir diferentes condições, a apresentar diferente comportamento em seu padrão de crescimento. Fatores físicos, como temperatura, pH e forças mecânicas, e fatores químicos, como a composição dos meios de cultivo precisam ser controlados. As condições fisiológicas e o estágio de desenvolvimento também sinalizam o comportamento das linhagens e fornecem condições apropriadas para a produção de metabólitos secundários de utilidade biotecnológica (PAPAGIANNI, 2004).

A germinação dos conídios e o crescimento apical depende de todos estes fatores mencionados. A germinação é resultante da utilização dos recursos e condições de crescimento a que o fungo filamentoso foi submetido. A extensão do tubo germinativo e o tempo de formação das hifas nesse processo é resultado que aponta as melhores condições de cultivo e produção enzimática (PAPAGIANNI, 2004).

2.3 Saúde e biotecnologia

A biotecnologia é hoje um dos grandes ramos de desenvolvimento científico, que contempla diversas aplicações nas áreas de alimentos, medicamentos, diagnóstico e de saúde. A obtenção e melhoramento dos recursos naturais, plantas e micro-organismos é tão antiga quanto o ser humano e igualmente presente em seu cotidiano. O conhecimento das informações genéticas, primeiramente desenvolvido por Gregor Mendel, permitiu uma intervenção cada vez mais precisa e produtiva nas características que possibilitassem melhor aproveitamento dos recursos (MAPA, 2010).

Além da diversidade de micro-organismos há um enorme potencial de metabólitos secundários, com propriedades úteis em biotecnologia. Diversos medicamentos antimicrobianos e antitumorais, por exemplo, são metabólitos de micro-organismos (CHARLOP-POWERS *et al.*, 2015).

O bioma brasileiro cerrado foi inclusive cenário de investigação para outro trabalho que buscou também fungos produtores de L-asparaginase (ALMEIDA, 2015). A relevância da busca de micro-organismos com aplicações biotecnológicas e a riqueza dos recursos naturais reiteram a importância deste trabalho.

2.3.1 Leucemias

As células de organismos multicelulares convivem num refinado acordo de cooperação mútua, que inclui comunicação, função especializada e morte celular programada. Esse ciclo visa a manutenção da vida e bem-estar do organismo e conta com diversos mecanismos de regulação. A maior parte desses mecanismos é bem-sucedido, e entre as 10^{14} células presentes no corpo humano, muitos milhares de alterações moleculares, mutações, são corrigidos ao longo da vida. Entretanto, devido a uma complexa combinação de fatores, ambientais e moleculares, alguma dessas mutações pode levar à proliferação desordenada de uma única célula. Alterações de função e tamanho dessas células, bem como a proliferação descontrolada e a capacidade de invadir tecidos adjacentes descrevem o câncer, igualmente denominado como neoplasia maligna (ALBERTS *et al.*, 2010).

A leucemia é uma neoplasia caracterizada pelo aumento no número de leucócitos anormais na circulação periférica. Trata-se de uma doença que abrange diversos subtipos, que acometem populações distintas e de prognóstico muito variável. As causas de instalação dessa patologia podem não ser plenamente conhecidas, mas podem ser principalmente atribuídas às mutações que ocorrem em células mielógenas ou linfógenas na medula óssea. Quando a linhagem celular comprometida é de origem linfoide, acontecem as leucemias linfocíticas e quando de origem mieloide, as leucemias mielocíticas (GUYTON; HALL, 2011).

As células mais indiferenciadas estão associadas a um curso agudo da doença, de agravamento rápido decorrente da característica dessas células não serem funcionais, enquanto nos casos em que há células mais diferenciadas o processo é crônico, com o curso mais longo da doença (GUYTON; HALL, 2011).

Alguns quadros de leucemia, mieloides e linfoides, apresentam uma alteração cromossômica típica, denominada cromossomo Filadélfia. Essa anomalia ocorre quando há a

translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, gerando um sítio de quebra e nova ligação dos fragmentos idênticos entre as células afetadas de um mesmo paciente e muito similar entre pacientes diferentes. A translocação é ainda responsável pela formação de um gene híbrido que codifica uma proteína promotora de proliferação celular (ALBERTS *et al.*, 2010).

Células cancerosas são classificadas como geneticamente instáveis, o que significa que acumulam alterações genéticas em taxas anormais. Essas alterações comprometem as funções e o metabolismo normal tornando o comportamento celular muitas vezes imprevisível. Muitas dessas neoplasias se originam quando esta instabilidade ocorre em células tronco. As células tronco cancerosas têm grande habilidade de diferenciação e renovação, o que fornece o tempo suficiente para acumular as mutações e outras condições para gerar grau de malignidade, como é o caso de algumas leucemias de linfócitos B (ALBERTS *et al.*, 2010).

Como o microambiente das neoplasias é essencial para o suporte dessas células malignas, uma abordagem terapêutica é privar essas células das condições ideais de desenvolvimento (ALBERTS *et al.*, 2010). No caso das leucemias, em que o microambiente é a própria circulação sanguínea, a retirada de nutrientes é uma abordagem delicada, a não ser que as células saudáveis não sejam atingidas pela intervenção terapêutica. Esta abordagem mais seletiva é o princípio que tornou a L-asparaginase um fármaco amplamente utilizado.

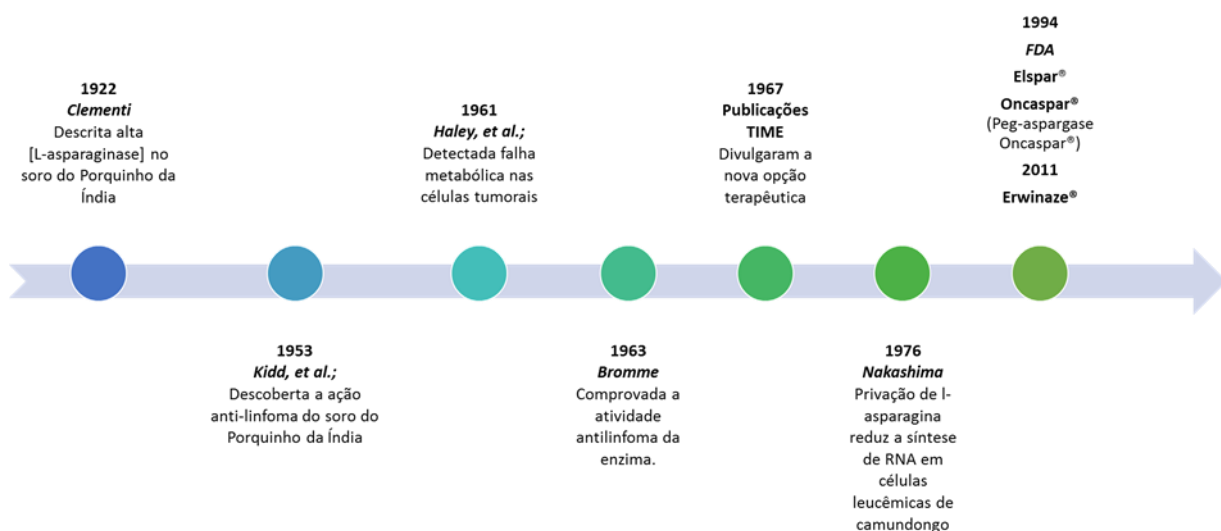
O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), órgão do Ministério da Saúde, em sua mais recente publicação, apresentou as estimativas de incidência de câncer em 2016. A estimativa para o Brasil é de 600 mil novos casos de câncer no biênio 2016-2017. Destes, as leucemias (C91 a C95), na Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde – décima revisão (CID 10) – são estimadas em 5.540 casos novos em homens e 4.530 em mulheres. Esta previsão corresponde a um risco de 5,63 casos a cada 100 mil homens e 4,38 para cada 100 mil mulheres. Entre os cânceres infanto-juvenis as leucemias correspondem a 25-30% dos casos, sendo no período de 2000 a 2005 estimada uma sobrevida em cinco anos de 70%, para os casos de leucemias infantis (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2015).

2.3.2 L-asparaginase

A utilização de enzimas como medicamentos remonta ao final do século XIX, quando enzimas pancreáticas começaram a ser utilizadas como agentes terapêuticos no tratamento de doenças gastrointestinais. Entre as enzimas com potencial terapêutico, está incluída a L-asparaginase, com atividade antineoplásica evidenciada na década de 50 e aplicada posteriormente para estudo em modelos vivos, como cães (OLD *et al.*, 1967). Kidd e colaboradores demonstraram em 1953, através 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. O estudo apontou também que o constituinte ativo do soro, com atividade contra o linfoma, tinha origem proteica (KIDD, 1953).

Evidências de que o constituinte proteico ativo no soro era a enzima L-asparaginase foram apresentadas por Broome (1963). A hipótese de que a atividade poderia ser decorrente da ação da enzima L-asparaginase foi proposta com base nos relatos de Clementi em 1922 (Apud. BROOME, 1963a) que verificou alta concentração dessa enzima no soro do porquinho da Índia (FIG. 1). Em seu primeiro trabalho, Broome comparou a atividade antilinfoma da enzima e do soro, demonstrando também, em seu segundo experimento, que o soro sem L-asparaginase não foi capaz de inibir o crescimento das células malignas (BROOME, 1963a, 1963b). As evidências a partir dos resultados obtidos corroboraram para a continuidade dos estudos em humanos e inclusive para uso veterinário. Alguns pacientes começaram a responder positivamente ao tratamento, o que ampliou ainda mais o avanço nos estudos dessa terapia (HILL *et al.*, 1969).

Figura 1 - História da descoberta da atividade antineoplásica da enzima L-asparaginase



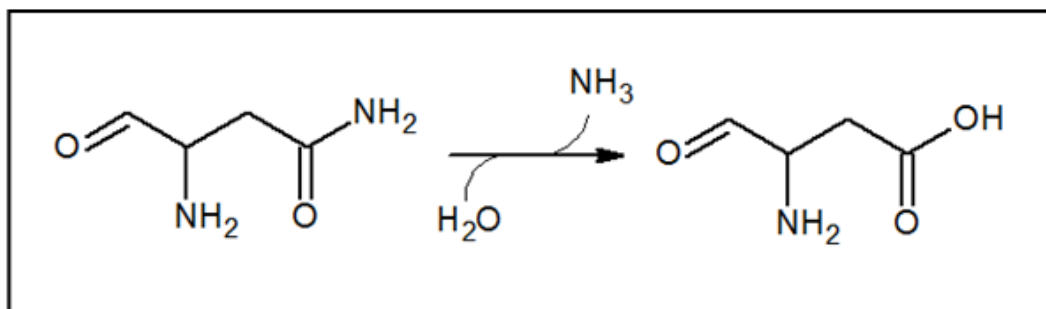
Em abril de 1967, foi noticiado o novo tratamento contra algumas formas de câncer em um editorial da conhecida revista Time, publicado como uma matéria intitulada “*Secret from the Guinea Pigs*” na seção *Health & Medicine*. O anúncio, realizado durante as comemorações de aniversário de um empresário e grande investidor em pesquisas sobre o câncer, que havia perdido o único neto vítima de leucemia, declarava que um menino de 9 anos, portador de leucemia linfoblástica aguda (LLA), havia atingido a remissão da doença. A criança que apresentava um quadro avançado foi tratada com a enzima purificada obtida da bactéria *Escherichia coli*. A remissão após o uso de L-asparaginase foi declarada pelo empresário como a descoberta da cura da leucemia. A notícia foi apresentada ao grande público e gerou grande expectativa quanto aos novos rumos dos tratamentos disponíveis contra o câncer, especialmente a LLA, provocando grande repercussão (TIME, 1967a). Uma matéria posterior propôs mais cautela na recepção da novidade, discutindo que o câncer não é apenas uma doença, mas um conjunto muito heterogêneo, sendo necessário bom senso para compreender que mesmo diante dos resultados, ainda que positivos, falar em cura era muito precoce (TIME, 1967b). Em 26 de junho do mesmo ano, 1967, a criança mencionada chegou a óbito por complicações de uma pneumonia, decorrente de uma recidiva do quadro de LLA. Claramente, a cura ainda não havia sido alcançada. Atribuiu-se a complicação do paciente a um quadro alérgico à enzima. A equipe médica ressaltou que a enzima demonstrou ser uma poderosa arma, ainda que não representasse diretamente a cura (TIME, 1967c). Ao fim do mesmo ano, outro editorial foi publicado, visando responder dúvidas relacionadas a esse novo tratamento. Naquele momento, as questões principais eram: 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, 1967d).

Haley, Fischer e Welch descreveram o papel da L-asparagina, um aminoácido não essencial para seres humanos, como um dos principais responsáveis pelo crescimento de linfoblastos e pela reprodução dessas células. Demonstraram que a exigência desse aminoácido por algumas células tumorais indicava uma incapacidade sintética dessas células ou um papel não usual no metabolismo. Esse achado apontou para um significado bioquímico que poderia ser aproveitado na quimioterapia (HALEY; FISCHER; WELCH, 1961). Esses dados foram reforçados anos depois quando verificou-se que a síntese de RNA era prejudicada quando havia uma privação de L-asparagina, em células leucêmicas de camundongo (NAKASHIMA *et al.*, 1976).

A enzima L-asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, EC 3.5.1.1) catalisa a reação de hidrólise da L-asparagina em L-aspartato e também recebe outras denominações: L-asparaginase II, colaspase, leunase, crasnitin, alpha-L-asparaginase (KEGG: KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES, 2016), ASNase, L-ASNase, ASPG e EcAII e EC-2 (BRENDA - THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION SYSTEM, 2016). É uma enzima tetramérica capaz de desaminar a asparagina e a glutamina (JHA *et al.*, 2012). Entre as marcas comerciais dos medicamentos cujo princípio ativo é a L-asparaginase, se incluem: Elspar®, Erwinase®, Oncaspar®, Kidrolase®, Crisantaspase®, Onconase®. A Elspar®, marca amplamente utilizada, é produzida pela Merck & Co© e tem como princípio ativo a L-asparaginase obtida de *E. coli*. A Erwinase® é produzida pelos laboratórios da Jazz Pharmaceuticals© e inclui em sua formulação a enzima obtida da bactéria *Erwinia chrysanthemi* (*Erwinia carotovora*). Oncaspar® (ou Peg-asparaginase Oncaspar®) inclui a L-asparaginase de *E. coli* conjugada com polietilenoglicol, produzida pela Sigma Tau©.

A L-asparaginase é uma enzima que promove a hidrólise do aminoácido L-asparagina em amônia e L-aspartato. (FIG. 2).

Figura 2 - Reação catalisada pela enzima L-asparaginase

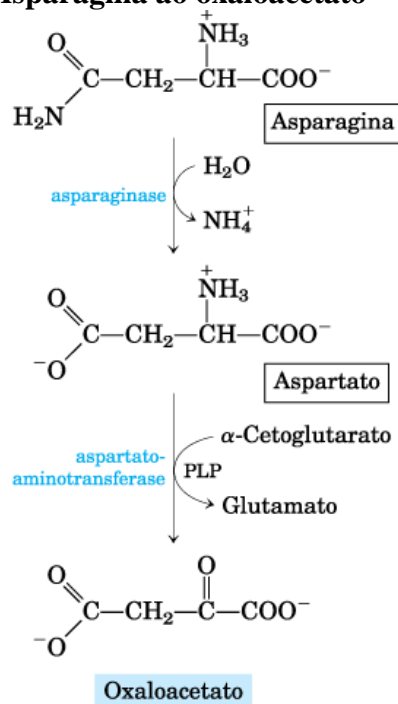


Hidrólise de L-asparagina: A enzima L-asparaginase catalisa a hidrólise do grupamento amida do aminoácido L-asparagina em amônia e L-aspartato.

O mecanismo de ação deste agente antineoplásico é a depleção do aminoácido asparagina, um aminoácido de cadeia lateral polar não-carregada, cuja polaridade se deve ao grupamento amida. A asparagina é um aminoácido hidrofílico, presente na circulação sanguínea. Em condições fisiológicas, durante o catabolismo de aminoácidos, a ação da L-asparaginase permite a hidrólise da asparagina em aspartato, através de um ataque nucleofílico do sítio catalítico da enzima ao grupamento amida do aminoácido. O aspartato sofre então uma transaminação com o α -cetoglutarato, formando glutamato e oxaloacetato como mostrado na Figura 3. O oxaloacetato é um dos intermediários do ciclo do ácido cítrico,

via na qual pode ser catabolizado (ALBERTS *et al.*, 2010; COONEY; HANDSCHUMACHER, 1970; GESTO *et al.*, 2013; NELSON; COX, 2011).

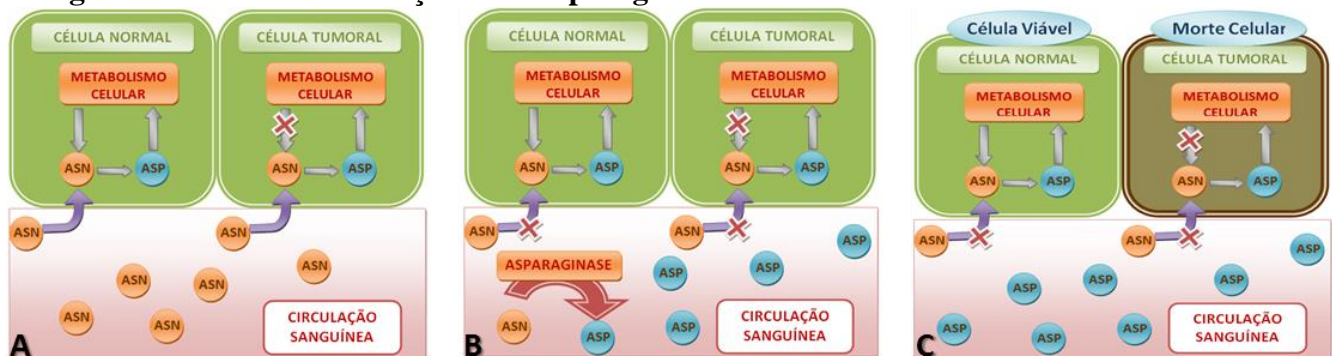
Figura 3 - Via Catabólica da Asparagina ao oxaloacetato



Fonte: NELSON; COX, 2011

A L-asparaginase inibe a replicação de células T tumorais, uma vez que essas apresentam uma demanda aumentada para asparagina, decorrente da intensa utilização na síntese proteica. Estas células requerem grandes quantidades da asparagina para possibilitar o crescimento aberrante e desordenado (JHA *et al.*, 2012).

As células leucêmicas apresentam deficiência na síntese de asparagina. Enquanto as células normais possuem a enzima asparagina sintetase em plena atividade e, conseqüentemente, são capazes de compensar a falta na circulação, as células tumorais, em razão de sua deficiência nessa enzima, têm prejudicada a síntese de novas proteínas e demais funções celulares. Dessa maneira as células leucêmicas são dependentes da asparagina extracelular, obtida da circulação sanguínea. Quando a enzima é administrada, os níveis desse aminoácido caem sensivelmente na corrente sanguínea e o resultado dessa intervenção no metabolismo é um baixo comprometimento das células sadias e a morte celular do tecido tumoral. (FIG. 4)

Figura 4 - Mecanismo de Ação da L-asparaginase.

Fonte: Própria autora. (A) Antes do Tratamento; (B) Durante o Tratamento; (C) Após o Tratamento.

A L-asparaginase também tem uso na indústria de alimentos, onde é empregada no controle da formação de acrilamida, uma substância potencialmente cancerígena e neurotóxica. A asparagina é um dos precursores para a formação da acrilamida e a L-asparaginase é efetiva em reduzir a formação desse composto (ANESE *et al.*, 2011; CIESAROVÁ; KISS; BOEGL, 2006). Estudos demonstraram uma redução de 96% na formação de acrilamida em batatas fritas tratadas com L-asparaginase, o que demonstra outra importante aplicação dessa enzima (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013).

Além dessa utilização pela indústria de alimentos, a L-asparaginase é utilizada mundialmente como agente terapêutico para o tratamento de doenças malignas do sistema linfóide (PIETERS *et al.*, 2011). É um importante insumo farmacêutico obtido por rota biotecnológica, através da produção industrial bacteriana. Essa enzima é produzida por diversas espécies, incluindo humanos, ainda que em concentrações muito baixas. Enzimas de origem bacteriana ou fúngica podem impactar os custos de produção. A produção da enzima exógena dos fungos pode diminuir os custos das operações unitárias, ao passo que a enzima bacteriana, por ser intracelular, requer etapas adicionais de lise e purificação. Entretanto, até o momento, as marcas comerciais dos medicamentos que incluem L-asparaginase contêm apenas enzimas de *E. coli*, em sua forma nativa ou modificada por ligação a polietileno-glicol, ou a enzima produzida por *E. chrysantemi*.

A produção de L-asparaginase por diversos micro-organismos já foi descrita, incluindo fungos, bactérias e até microalgas. Fungos dos gêneros *Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, *Phoma sp.* e *Penicillium sp.*, encontrados em plantas com propriedades contra o câncer, foram reportados como produtores da enzima (CHOW; TING, 2015). A microalga *Chlorella vulgaris* também demonstrou capacidade de produção enzimática

(EBRAHIMINEZHAD *et al.*, 2014). Foi ainda relatada a produção por actinomicetos marinhos (DHEVAGI; POORANI, 2006), pelas bactérias *Serratia marcescens* (STERN; PHILLIPS; GOTTLIEB, 1976) e *Pectobacterium carotovorum* (KUMAR; DASU; PAKSHIRAJAN, 2010) além de diversas outras fontes (JHA *et al.*, 2012).

Existem dois tipos da enzima: A L-asparaginase I e a L-asparaginase II, sendo que a primeira é intracelular, enquanto que a enzima do tipo II é de localização periplasmática. Estudos realizados por Cedar e Schwartz, demonstraram que a L-asparaginase do tipo II é que possui atividade contra o câncer (CEDAR; SCHWARTZ, 1968; GESTO *et al.*, 2013; JHA *et al.*, 2012).

As reações adversas relatadas na terapia com L-asparaginase estão associadas ao desenvolvimento de anticorpos (ANDO *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2012; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007) e à depleção de glutamina, que ocorre por similaridade deste aminoácido com a L-asparagina, sendo este último o substrato principal (NOVAK; PHILLIPS, 1973; SAMUDIO; KONOPLEVA, 2013).

Em 2013, diversos canais de notícias tornaram público que o Laboratório Bagó do Brasil Ltda., distribuidor do medicamento Elspar® fabricado pela indústria MERCK & Co. (MERCK & CO, 2015), informou que o medicamento deixaria de ser produzido e por esse motivo o fornecimento ao Ministério da Saúde seria descontinuado (FIOCRUZ, 2016; INCA, 2015; SOBOPE, 2016a, 2016b).

Por tratar-se de medicamento sem opções terapêuticas para a substituição e pela relevância dos resultados de sua aplicação no tratamento dos pacientes, a discussão ganhou maior destaque. Revistas especializadas também se manifestaram como a REDE CANCER, publicação do INCA, em artigos que abordam o delicado tema das causas de interrupção de produção de medicamentos. Os artigos discutem a motivação comercial nos bastidores do desabastecimento de alguns medicamentos, fato significativo que atinge o fornecimento de diversos medicamentos não apenas no Brasil, mas em todo o mundo (INCA, 2012, 2015).

A Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename), que em sua edição de 2010, trazia a L-asparaginase como um dos medicamentos em seu escopo, retirou este medicamento em suas edições de 2013 e 2014. A retirada desse medicamento dessa importante publicação significa maior distanciamento do fornecimento e produção nacional, uma vez que o propósito da Rename é padronizar, além da prescrição, o abastecimento do sortimento mínimo de medicamentos no âmbito do SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2014a, 2015). A retirada também foi contrária à lista de medicamentos essenciais proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que inclui a L-asparaginase em sua 19ª edição

(WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2013). Esta remoção da Rename reduz também, significativamente, o incentivo para medidas de desenvolvimento de tecnologias de produção nacional de fármacos, constantes nessa referência, que tem como premissa garantir o fornecimento regular de insumos de saúde ao mercado interno, conforme preconizado na Política Nacional de Medicamentos do MS (SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE, 2000).

A notícia de descontinuidade da produção resultou na formação de um grupo de trabalho sobre medicamentos oncológicos em risco de desabastecimento, que contava com a participação da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE), órgãos do Ministério da Saúde e outras sociedades médicas como a Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (ABHH), a Associação da Medula Óssea (AMEO), Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE), a Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), e a Confederação Nacional de Instituições de Apoio e Assistência à Criança e Adolescente com Câncer (CONIACC), que apresentaram uma lista de ações emergenciais para atender a demanda sem prejuízo aos pacientes (SOBOPE, 2016a). Como resultado, o Ministério da Saúde (MS) adquiriu 52,3 mil frascos do medicamento Elspar®, com custo equivalente a R\$ 17,6 milhões, aquisição suficiente para suprir a demanda por um ano, ressaltando a preocupação de ser firmada uma parceria para implementar a produção nacional até o ano de 2015 (FIOCRUZ, 2016; SOBOPE, 2016b).

A L-asparaginase ainda é comprada pelo Ministério da Saúde e repassada a hospitais credenciados para a prestação de serviços de oncologia no SUS, através dos serviços de Assistência Farmacêutica das secretarias estaduais de saúde. As diretrizes para a terapia de LLA no Brasil sofreram alterações, as recomendações passaram a apresentar o quimioterápico Mesilato de Imatinibe como uma opção terapêutica entre os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia, enquanto a situação de abastecimento de L-asparaginase não se regularizar no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014b).

Em consulta ao portal da transparência do governo federal, quando questionado sobre os hospitais que dispunham do medicamento, obtivemos como resposta:

“A L-asparaginase está sendo comprada com excepcionalidade pelo Ministério da Saúde e dispensada aos hospitais habilitados em oncologia no SUS pela Assistência Farmacêutica das secretarias estaduais de saúde. Por consequência, as questões referentes à L-asparaginase estão aos cuidados do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF) do Ministério da Saúde”
(Portal da Transparência - Resposta solicitada inserida no e-SIC).

O desabastecimento do medicamento no Brasil levou ao aumento nas importações deste medicamento para garantir o suprimento da demanda dos pacientes em tratamento. Entretanto, o custo de importação do produto final é altamente elevado, superando facilmente os recursos que seriam necessários para iniciar a produção nacional.

A importação e comércio de todos os produtos é realizada no país conforme classificação internacional o Sistema Harmonizado de Designação e Codificação de Mercadorias, ou Sistema Harmonizado (SH), que categoriza os produtos por códigos conforme sua origem e utilização. Entre os países que compõe o Mercado Comum do Sul (MERCOSUL), é adotado desde janeiro de 1995 o código denominado Nomenclatura Comum do Mercosul (NCM), construído com base no Sistema SH. A criação do bloco econômico do MERCOSUL motivou a padronização dos códigos que entrou em vigor junto de sua criação, sendo finalmente estabelecidos após o DECRETO Nº 1.767, de 28 de dezembro de 1995 e atualizada no DECRETO Nº 2.376, de 12 de novembro de 1997.

O código NCM comumente utilizado em notas fiscais e outros documentos, é empregado como identificador destes produtos nos documentos que registram transações comerciais e arrecadação de tributos. O NCM que substituiu a Nomenclatura Brasileira de Mercadorias (NBM) é organizado em oito dígitos distribuídos entre capítulo, posição, subposição 1, subposição 2, item e eventualmente subitem, onde todos os produtos comercializados são categorizados (ANVISA, 2016).

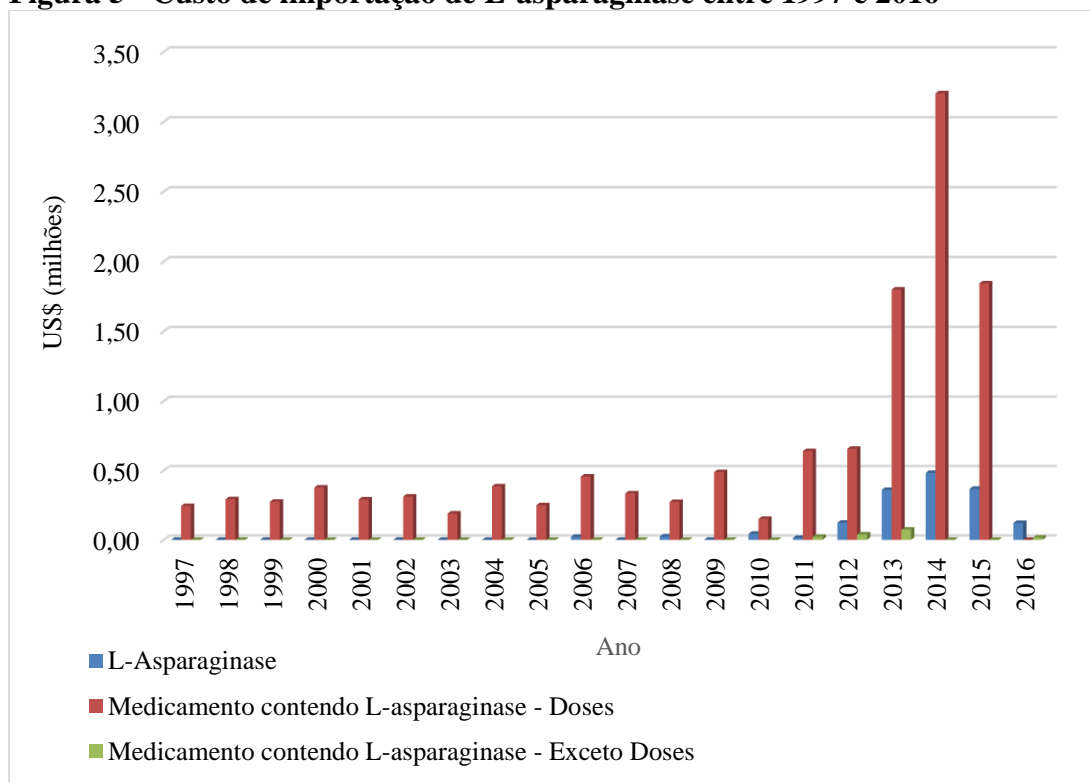
Visando perceber o impacto das importações deste medicamento decorrente da ameaça de desabastecimento, realizou-se uma busca dos códigos NCM relacionados às apresentações disponíveis de L-asparaginase.

Os dados apresentados foram obtidos da plataforma ALICEWEB, uma ferramenta do Ministério do Desenvolvimento do Governo Federal que reúne informações sobre o comércio exterior. É uma plataforma on-line disponível no endereço <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>. Os dados relativos ao custo de importação da L-asparaginase no período de 1997 a 2016 são mostrados na Figura 5, sendo que apenas dados parciais estavam disponíveis para o ano corrente na data da realização da consulta.

Os produtos pesquisados na base de dados ALICEWEB, conforme o código padronizado NCM, foram: 3507.90.32 - L-ASPARAGINASE (referente a enzima isolada mas não corresponde a uma preparação farmacológica); 3004.90.12 - Medicamento contendo l-asparaginase, em doses (isto é, medicamento é adquirido em apresentação fracionável em doses terapêuticas, como em ampolas e frasco-ampolas, por exemplo); e 3003.90.22 -

MED.C/ENZIMAS,S/VITAM.(L-ASPARAGINASE) ou exceto doses (que corresponde a preparações medicamentosas com apresentações não fracionadas).

Figura 5 - Custo de importação de L-asparaginase entre 1997 e 2016



Fonte: Base de dados ALICE WEB do Ministério do desenvolvimento do Governo Federal.

A dependência do mercado externo para a aquisição de L-asparaginase foi noticiada por diversos veículos, no contexto da ameaça de desabastecimento de medicamentos. Uma consequência do desabastecimento de medicamentos é o aumento da judicialização da saúde, em que ameaçados os tratamentos, recorre-se à justiça para fornecimento por parte do governo. (GOMES; AMADOR, 2015). Em consulta ao portal da transparência do governo federal sobre a existência de ações judiciais relacionadas ao medicamento L-asparaginase, obteve-se resposta de pelo menos onze processos, registrados no Sistema da Defensoria Pública da União (SISDPU). Conforme veiculado na ocasião em que o desabastecimento foi noticiado, o Ministério da Saúde informou que o início da produção da enzima estava previsto para 2015 (FIOCRUZ, 2016; SOBOPE, 2016b). Entretanto, quando questionada a situação do fornecimento e produção de L-asparaginase no Brasil através do portal da transparência, obtivemos a seguinte resposta, em que se preserva o nome do servidor:

“Não existe Parceria de Desenvolvimento Produtivo de Farmanguinhos para L-asparaginase ou peg-L-asparaginase. Há uma expectativa de firmar uma parceria, mas ainda bem distante. O medicamento é muito importante para o Brasil já que não há produtor nacional, agravado pelo fato de que também não há produto registrado no Brasil. Trata-se do único tratamento para leucemia linfóide aguda que atinge principalmente crianças. Sem registro, o Brasil vem importando o medicamento na modalidade "emergencial" sem os devidos cuidados regulatórios. A demanda é subestimada já que a necessidade do medicamento nem sempre é computada e as crianças morrem antes do acesso ao medicamento. Atenciosamente, [...] Analista de Gestão em Saúde - CDT-Farmanguinhos.”
(Portal da Transparência - Resposta solicitada inserida no e-SIC.).

Através da resposta acima transcrita, está evidente a continuidade da dependência do país quanto à importação deste medicamento tão importante, com impacto direto sobre a saúde da população e para a vida de tantos pacientes. Diante desse contexto preocupante, reacendeu-se o interesse na busca por novos produtores de L-asparaginase, que pudessem balizar o desenvolvimento do processo produtivo no mercado interno. Esse não é um desafio pequeno, dado que a produção de tecnologia enzimática em geral é muito deficitária no Brasil, que tradicionalmente importa enzimas para variadas aplicações, desde as diagnósticas, terapêuticas até as de uso industrial amplo como amilases.

Este trabalho foi desenvolvido como parte dos esforços empenhados por pesquisadores brasileiros para a busca de uma solução para o desenvolvimento de tecnologia enzimática no país, tendo como foco a busca de produtores de L-asparaginase entre os fungos, bem como a triagem das condições base para desenvolvimento de um meio de produção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar linhagens de fungos filamentosos produtores da enzima L-asparaginase, estudar os aspectos fisiológicos e de crescimento das linhagens selecionadas e desenvolver as condições de cultivo que favoreçam a produção desta enzima.

3.2 Objetivos específicos

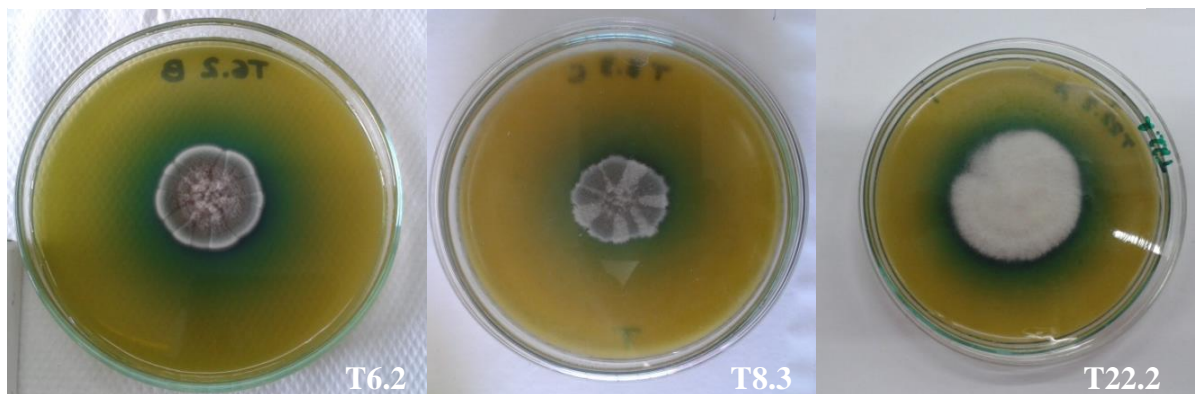
- a) Selecionar linhagens de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase entre as linhagens disponíveis no acervo do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM);
- b) Investigar o efeito fisiológico de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio para a expressão de atividade de L-asparaginase pelas linhagens selecionadas;
- c) Analisar o crescimento apical das linhagens selecionadas sob o cultivo em diferentes condições;
- d) Formular um meio base para a produção de L-asparaginase em cultivo submerso;
- e) Produzir L-asparaginase em cultivo submerso através do meio base desenvolvido.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens e manutenção

Os micro-organismos, objeto de estudo neste trabalho, foram obtidos a partir do acervo de culturas de fungos filamentosos do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Após a fase de triagem, foram selecionadas linhagens fúngicas que demonstraram serem os melhores produtores da enzima L-asparaginase. Estes fungos foram submetidos às fases seguintes do estudo. As linhagens selecionadas (FIG. 6) pertencem aos gêneros *Penicillium sp.* (T6.2 e T8.3) e *Fusarium sp.* (T22.2) e foram isolados por Silva (2011).

Figura 6- Fungos filamentosos selecionados para a produção de L-asparaginase.



Fonte: Própria autora. O cultivo foi efetuado em ágar Czapek Dox modificado. São mostradas as culturas das linhagens *Penicillium sp.* T6.2, *Penicillium sp.* T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2 após 7 dias de cultivo a 30°C.

As linhagens selecionadas foram mantidas em meio sólido Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004) e cultivadas por repique contínuo, com incubação por 7 dias a 30°C. Para manutenção do estoque de linhagens, blocos de micélio também foram imersos em água destilada estéril e mantidos a 4°C. Todos os meios utilizados foram preparados conforme composição indicada no (ANEXO A) e foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos a 1 atm.

4.2 Triagem de fungos produtores de L-asparaginase

A partir de culturas estoque de fungos pertencentes ao acervo do laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), foi realizada a seleção de fungos em duas etapas que consistiram: na adaptação e crescimento dos micro-organismos em meio Czapek-Dox e posterior triagem de produção de L-asparaginase por metodologia descrita por Mahajan (2013).

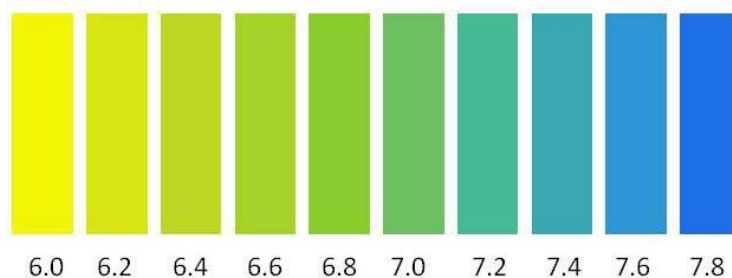
A primeira etapa de seleção consistiu na avaliação da adaptação e do crescimento de 51 linhagens de fungos filamentosos do banco de linhagens em meio de cultivo empregado na triagem de produção de L-asparaginase. Estes micro-organismos foram repicados em tubos de ensaio contendo meio ágar Czapek-Dox inclinado (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997). Após sete dias de incubação a 30°C, observou-se o crescimento e a morfologia macroscópica das colônias, por meio da medida do diâmetro das colônias. Os fungos que apresentaram um bom crescimento (colônia maior que metade da superfície do meio em tubo inclinado) foram selecionados para a etapa de triagem de produtores de L-asparaginase (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; MAHAJAN *et al.*, 2013).

A triagem da produção de L-asparaginase pelas linhagens com maior crescimento foi efetuada segundo o princípio bioquímico baseado na hidrólise do substrato L-asparagina incorporado ao meio de cultivo, com consequente liberação de aspartato e amônia. A alcalinização do meio resultante da formação de amônia foi observada através da formação de um halo azul de viragem do indicador azul de bromotimol ao redor da colônia (MAHAJAN *et al.*, 2013). A coloração desse indicador é amarela em meio ácido e azul em meio básico, com intervalo de transição de pH 6,0 a 7,6. Em pH neutro, a coloração intermediária é uma graduação de tons de verde (FIG. 7).

A triagem em meio sólido foi efetuada utilizando-se dois inóculos diferentes: suspensão de esporos – coletados de colônias cultivadas por 7 dias a 30°C em meio Czapek-Dox (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997) em placas de Petri de 60 x 15 mm – cuja concentração foi padronizada (50 esporos/ 10 µL) e discos de micélio maduro de 6 mm de diâmetro – coletados a partir de colônias cultivadas nessas mesmas condições. Os esporos ou discos de micélio foram transferidos para o centro de placas de Petri de 90 x 15 mm contendo ágar Czapek-Dox formulado segundo descrito na literatura (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; MAHAJAN *et al.*, 2013). No meio de triagem foram incorporados glicerol, L-asparagina e o indicador azul de bromotimol (ANEXO A). Em culturas inoculadas com 50 esporos, a expressão de atividade de L-asparaginase foi avaliada após 12h e, em seguida, em

intervalos de 24 h até 168 h, pela determinação do diâmetro da colônia e do halo de hidrólise do substrato, indicado pela coloração azul. O Índice de Atividade Enzimática (IAE) foi calculado pela razão entre o diâmetro do halo de coloração azul e o diâmetro da colônia.

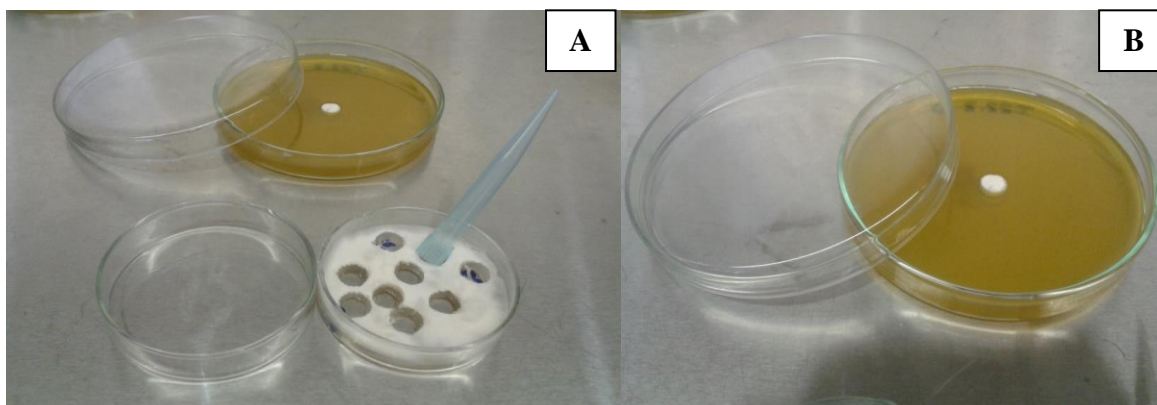
Figura 7 – Faixa de Viragem do indicador de pH Azul de Bromotimol.



Fonte: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2011. Amarelo= forma protonada, azul= forma desprotonada.

Os fungos que apresentaram melhores valores de IAE na triagem conduzida em culturas iniciadas com esporos foram também submetidos à triagem conduzida em culturas inoculadas com discos maduros de micélio. Os discos de 6 mm de diâmetro foram coletados assepticamente com ponteiros plásticos de 1000 μ L a partir de colônias maduras – cultivadas como acima descrito – e transferidos para o centro das placas contendo o meio de triagem. Os discos de micélio foram encaixados em espaço do mesmo diâmetro previamente preparado no interior do meio (FIG. 8). As culturas de triagem foram preparadas com cinco replicatas, que foram incubadas a 30°C para análise da expressão de atividade enzimática e determinação do IAE após 12, 24 e 48 h.

Figura 8 – Metodologia de obtenção e inóculo de disco micelial empregado na triagem de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase.



Fonte: Própria autora. Na figura é mostrada uma colônia de *Fusarium sp.* T22.2 (A) e a transferência de disco de micélio (B) coletado de colônia madura cultivada em ágar Czapek-Dox por 7 dias a 30°C.

Os IAE foram calculados e as curvas de expressão foram construídas sob a forma de gráficos com auxílio do programa Excel® (Microsoft®) para fins de comparação do potencial produtor das linhagens avaliadas quando inoculadas sob a forma de esporos e de micélio maduro. Após comparação, as linhagens selecionadas foram utilizadas para as etapas seguintes do estudo.

4.3 Análise morfológica e molecular das linhagens fúngicas produtoras de L-asparaginase

Foram realizadas análises morfológicas macro e microscópicas, bem como análise molecular das linhagens selecionadas. As fotografias e micrografias foram tratadas no programa ImageJ® para mensuração e aplicação das escalas de tamanho (RASBAND, 2016).

4.3.1 Morfologia macroscópica

A análise da morfologia macroscópica, cor, textura, tamanho e forma, foi realizada segundo metodologia proposta por Frisvad e Samsom (2004). Para tanto, foram utilizados os meios: Czapek extrato de levedura (CYA, Czapek yeast autolysate), Meio extrato de levedura sacarose (YES, yeast extract sucrose), o meio caseína sacarose (CAS) (utilizado em substituição ao meio creatina sacarose, CREA) e o meio de extrato de malte de Blakeslee (MEA, Blakeslee malt extract autolysate). Os meios utilizados neste estudo estão descritos no anexo A (FRISVAD; SAMSON, 2004; HOUBRAKEN *et al.*, 2014).

As linhagens foram cultivadas no meio CYA por sete dias, em três diferentes condições: 25°C, 30°C e 37°C. A incubação a 25°C foi realizada no escuro, conforme preconizado pelo método. Após esse período de incubação foram avaliados os aspectos morfológicos como a forma, o tamanho, a cor do anverso e reverso, textura e bordas das colônias e intensidade de esporulação. Os meios YES e CAS, foram incubados por 7 dias a 25°C, e o meio MEA por 7 dias a 30°C. Para o inóculo, foi transferida uma suspensão densa de conídios. Com auxílio de uma agulha bacteriológica de platina, uma quantidade de esporos foi delicadamente removida da colônia de manutenção e inoculada em três pontos no meio sólido. Os pontos foram aplicados com uma distância de aproximadamente 3 cm entre eles, em placas de Petri de 90 x 15 mm.

4.3.2 Teste de Ehrlich

O teste de Ehrlich foi realizado a partir de colônias cultivadas no meio CYA, a 25°C por sete dias. Foram removidos fragmentos de aproximadamente 1 cm² a partir da borda da colônia madura. Sobre esse fragmento foi depositada uma tira de papel de filtro, previamente embebida com reativo de Ehrlich. Após observação por 2 a 6 minutos, a presença de um halo violeta indica a produção de ácido ciclopiazônico ou alcaloides. Reações após 7 minutos são consideradas fracas e após 10 minutos o anel violeta tende a desaparecer (FRISVAD; SAMSON, 2004; HOUBRAKEN *et al.*, 2014; VISAGIE *et al.*, 2014).

4.3.3 Morfologia microscópica por microcultivo

O aspecto morfológico microscópico foi realizado por meio da técnica de microcultivo (RIDDELL, 1950). Os microcultivos foram preparados em placas de Petri de 110 x 20 mm, sistemas contendo um suporte de bastão de vidro, uma lâmina para microscopia sobre o suporte e um chumaço de algodão. Foram preparados blocos de meio extrato de malte 20% (ME2), cuja composição está descrita no Anexo A, para o cultivo de cada uma das linhagens. Tubos de ensaio estéreis foram utilizados para a remoção de blocos regulares. Os blocos foram colocados sobre lâmina para microscopia estéril. O repique foi realizado em quatro pontos do bloco, com o auxílio de agulha bacteriológica de platina. Imediatamente após o inóculo da suspensão densa de esporos, o bloco de ágar inoculado foi coberto com lamínula, também estéril. O algodão foi umidificado com água destilada estéril e o sistema foi novamente umidificado pelo menos duas vezes a cada 24 h, para evitar o ressecamento do meio de cultura. As placas contendo esse sistema foram incubadas a 30°C em estufa durante 48 h ou 7 dias, quando foi retirada a lamínula para análise das estruturas morfológicas aderidas. A amostra foi depositada sobre uma gota de ácido láctico vertida em lâmina para microscopia, que, em seguida foi vedada com esmalte. Para cada tempo de análise foram feitas lâminas em duplicatas.

As estruturas foram analisadas sob microscopia ótica, nos aumentos de 100x, 200x e 400x. As imagens foram registradas por meio do programa informatizado MIPro® através da interface de um dispositivo de câmera conectado à lente objetiva e ao computador por sistema USB.

4.3.4 Morfologia microscópica por microscopia eletrônica de varredura

O estudo da morfologia das linhagens de fungos filamentosos selecionadas como produtoras de atividade de L-asparaginase também foi realizado pela obtenção de imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Neste estudo, os fungos foram cultivados por sete dias em meio Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004), em estufa a 30°C. A metodologia empregada foi adaptada de Castro e Martinelli (CASTRO, 2002; MARTINELLI; SANTOS, 2010). As colônias formadas foram submersas em uma solução de p-formaldeído 1%, por 6 h. Após esta etapa de fixação, a solução foi removida e a colônia foi lavada cuidadosamente por 10 vezes com uma solução tampão de Fosfato de Potássio (pH 7,2) 0,05 M. Após as lavagens, foram cortados blocos de micélio e uma camada muito fina de meio. Estes blocos foram colocados em dessecador por 2 horas. Após secas, as amostras foram fixadas ao suporte “porta amostra” por meio de uma fita adesiva dupla face metalizada. As imagens foram obtidas no MEV, modelo TM 3000 Tabletop Microscope (Hitachi HTA Inc., EUA), nos aumentos de 1000X e 5000X.

4.3.5 Análise molecular

A extração de DNA para a análise molecular foi realizada conforme metodologia adaptada da literatura (SAMBROOK; GREEN, 2012). As linhagens foram cultivadas em meio de manutenção por 7 dias, de onde foi obtida uma suspensão densa de esporos. Esta suspensão foi inoculada em meio líquido Czapek-Dox, por 72 h em estufa a 30°C, sob agitação de 150 rpm. Após este tempo de crescimento, e antes da formação de esporos e pigmentos, os meios foram filtrados a vácuo, com sistema de filtração estéril, para concentração dos *pellets* de biomassa. A biomassa concentrada, foi depositada em microtubos do tipo Eppendorf® e congelada por pelo menos duas horas a -80°C para posterior liofilização durante 24 h. A cerca de 0,1g de micélio liofilizado adicionou-se 1 mL de solução de extração genômica (ANEXO A). Os microtubos foram aquecidos a 68°C por 10 min e centrifugados por 5 min a 13.000g. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo e foram adicionados 100 µL de acetato de potássio 5 M, pH 4,8. Essa solução foi misturada cuidadosamente por inversão e colocada em banho de gelo por 10 min. Em seguida, cada amostra foi novamente centrifugada a 13.000g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo microtubo. Ao sobrenadante foi adicionado um volume de álcool 96% em proporção de 2,5 vezes o volume de sobrenadante obtido. Após precipitação do DNA, foi realizada nova

centrifugação a 13.000g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e cada precipitado de DNA foi lavado duas vezes com álcool 70%. O precipitado de DNA foi seco à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µL de solução Tris-EDTA (TE) (ANEXO A). A qualidade da preparação de DNA foi avaliada após eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com brometo de etídio, a fim de verificar a integridade das bandas.

O DNA genômico de cada linhagem foi utilizado como molde para a Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR) a fim de amplificar a região espaçadora interna transcrita dos genes de RNA ribossômico (*Internal Transcribed Spacer region*, ITS). Para a amplificação foram utilizados os *primers* universais ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') conforme descrito por White (1990). As reações de amplificação e a determinação da sequência das regiões amplificadas foram realizadas pela Macrogen© USA (www.macrogen.com). As sequências produzidas foram analisadas utilizando a ferramenta básica de alinhamento local de sequências (*Basic local alignment search tool*, BLAST) para recuperação e comparação com sequências similares depositadas no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e do *European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI, 2016).

4.4 Perfil de crescimento das linhagens selecionadas em função da fonte de nitrogênio

A caracterização do perfil de utilização de nitrogênio pelas três linhagens de fungos filamentosos foi realizada em meio sólido Czapek-Dox modificado (GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; MAHAJAN *et al.*, 2013) o qual foi suplementado com glicerol a uma concentração de 5 g/L (fonte de carbono) variando-se os substratos nitrogenados: ureia, glutamina, glutamato, asparagina, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônio em razão carbono/nitrogênio igual a um. A partir de colônias cultivadas por sete dias em meio Czapek, foi preparado por diluição em câmara de Neubauer, um inóculo de 50 esporos suspensos em 10 µL de água destilada previamente esterilizada. O inóculo foi depositado no centro de cada placa de meio sólido para a análise da utilização de fontes de nitrogênio. As culturas foram incubadas a 30° C. O diâmetro do crescimento da colônia foi mensurado após 12 h e, em seguida, a cada 24 h, totalizando 168 h de incubação. O crescimento radial em função do tempo foi utilizado para a construção dos gráficos das curvas de crescimento de cada linhagem em função da fonte de nitrogênio.

4.5 Efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão da atividade de L-asparaginase

Após caracterização da capacidade de assimilar variadas fontes de nitrogênio, os fungos selecionados para a produção de L-asparaginase foram cultivados em diferentes condições para avaliar o efeito da fonte de carbono (glicerol ou glicose) e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão da atividade de L-asparaginase. Para a análise foi utilizado o meio Czapek-Dox suplementado com glicerol ou glicose como fonte de carbono e L-asparagina como substrato nitrogenado indutor da atividade de L-asparaginase, variando-se a razão carbono nitrogênio (TAB. 1). O indicador azul de bromotimol foi adicionado na concentração de 0,007%. Os oito meios resultantes da combinação de fontes de carbono e L-asparagina em diferentes proporções foram inoculados com 50 conídios/ 10 μ L (coletados de colônias cultivadas por sete dias em Czapek-Dox a 30°C). As culturas foram preparadas em triplicata para cada linhagem selecionada e incubadas a 30° C durante 168 h para determinação do diâmetro das colônias, do halo de produção de L-asparaginase e do índice de atividade.

Tabela 1 - Meios utilizados no estudo do efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão de L-asparaginase

| Meio de cultura | Razão Carbono/Nitrogênio | Fonte de Carbono e Concentração | Concentração da fonte de Nitrogênio |
|-----------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Meio 1 | C/N: 1 | Glicerol 5g/L | ASN 5g/L |
| Meio 2 | C/N: 1 | Glicerol 2g/L | ASN 2g/L |
| Meio 3 | C/N: 5 | Glicerol 25g/L | ASN 5g/L |
| Meio 4 | C/N: 5 | Glicerol 2g/L | ASN 0,4g/L |
| Meio 5 | C/N: 1 | Glicose 5g/L | ASN 5g/L |
| Meio 6 | C/N: 1 | Glicose 2g/L | ASN 2g/L |
| Meio 7 | C/N: 5 | Glicose 25g/L | ASN 5g/L |
| Meio 8 | C/N: 5 | Glicose 2g/L | ASN 0,4g/L |

Fonte: Própria autora. Os meios foram vertidos em placas de Petri de 90 x 15 mm.

4.6 Germinação e crescimento apical das linhagens selecionadas

Os estudos de germinação e crescimento apical foram realizados utilizando-se as três linhagens de fungos filamentosos produtoras de L-asparaginase, T6.2, T8.3 e T22.2. Neste estudo foram utilizadas duas abordagens para a análise: em meio sólido, pela deposição

de esporos sobre membranas de nitrocelulose e em meio líquido, pela deposição de esporos sobre lamínulas de vidro. O meio Czapek-Dox foi utilizado como condição base para a análise, tendo sido suplementado com diferentes fontes de nitrogênio e carbono em razão igual a 1, ou na ausência desses substratos. Os meios utilizados para a análise do crescimento apical estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Meios utilizados para análise da germinação e do crescimento apical das linhagens de fungos filamentosos selecionados

| Meio de cultura | Fonte de Carbono e Concentração | Concentração da fonte de Nitrogênio |
|---|------------------------------------|--|
| Meio 1 – Sem FC | - | (NH ₄) ₂ SO ₄ 5g/L |
| Meio 2 – Sem FN | Glicerol 5g/L | - |
| Meio 3 – Sem FC e FN | - | - |
| Meio 4 – ASN | Glicerol 5g/L | ASN 5g/L |
| Meio 5 – GLU + Glicerol | Glicerol 5g/L | GLU 5g/L |
| Meio 6 – (NH ₄) ₂ SO ₄ + Glicerol | Glicerol 5g/L | (NH ₄) ₂ SO ₄ 5g/L |
| Meio 7 – NaNO ₃ + Glicerol | Glicerol 5g/L | NaNO ₃ 5g/L |

FC= Fonte de Carbono; FN= Fonte de Nitrogênio; ASN= L-Asparagina, GLU= Glutamato, (NH₄)₂SO₄= Sulfato de amônio; NaNO₃= Nitrato de sódio

Fonte: Própria autora

4.6.1 Germinação e crescimento apical com utilização de membranas de nitrocelulose

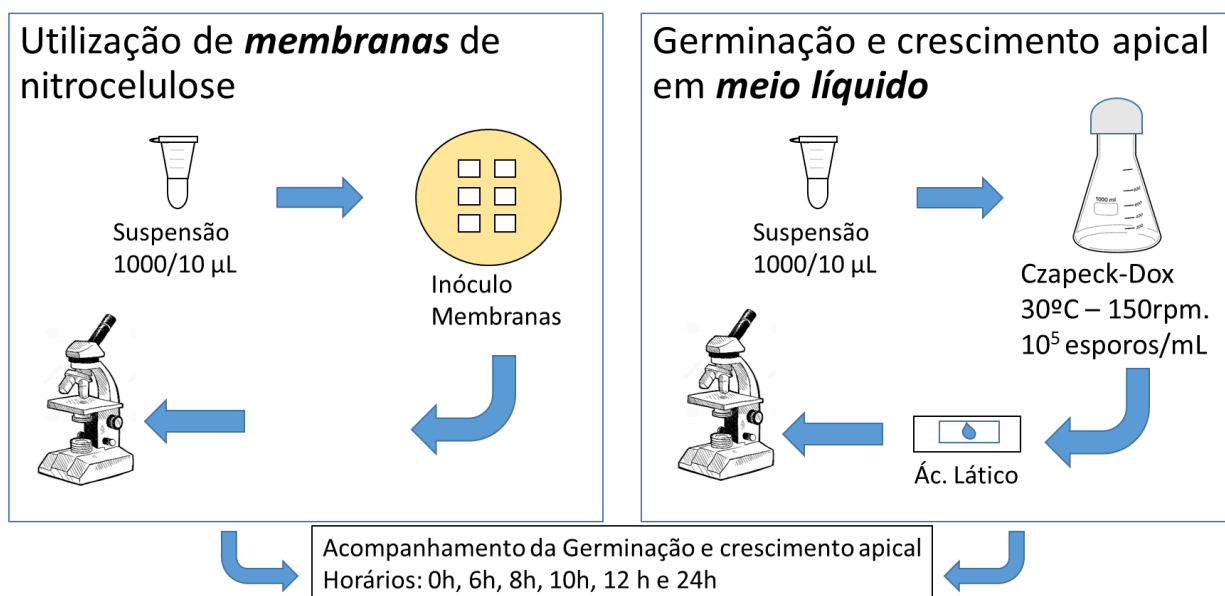
A metodologia empregada para a análise da germinação e crescimento apical em meio sólido foi adaptada do método descrito por Trinci (1969). Sobre a superfície de cada meio descrito na Tabela 2 foram depositadas seis membranas de nitrocelulose com cerca de 1 cm², previamente autoclavadas. Sobre cada uma das membranas, foram depositados 10 µL de suspensão contendo 1000 esporos, preparada por diluição em câmara de Neubauer. Após secagem da suspensão em capela de fluxo laminar, as placas foram incubadas a 30°C. As culturas foram preparadas em triplicata. Amostras das membranas foram removidas assepticamente em intervalos de 2 h no período de 6 a 12 h e após 24 h para análise sob microscopia óptica. Amostras do tempo 0 h também foram removidas como controle. As membranas removidas foram depositadas sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínulas e observadas ao microscópio óptico (Figura XX). Em cada amostra foram contadas 50 estruturas, que foram classificadas como esporos apolares ou polarizados, esporos com tubo germinativo emitido e esporos bi-germinados. As estruturas foram fotografadas e as imagens

obtidas foram registradas por meio do programa informatizado MIPro® através da interface de um dispositivo de câmera conectado à lente objetiva e ao computador por sistema USB. As imagens geradas foram tratadas no programa ImageJ® (RASBAND, 2016), onde foram colocadas as escalas padronizadas por imagens previamente padronizadas realizadas com a câmara de Neubauer, em diferentes aumentos.

4.6.2 Germinação e crescimento apical em meio líquido

Os mesmos sete meios utilizados para análise do crescimento apical em meio sólido foram preparados, excetuando-se a adição de Ágar (TAB. 2). A análise de germinação e do crescimento foi realizada em meio líquido inoculado com 10^5 esporos/ mL. As culturas em duplicata foram incubadas a 30°C sob agitação de 150 rpm (FIG. 9). Após cada tempo de incubação, 10 µL de cultura foram removidos e depositados em lâmina, sobre uma gota de ácido láctico, recobrimo-se com uma lamínula para observação ao microscópio óptico.

Figura 9 - Germinação e Crescimento apical por duas metodologias



Fonte: Própria autora.

4.7 Produção e determinação da atividade de L-asparaginase em meio líquido

A produção da enzima L-asparaginase pelas linhagens selecionadas foi conduzida por processo estacionário em meio líquido, formulado a partir da análise do efeito das fontes

de carbono e das razões carbono/nitrogênio sobre a expressão da atividade enzimática em meio sólido. L-asparagina foi utilizada como fonte de nitrogênio e substrato indutor. A fonte de carbono selecionada para a formulação dos meios foi glicerol, em razões carbono/nitrogênio de 1/1 e 5/5. Também foi utilizado um meio sem suplementação de fonte de carbono. Os meios formulados estão descritos na Tabela 3.

A partir das culturas de 7 dias em Czapek-Dox incubadas a 30°C, foram coletados esporos em água destilada estéril e contados em câmara de Neubauer. A inoculação dos meios foi feita para obtenção de uma concentração final de conídios de 1×10^5 / mL de meio de cultura.

Tabela 3 – Composição dos meios utilizados para produção de L-asparaginase

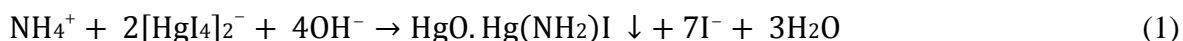
| Meio | Razão | Glicerol | Asparagina |
|----------------|---------------------|----------|------------|
| | Carbono/ Nitrogênio | | |
| Bacelar 1 (B1) | C/N 1/1 | 5g/L | 5g/L |
| Bacelar 2 (B2) | C/N 5/1 | 2g/L | 0,4g/L |
| Bacelar 3 (B3) | - | 5g/L | - |

Fonte: Própria autora.

Após a inoculação da suspensão de conídios, as culturas foram incubadas a 30°C, em processo estacionário. Para determinação da atividade enzimática, foram retiradas alíquotas de 1 mL após 24 h, 48 h e 72 h de incubação. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm, sendo separado o sobrenadante e armazenado até o momento da dosagem em banho de gelo. No sobrenadante foram determinados o pH, a concentração de amônio e a atividade de L-asparaginase.

4.7.1 Determinação da atividade de L-asparaginase

A concentração de amônio e a atividade enzimática foram determinadas utilizando-se o método de Nessler (IMADA *et al.*, 1973) adaptado da literatura (CHOW; TING, 2015; SARQUIS *et al.*, 2004). A reação de Nesslerização ocorre pelo princípio de complexação. O reagente de Nessler é uma solução alcalina de tetraiodomercurato (II) de potássio, que reagindo com o amônio presente na solução em análise, forma um precipitado de coloração amarelo acastanhada, proporcional à concentração de amônio presente no meio, que pode ser quantificado por espectrofotometria em 450 nm (CHOW; TING, 2015) conforme mostrado na equação (1):



Para as dosagens realizadas neste trabalho, o reagente de Nessler foi preparado conforme protocolo descrito no Anexo B (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 1978). Este método tem demonstrado ser reprodutível, porém é necessário que seu preparo seja realizado adequadamente, pois a presença de íons pode afetar significativamente seus resultados. O preparo do reagente, por esse motivo, foi realizado com água destilada submetida a osmose reversa. Há autores que sugerem o uso de EDTA e salicilatos para minimizar o efeito provocado por íons interferentes (GOLTERMAN, 1991). A metodologia é amplamente utilizada devido à simplicidade e eficiência dos resultados obtidos (BASKAR; SAHADEVAN, 2012; GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2009). A curva analítica de amônio preparada com o reagente de Nessler está descrita no Apêndice A.

A determinação da atividade enzimática foi realizada a partir de uma amostra de 100 µL do sobrenadante da cultura, pipetada em microtubos contendo como meio reacional uma mistura de 100 µL de Tampão Tris-HCl, pH 7,2; 200 µL de solução de L-asparagina 0,04 M e 100 µL de água destilada estéril. A mistura foi incubada previamente a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 5 minutos em banho-maria). Após a adição da amostra do sobrenadante, a reação foi incubada por 30 minutos a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em banho maria. Após exatamente 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5 M para desnaturação protéica. Após adição de TCA, foram transferidos 100 µL de mistura para microtubos contendo 300 µL de Reagente de Nessler e 750µL de água destilada. Esta nova bateria foi incubada em banho-maria por 15 minutos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Completado o tempo de reação, a absorbância das amostras foi imediatamente aferida por espectrofotometria em comprimento de onda de 450 nm. O espectrofotômetro foi previamente zerado com um branco de reação, preparado nas mesmas condições, salvo a substituição da amostra por água destilada.

4.7.2 Cálculo da atividade de L-asparaginase

A atividade enzimática (A) pode ser obtida pela velocidade de reação. Essa velocidade reacional é encontrada indiretamente, pela quantificação de seu produto final, onde a quantidade de amônio disponível no meio é proporcional à atividade da enzima (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002). Neste estudo esta atividade foi definida como uma unidade de L-asparaginase, a quantidade desta enzima necessária para produzir 1 µmol de amônio por

minuto nas condições de reação. A concentração de amônio na amostra é proporcional à formação do composto colorido, e a coloração formada é tão intensa quanto a sua concentração. A determinação da absorvância por espectrofotometria gera um dado numérico para essa intensidade de cor. A absorvância é mensurada antes e depois da atuação da enzima, de modo que a diferença de absorvância é proporcional à quantidade de amônio liberada durante a reação como produto da atividade enzimática. A variação na absorvância é mensurada pela diferença entre a absorvância final e a inicial, como representado na equação (2). A diferença de absorvância é utilizada contra uma curva analítica para determinação da concentração de amônio liberado na reação.

$$\Delta\text{ABS} = \text{ABS}_{\text{final (T=30min)}} - \text{ABS}_{\text{inicial (T=0)}} \quad (2)$$

A atividade é determinada pela razão do número de moles de amônio gerados (n) multiplicado pela diluição utilizada da amostra (d) e dividida pelo tempo total de incubação da reação enzimática (t), como representado na equação (3).

$$A = \frac{n \times d}{t} \quad (3)$$

Após a obtenção da curva analítica, construída a partir de soluções de concentração conhecida de amônio $[\text{NH}_3^+]$, obtém-se a equação da reta. O coeficiente angular da reta gerada (a) informa a velocidade em que o aumento de absorvância corresponde a um aumento de amônio, dado pela equação da reta (4)

$$Y = a \cdot x \quad (4)$$

Onde:

Y , absorvância
 a , coeficiente angular da reta
 x , concentração de amônio

A partir da equação da reta é possível obter a concentração de amônio $[\text{NH}_3^+]$ pela combinação das equações 1, 2 e 3, formando a equação (5). A equação 4 é a fórmula utilizada para o cálculo da atividade de L-asparaginase (A) em U/ ml/ min.

$$A = \left[\left(\frac{\Delta ABS}{a} / PM [NH_4^+] \right) \times d / t_{incubação} \right] / vol_{amostra}. \quad (5)$$

Onde: $\Delta ABS = (ABS_{T=30} - ABS_{T=0})$; a = inclinação da curva analítica padrão; $PM [NH_4^+]$ = Peso molecular do íon amônio, para conversão da unidade em mol/ml; d = fator de diluição da amostra; $t_{incubação}$ = tempo de incubação da amostra em minutos; $vol. amostra$ = volume de amostra utilizado.

4.7.3 Determinação da concentração de amônio

A dosagem de amônio presente no meio foi realizada a partir de amostra de 100 μ L do sobrenadante coletado das culturas fúngicas. Esse volume de amostra foi pipetado sobre 300 μ L de Reagente de Nessler e 750 μ L de água destilada. A mistura foi incubada em banho-maria por 15 minutos a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, sendo obtidos os valores de absorvância por espectrofotometria a 450 nm. Estes valores foram substituídos na curva analítica para a obtenção dos valores de concentração correspondentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem de fungos produtores de L-asparaginase

Os 51 fungos repicados em meio sólido e inclinado Czapek-Dox (FRISVAD; SAMSON, 2004), tiveram seu crescimento acompanhado. Após sete dias de incubação as colônias formadas foram avaliadas conforme seu crescimento radial, cujos dados são mostrados na Tabela 4. Foram escolhidos para a próxima etapa de triagem os fungos que apresentaram melhor crescimento: T1.2 – *Penicillium sp.*, T3.1 – *Penicillium sp.*, T7.1 – *A. niger*, T22.2 – *Fusarium sp.*, T26.4 – *Aspergillus niger*, T6.2 – *Penicillium sp.*, T8.3 – *Penicillium sp.*, T9.1 – *Penicillium sp.*, T14.2, T6.1 – *Penicillium sp.* A maioria dos fungos avaliados são linhagens de *Penicillium sp.*, fungos filamentosos pouco descritos na literatura como produtores de L-asparaginase. Por outro lado, entre as linhagens incluídas para seguir a triagem, *A. niger* T7.1 e *A. niger* T26.4 pareceram promissoras, uma vez que há relatos de linhagens dessa espécie serem boas produtoras de L-asparaginase (BASKAR; SAHADEVAN, 2012). Foram incluídas na segunda etapa de triagem outras linhagens de *Aspergillus*: linhagem AN1257 – *Aspergillus tubingensis* – e linhagem N402 – *A. niger*.

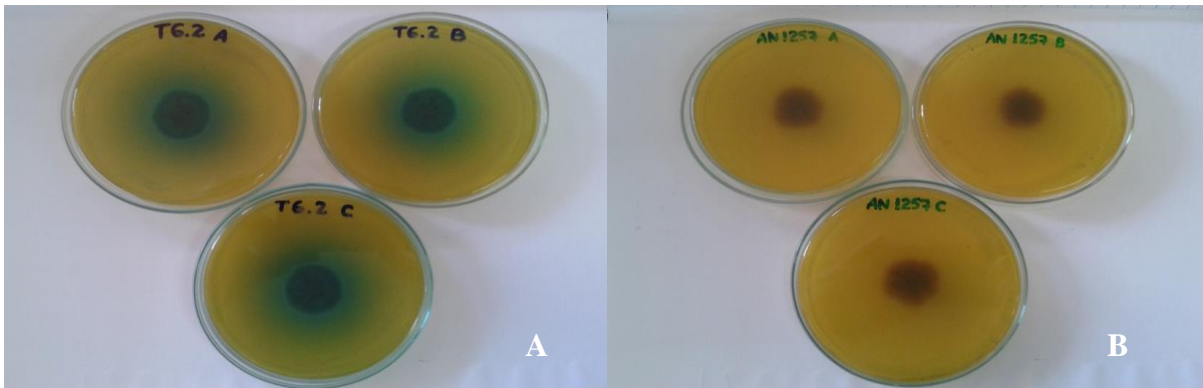
O método de triagem foi efetivo para a seleção das linhagens produtoras, permitindo uma análise direta do potencial de cada linhagem para a expressão de atividade de L-asparaginase e comparação com as linhagens não produtoras (FIG. 7).

As medidas do diâmetro das colônias e diâmetro do halo de hidrólise do substrato foram utilizadas para o cálculo do Índice de Atividade Enzimática (IAE) que, expresso em função do tempo, permite que seja acompanhada a expressão de atividade enzimática ao longo do cultivo para fins de comparação das linhagens avaliadas (FIG. 8). Evidenciou-se o aumento do IAE como resultado da produção de L-asparaginase pelas linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 após 48 h de cultivo em meio inoculado a partir de esporos (FIG. 8). Esses resultados mostram uma rápida expressão da atividade, se considerado que as culturas foram inoculadas a partir de esporos em número bastante reduzido (50). As linhagens T1.2, T9.1 e T6.1 apresentaram IAE positivo após 168 h de incubação quando inoculadas a partir dos seus esporos (FIG. 10).

A importância das etapas de seleção e triagem é evidente, pois garantem a otimização dos recursos e aproveitamento das melhores linhagens disponíveis (COLEN, 2006; ORLANDELLI *et al.*, 2012). Os fungos avaliados, originários de amostras locais,

demonstram o potencial biológico dos micro-organismos e da biodiversidade existente no país (SILVA, 2011).

Figura 10 – Formação do halo de expressão da atividade de L-asparaginase em meio Czapek-Dox modificado



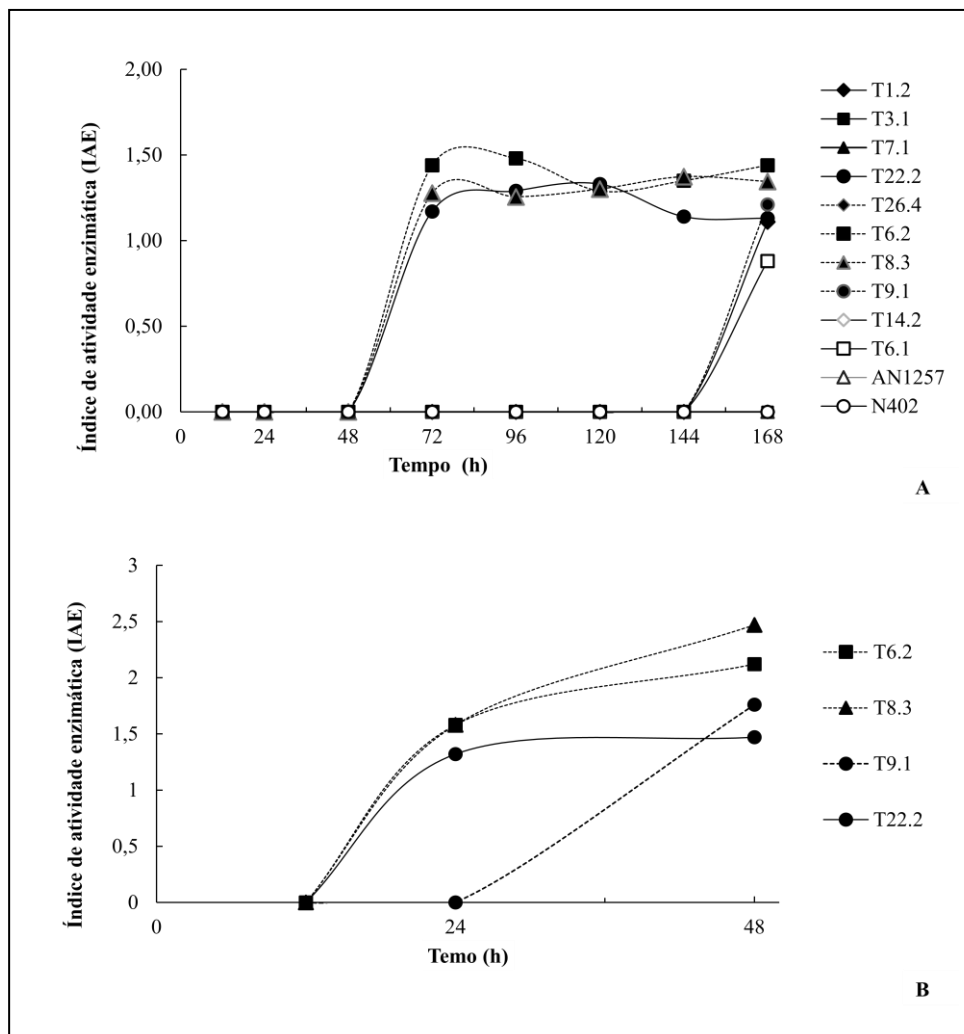
Fonte: Própria autora. A formação do halo azul esverdeado em (A) ocorre pela presença da enzima L-asparaginase, que ao liberar NH_3^+ altera o pH do meio. O indicador Azul de Bromotimol indica a mudança de pH. Em (B) são mostradas linhagens não produtoras de L-asparaginase.

Tabela 4 – Crescimento radial de linhagens de fungos em meio Czapek-Dox.

| Fungo | Espécie | Origem | Crescimento | Selecionado para seguir na Triagem |
|--------|--------------------------|----------------------|-------------|------------------------------------|
| T1.1 | <i>Penicillium sp.</i> | Semente | Pequeno | Não |
| T1.2 | <i>Penicillium sp.</i> | Semente | Grande | Sim |
| T2.1 | <i>Penicillium sp.</i> | Folhas | Moderado | Não |
| T3.1 | <i>Penicillium sp.</i> | Galhos | Grande | Sim |
| T5.1 | Levedura | Pão Integral | Moderado | Não |
| T6.1 | <i>Talaromyces sp.</i> | Bolacha | Grande | Não |
| T6.2 | <i>Penicillium sp.</i> | Bolacha | Grande | Sim |
| T7.1 | <i>Aspergillus niger</i> | Pudim | Grande | Sim |
| T8.1 | Levedura | Arroz doce | Ausente | Não |
| T8.2 | Levedura | Arroz doce | Ausente | Não |
| T8.3 | <i>Penicillium sp.</i> | Arroz doce | Grande | Sim |
| T9.1 | <i>Penicillium sp.</i> | Folhas | Grande | Sim |
| T9.2 | <i>Penicillium sp.</i> | Folhas | Moderado | Não |
| T10.2 | NI* | Terra | Ausente | Não |
| T10.5 | <i>Penicillium sp.</i> | Terra | Grande | Não |
| T11.1 | <i>Rizopus sp.</i> | Fruto Tucumã | Ausente | Não |
| T13.1 | Bactéria | Fruto Pinhão | Ausente | Não |
| T14.1 | <i>Penicillium sp.</i> | Polpa Tamarindo | Grande | Não |
| T14.2 | NI* | Polpa Tamarindo | Grande | Sim |
| T15.1 | Levedura | Fruto Tucumã | Moderado | Sim |
| T17.1 | NI* | Folhas | Grande | Não |
| T16.1 | Levedura | Maracujá | Pequeno | Não |
| T18.1 | NI* | Folhas | Ausente | Não |
| T18.2 | <i>Chyso sporium sp.</i> | Folhas | Pequeno | Não |
| T18.4 | NI* | Folhas | Médio | Não |
| T18.6 | NI* | Folhas | Ausente | Não |
| T18.7 | Levedura | Folhas | Pequeno | Não |
| T18.8 | NI* | Folhas | Pequeno | Não |
| T19.1 | NI* | Arbusto | Grande | Não |
| T19.2 | NI* | Arbusto | Pequeno | Não |
| T20.1 | Levedura | Galhos | Pequeno | Não |
| T21.2 | Levedura | Arbusto | Médio | Não |
| T21.3 | Levedura | Arbusto | Ausente | Não |
| T21.4 | NI* | Arbusto | Pequeno | Não |
| T22.1 | NI* | Galhos | Pequeno | Não |
| T22.2 | <i>Acremonium sp.</i> | Galhos | Grande | Sim |
| T22.3 | <i>Penicillium sp.</i> | Galhos | Grande | Não |
| T22.4 | Levedura | Galhos | Médio | Não |
| T23.1 | Levedura | Galhos | Ausente | Não |
| T23.2 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T23.3 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T24.1 | Levedura | Galhos | Ausente | Não |
| T25.1 | Levedura | Galhos | Pequeno | Não |
| T25.3 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T25.4 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T25.5 | Levedura | Galhos | Pequeno | Não |
| T26.2 | NI* | Galhos | Pequeno | Não |
| T26.3 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T26.4 | <i>Aspergillus niger</i> | Galhos | Grande | Sim |
| T26.5 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| T26.6 | NI* | Galhos | Grande | Não |
| AN1257 | Doação | Laboratório | - | Sim |
| N402 | <i>Aspergillus niger</i> | Padrão da literatura | - | Sim |

NI* = Fungo filamentosos não identificado

Figura 11 – Índice de atividade enzimática determinado em culturas de linhagens fúngicas.



Fonte: Própria autora. (A) IAE determinados em culturas inoculadas com esporos. (B) IAE determinados em culturas inoculadas com discos de micélio de 6 mm de diâmetro.

Os fungos que apresentaram atividade de L-asparaginase em menor tempo e maiores IAE em culturas inoculadas com esporos – *Penicillium sp.* T6.2, *Penicillium sp.* T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2 – foram submetidos ao teste de triagem por transferência de fragmento de micélio maduro. A linhagem *Penicillium sp.* T9.1 que produziu IAE de 1,2 também foi incluída nessa segunda etapa de triagem. Os IAE determinados ao longo do tempo de cultivo para as linhagens T6.2, T8.3, T22.2 e T9.1 são mostrados na Figura 11. As linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 expressaram atividade de L-asparaginase após 24 h de cultivo quando inoculadas a partir de discos de micélio maduro e indicaram seu potencial para uma rápida produção da enzima (FIG. 11).

A linhagem T9.1 produziu o terceiro maior IAE nas culturas inoculadas com micélio, com valor de 1,76 após 48h. No entanto, a linhagem T22.2, embora tenha produzido IAE de 1,47 após 48 h, e, portanto, menor que a linhagem T9.1, apresentou uma expressão enzimática mais rápida, com IAE de 1,32 determinado após 24 h. A linhagem T9.1 não produziu atividade enzimática detectável em meio sólido após 24 h, quando cultivada a partir de um disco de micélio (FIG. 8). Considerando a possibilidade de produção, o fungo capaz de produzir em menor tempo está em vantagem em relação aos demais. Também é necessário considerar para a seleção das linhagens, o rápido crescimento das colônias da linhagem T22.2, o que acaba por diminuir o IAE, que é determinado pela razão entre o diâmetro do halo de hidrólise do substrato e o diâmetro da colônia.

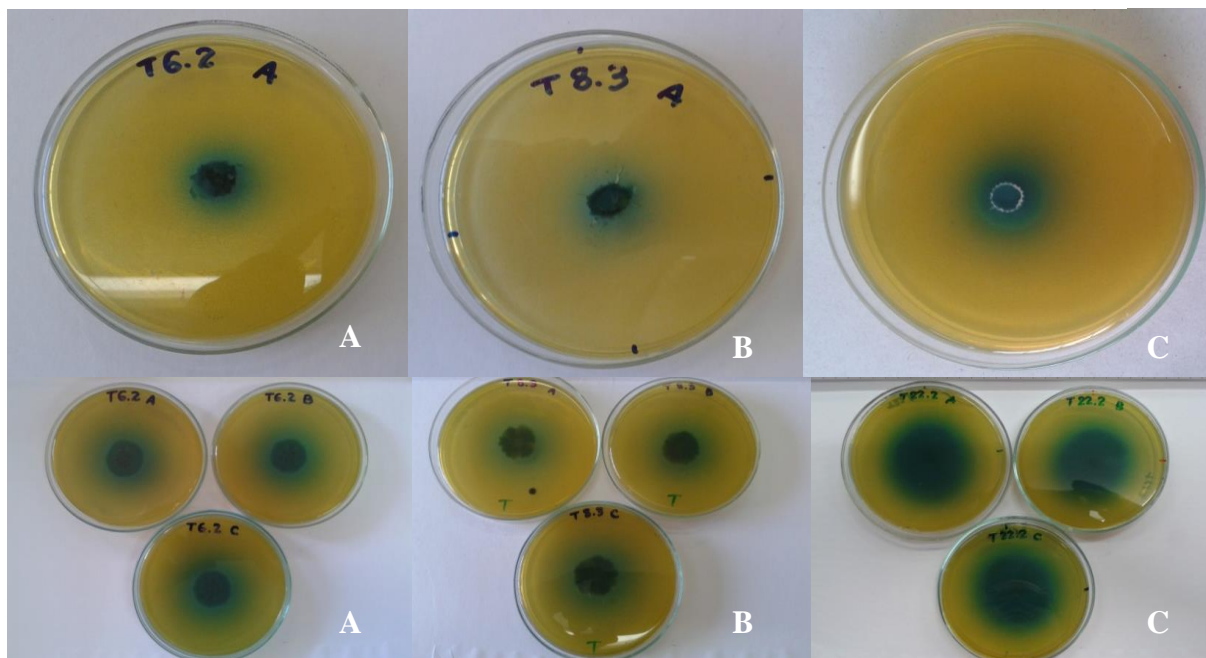
Dessa forma, três linhagens produziram L-asparaginase com rápida expressão da atividade enzimática: *Penicillium sp.* T6.2, *Penicillium sp.* T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2. Estas três linhagens se mostraram promissoras para o desenvolvimento de um processo produtivo, pois todos os índices de atividade enzimática determinados foram acima de 1.

Na Figura 12 é comparada a formação do halo azul esverdeado relacionado à expressão de atividade enzimática nas duas variações da metodologia de triagem. As duas metodologias evidenciaram os mesmos fungos como melhores produtores da enzima L-asparaginase, sendo, portanto, eficazes. Assim, a escolha do melhor método pode ser realizada pela preferência do pesquisador, ressaltando-se que a metodologia de transferência do disco micelial exige maior controle e destreza manual e é mais facilmente contaminada pela maior quantidade de esporos decorrentes da manipulação de uma colônia madura.

As duas metodologias forneceram informações de IAE coerentes e que apontaram as mesmas linhagens como mais promissoras para produção de L-asparaginase. Baseados nos resultados dessas duas análises, foram escolhidas três linhagens de fungos filamentosos, dois fungos do gênero *Penicillium sp.* (T6.2, T8.3) e um *Fusarium sp.* (T22.2) para os estudos subsequentes.

O maior IAE verificado, em todas as linhagens estudadas, em glicerol comparado a glicose, pode ser compreendido pela observação feita em outro trabalho, onde vários açúcares, e especialmente a glicose, foram considerados inibidores da produção e da atividade de L-asparaginase (CEDAR; SCHWARTZ, 1968).

Figura 12 – Expressão da atividade de L-asparaginase pelas linhagens de fungos filamentosos selecionadas pelo seu potencial para a produção enzimática.



Fileira superior: Método de transferência de micélio maduro após 48 h de incubação. Fileira inferior: Método por inóculo com suspensão de conídios após 7 dias de incubação. Fotografia do verso das placas para evidenciar o halo azul.

5.2 Análise morfológica e molecular das linhagens fúngicas produtoras de L-asparaginase

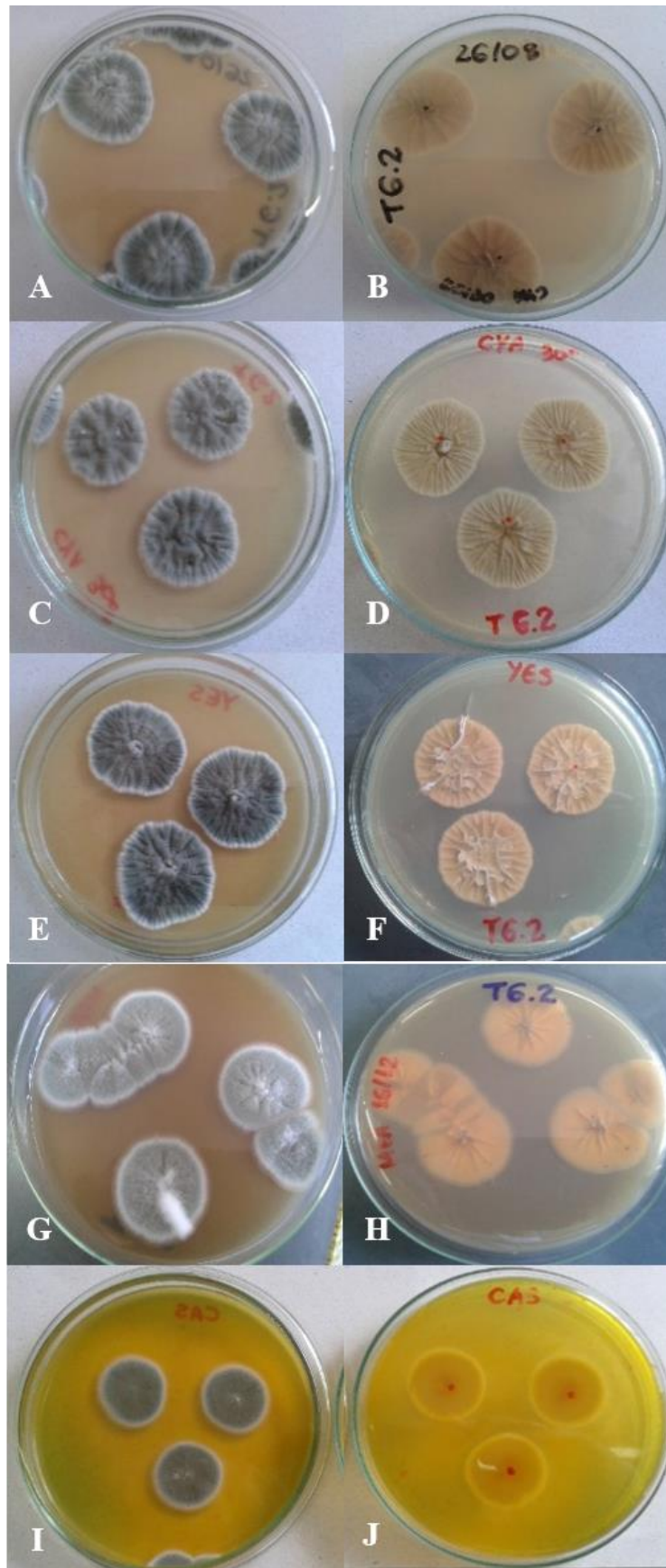
5.2.1 Morfologia macroscópica

A linhagem de *Penicillium sp.* T6.2, cresceu em todos os meios de cultivo com exceção do meio CYA incubado a 37°C. No meio YES, as colônias tiveram fraco grau de esporulação (TAB. 5). O crescimento em meio CAS foi considerado bom, a produção de ácido foi positiva, e a produção de base ausente após 7 dias e 14 dias. No meio MEA, após 7 dias de cultivo, as colônias apresentavam um diâmetro médio de 30 mm, discreta produção de exsudato, fino esclerócito e cor do anverso verde acinzentado, características que podem ser observadas na figura 13.

Tabela 5 - Características macro e micromorfológicas de *Penicillium sp.* T6.2

| Meio Condições de Cultivo | Observações: |
|---|--|
| CYA Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 25mm Cor do Anverso: Verde acinzentado Cor do Reverso: Bege Pálido Reação de Ehrlich: Positivo (Violeta) |
| CYA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 29mm |
| CYA Incubação 7 dias – 37°C | Não cresceu |
| MEA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 30mm Textura da Colônia: Velvety Cor do Anverso: Verde acinzentado Descrição microscópica: conídios globosos |
| CAS Incubação 7-10 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 40mm Taxa de Crescimento: Bom. Produção de Ácido: Elevado Produção de Base após 07 dias: Ausente Produção de Base após 10-14 dias: Ausente |
| YES Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 27mm Grau de esporulação: Fraco Reverso da colônia: Marrom-bege claro |

Figura 13 - Morfologia macroscópica da linhagem *Penicillium sp.* T6.2.



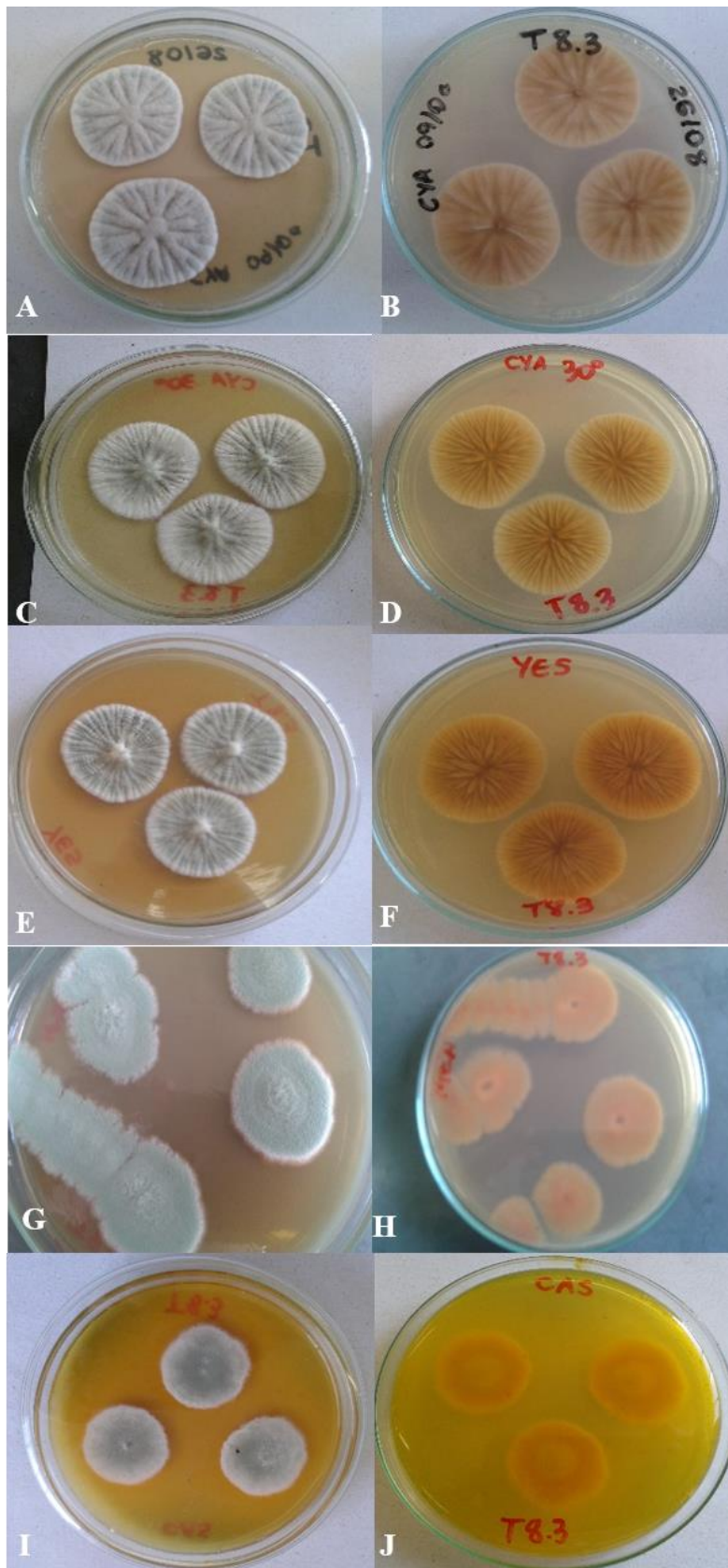
Fonte: Própria autora. Fungos cultivados por 3 dias em meios CYA 25°C (A, B), CYA 30°C (C, D), YES 25°C (E, F), MEA 30°C (G, H) e CAS 25°C (I, J). Anverso à esquerda e verso à direita.

A linhagem *Penicillium sp.* T8.3, também cresceu em todos os meios de cultivo com exceção do meio CYA incubado a 37°C. As características macroscópicas da linhagem T8.3 são mostradas na Tabela 6. O crescimento no meio YES atingiu diâmetro médio de 27 mm, apresentou fraco grau de esporulação e um reverso da colônia de coloração pálida amarelada. O crescimento no meio CAS foi considerado bom, a produção de ácido foi negativa e a produção de base também foi negativa, conforme verificado após 7 e 14 dias. As colônias cultivadas no meio MEA, apresentavam um diâmetro médio de 30 mm após 7 dias e uma textura do tipo fasciculada, com cor do anverso verde acinzentado (FIG. 14).

Tabela 6 - Características macro e micromorfológicas do *Penicillium sp.* T8.3

| Meio Condições de Cultivo | Observações: |
|---|--|
| CYA Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 25mm Cor do Anverso: Verde acinzentado Cor do Reverso: Alaranjado Reação de Ehrlich: Positivo (Amarelo) |
| CYA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 25mm |
| CYA Incubação 7 dias – 37°C | Não cresceu |
| MEA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 30mm Textura da Colônia: Fasciculada Cor do Anverso: Verde acinzentado Descrição microscópica: conídios globosos |
| CAS Incubação 7-10 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 40mm Taxa de Crescimento: Bom. Produção de Ácido: Elevado Produção de Base após 07 dias: Ausente Produção de Base após 10-14 dias: Ausente |
| YES Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 27mm Grau de esporulação: Fraco Reverso da colônia: Bege Pálido amarelado |

Figura 14 - Morfologia macroscópica da linhagem *Penicillium sp.* T8.3.



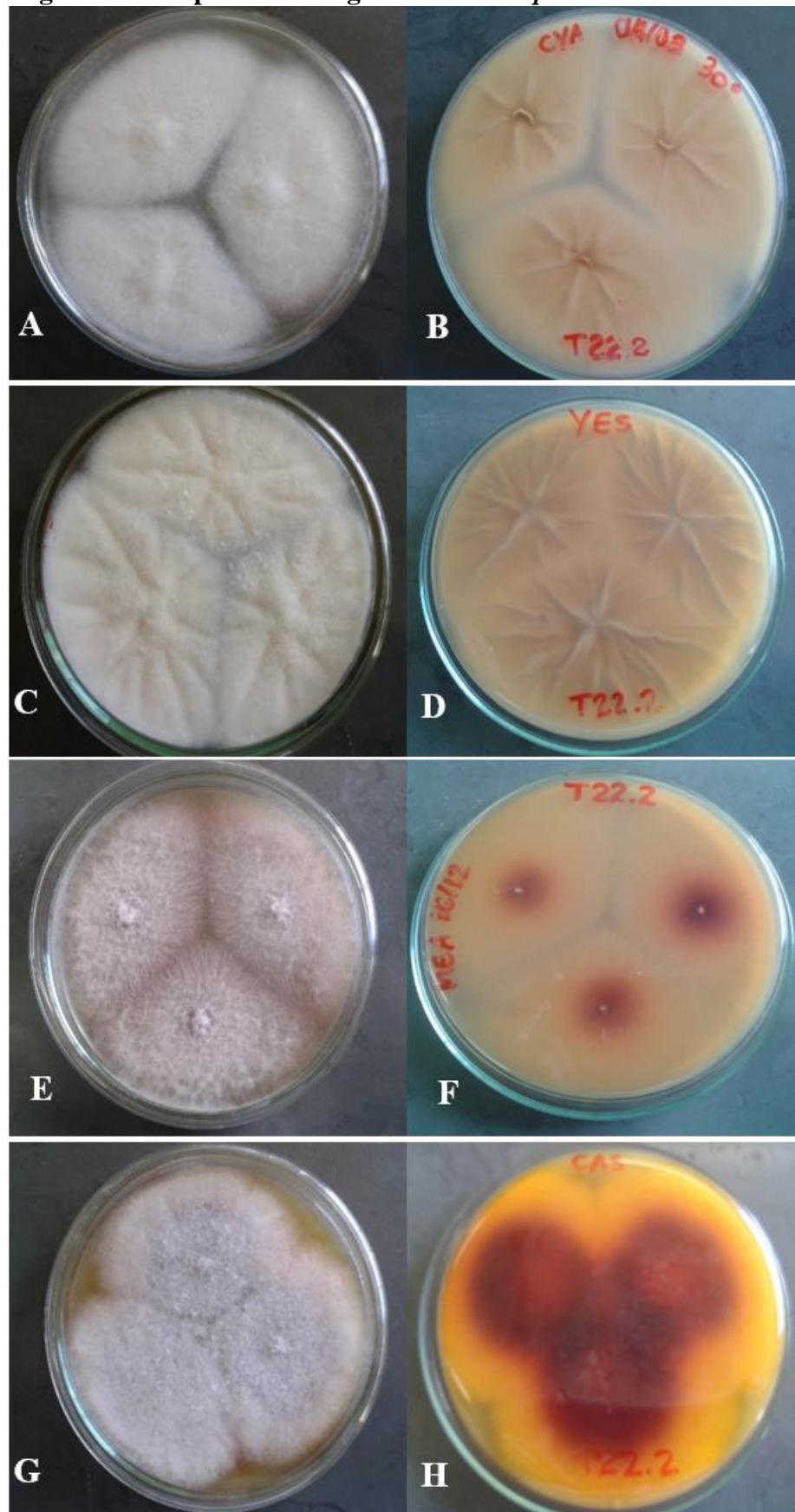
Fonte: Própria autora. Fungos cultivados por 3 dias nos meios CYA 25°C (A, B), CYA 30°C (C, D), YES 25°C (E, F), MEA 30°C (G, H) e CAS 25°C (I, J). Anverso à esquerda e reverso à direita.

A linhagem de *Fusarium sp.* T22.2 não apresentou crescimento após 7 dias de incubação no meio CYA a 37°C. As características macroscópicas gerais dessa linhagem são descritas na Tabela 7. Em meio YES e meio CYA a 30°C foram formadas colônias de coloração branca, com aspecto algodinoso e cor bege pálida no reverso. No meio MEA e meio CAS o anverso também possuía coloração branca de aspecto algodinoso, porém no reverso foi produzida uma leve coloração marrom avermelhada em MEA e bastante intensa em CAS, além de evidenciar a produção de ácido neste meio (FIG. 15).

Tabela 7 - Características Macromorfológicas do *Fusarium sp.* T22.2

| Meio | Observações: |
|---|--|
| Condições de Cultivo | |
| CYA Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 45mm Cor do Anverso: Branco Cor do Reverso: Pálido |
| CYA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 45mm |
| CYA Incubação 7 dias – 37°C | Não cresceu |
| MEA Incubação 7 dias – 30°C | Diâmetro da colônia: 45mm Textura da Colônia: Algodonosa Cor do Anverso: Marrom e bege Descrição microscópica: macroconídios |
| CAS Incubação 7-10 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 45mm Taxa de Crescimento: Bom. Produção de Ácido: Elevado Produção de Base após 07 dias: Ausente Produção de Base após 10-14 dias: Ausente |
| YES Incubação 7 dias – 25°C | Diâmetro da colônia: 45mm Grau de esporulação: nenhuma Reverso da colônia: Marrom escuro |

As três linhagens não foram capazes de crescer quando incubadas a 37°C, o que pode ser considerado uma vantagem, pois a limitação de crescimento nessa faixa de temperatura pode significar linhagens mais seguras para o manejo industrial.

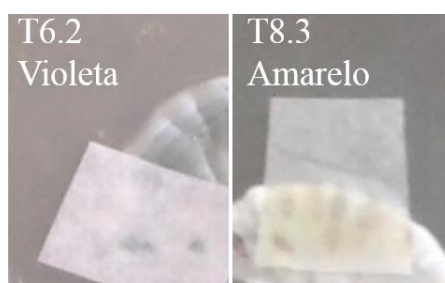
Figura 15 - Morfologia macroscópica da linhagem *Fusarium sp.* T22.2.

Fonte: Própria autora. Fungos cultivados por 7 dias nos meios CYA 30°C (A, B), YES 25°C (C, D), MEA 30°C (E, F) e CAS 25°C (G, H). Anverso à esquerda e reverso à direita.

5.2.2 Teste de Ehrlich

As colônias do fungo *Penicillium sp.* T6.2 formaram halo violeta após 2 minutos em contato com o papel de filtro embebido com o reagente de Ehrlich, sendo, portanto, um resultado positivo para produção de ácido ciclopiazônico. A linhagem T8.2 formou, após 2 minutos de observação, um halo amarelo, o que torna a linhagem positiva para alcaloides relacionados, mas negativo para produção de ácido ciclopiazônico. O teste foi repetido para as duas linhagens e o resultado foi confirmado nas triplicatas realizadas (FIG.16). A linhagem T22.2 não foi submetida ao teste.

Figura 16 - Teste de Ehrlich



Fonte: Resultados da autora.

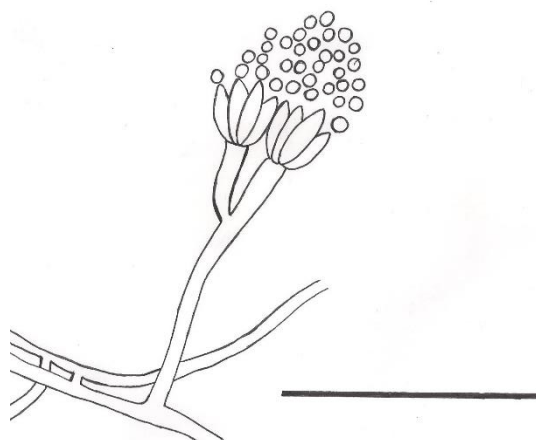
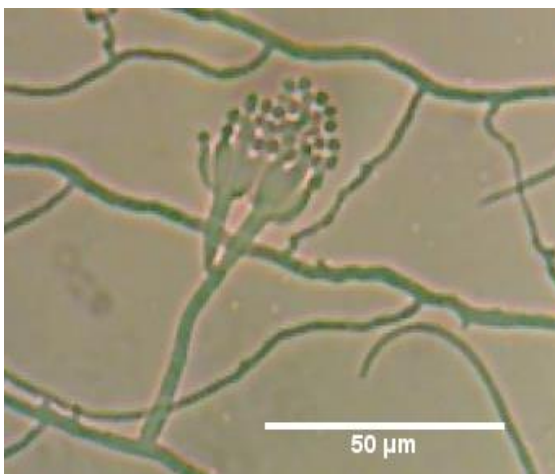
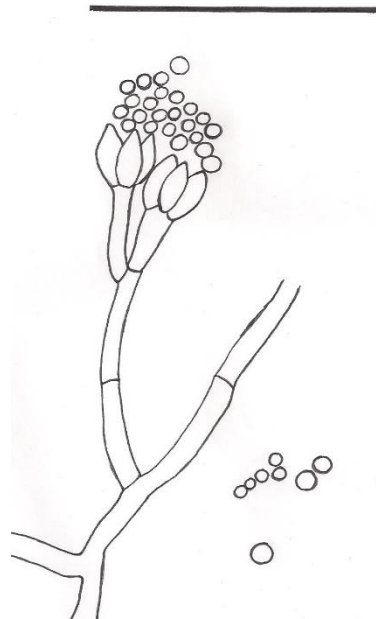
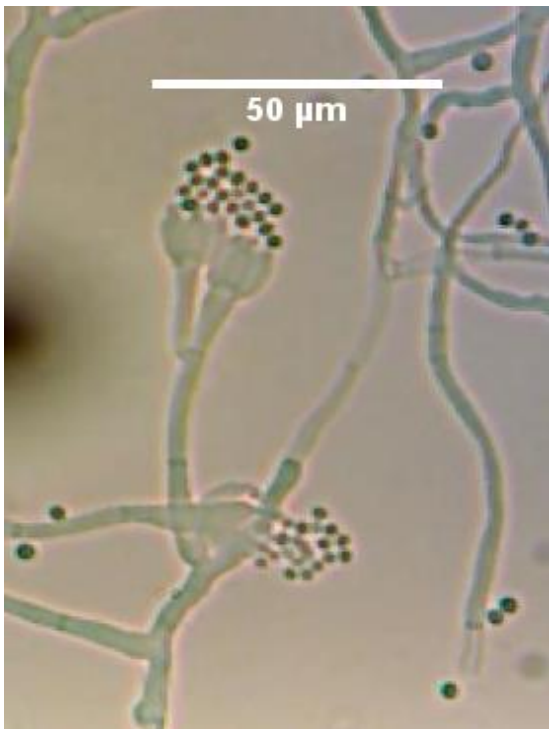
5.2.3 Morfologia microscópica por microcultivo

A análise micromorfológica da linhagem *Penicillium sp.* T6.2 evidenciou conídios esféricos, de parede lisa e conidióforos biverticilados. As características microscópicas da linhagem T6.2 são descritas na Tabela 8 e podem ser observadas na Figura 17.

Tabela 8 - Características Micromorfológicas do *Penicillium sp.* T6.2

| Morfologia Microscópica | |
|--|---|
| Largura/ Comprimento dos conídios: | 2,1±0,4µm |
| Comprimento das Fiálides: | 10,2±2,0µm |
| Comprimento das Metulas: | 12,9±1,7µm |
| Largura da estipe (µm): | 1,9±0,5µm |
| Características do Conidióforo: | Unido (<i>adpressed</i>) |
| Ornamentação: | Lisa |
| Padrão de Ramificação do conidióforo: | Triverticilado, algumas vezes Biverticilado |

Figura 17 - Aspectos micromorfológicos do *Penicillium sp.* T6.2 .



Fonte: Própria autora. Cultivo em meio ME2 por 7 dias a 30°C - Escala indicada na barra

A linhagem *Penicillium sp.* T8.3 apresentou no microcultivo conídios esféricos, de parede lisa e conidióforos triverticilados. As características microscópicas gerais são descritas na Tabela 8. A estrutura dos conidióforos pode ser observada na Figura 18.

Tabela 9 - Características Micromorfológicas do *Penicillium sp. T8.3*

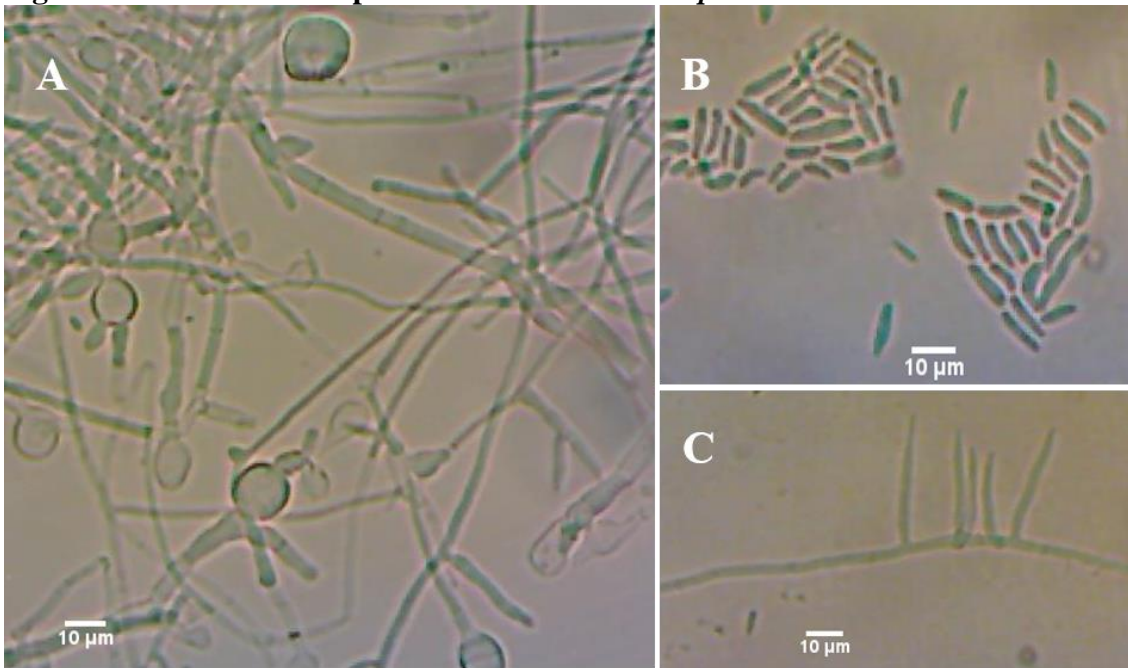
| Morfologia Microscópica | |
|---------------------------------------|--|
| Largura/ Comprimento dos conídios: | 3,3±0,4µm |
| Comprimento das Fiáldes: | 12,9±1,7µm |
| Comprimento das Metulas: | 16,9±1,9µm |
| Largura da estipe (µm): | 3,0±0,6µm |
| Características do Conidióforo: | Unido (<i>adpressed</i>) |
| Ornamentação: | Conidióforos lisos e hifas levemente rugosas |
| Padrão de Ramificação do conidióforo: | Triverticiliado |

Figura 18 - Aspectos micromorfológicos do *Penicillium sp. T8.3*.

Fonte: Própria autora. Cultivo em meio ME2 por 7 dias a 30°C - Escala indicada na barra.

O *Fusarium sp.* T22.2 produziu esporos de aspecto fusiforme de tamanho médio de $8,9 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Estes mostraram-se não septados e organizados em pequenos feixes junto às hifas (FIG. 16). Estruturas globulares observadas na Figura 19 apresentam indícios de tratarem-se de esporodóquios, um tipo de conidióforo.

Figura 19 – Estruturas reprodutivas de *Fusarium sp.* T22.2.



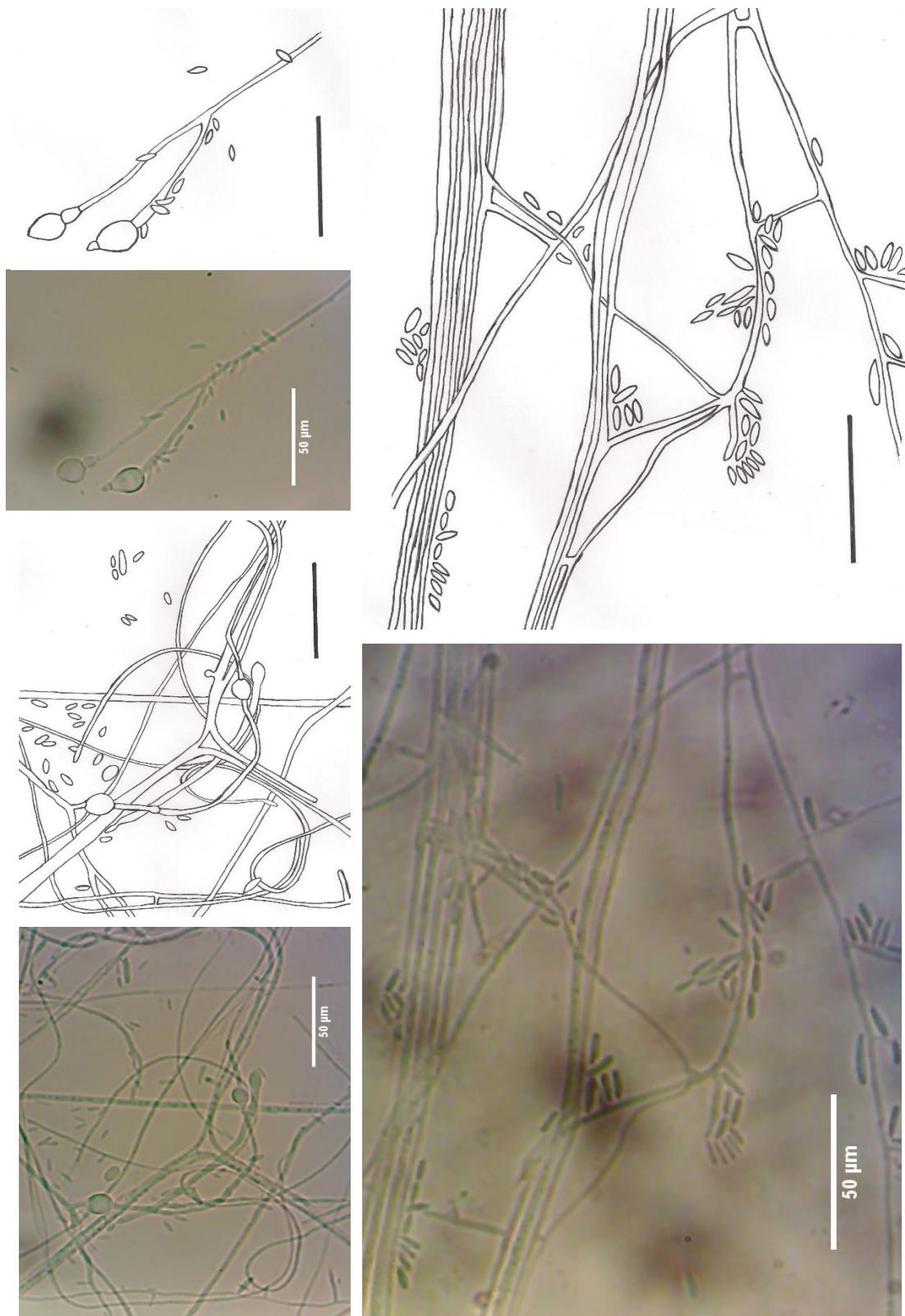
Fonte: Resultados da autora. (A) Esporodóquios; (B) Conídios e (C) Formação de conídios aderidos diretamente à hifa. Cultivo em meio ME2 por 7 dias a 30°C - Escala indicada na barra

As hifas dessa linhagem são hialinas, septadas e de paredes lisas, possuem diferentes espessuras, muito variáveis. Hifas mais largas frequentemente se conectam umas às outras por pequenas “pontes” de hifas finas (FIG. 20).

5.2.4 Morfologia microscópica por microscopia eletrônica de varredura

As análises da morfologia microscópica também foram realizadas por MEV. A Figura 21 apresenta as imagens capturadas da linhagem *Penicillium sp.* T6.2, onde é possível verificar as longas fileiras de conídios, hifas lisas e o aspecto esférico dos conídios. Os resultados da análise da morfologia macroscópica e microscópica são condizentes com as características do *Penicillium roqueforti*.

Figura 20 - Aspecto micromorfológico do *Fusarium sp.* T22.2.



Fonte: Própria autora. Cultivo em meio ME2 por 7 dias a 30°C - Escala indicada na barra.

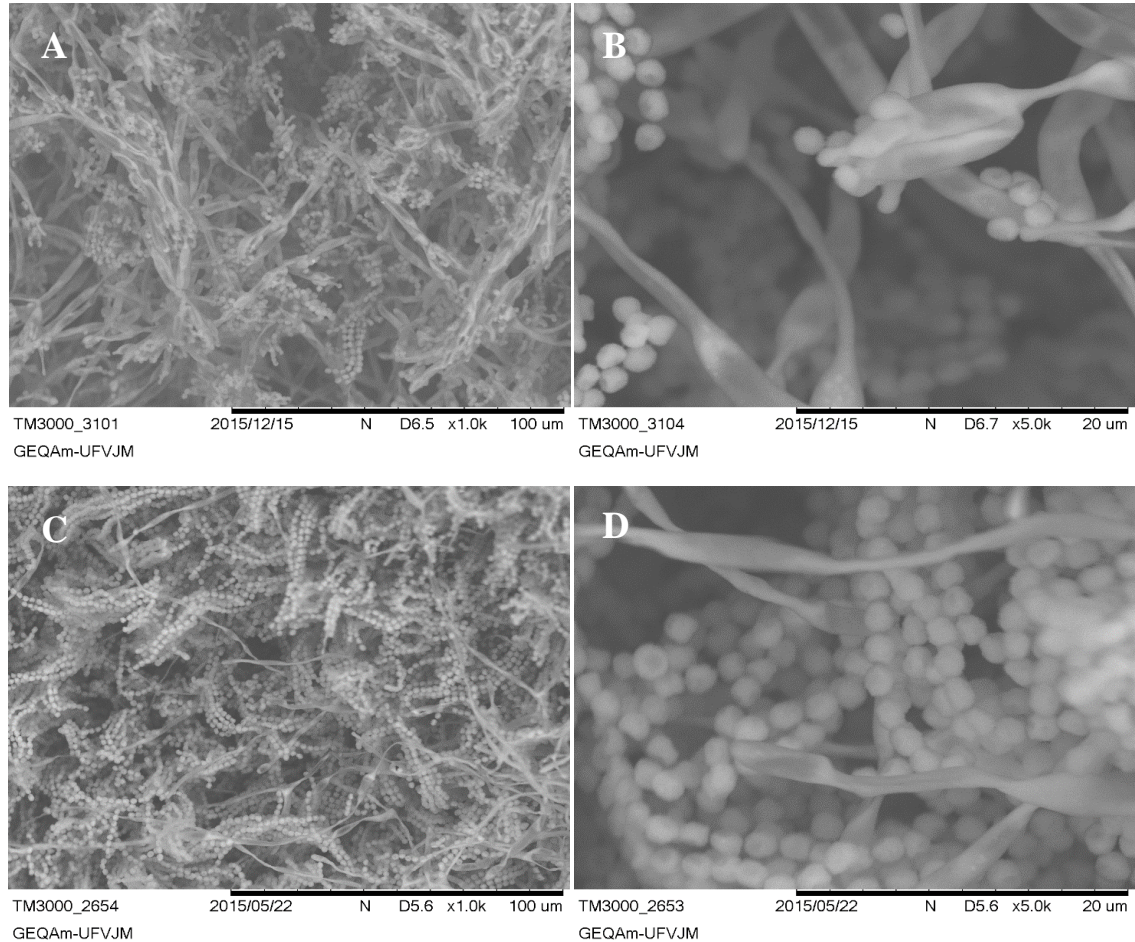
Figura 21 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo filamentoso *Penicillium sp. T6.2*.

F

onte:

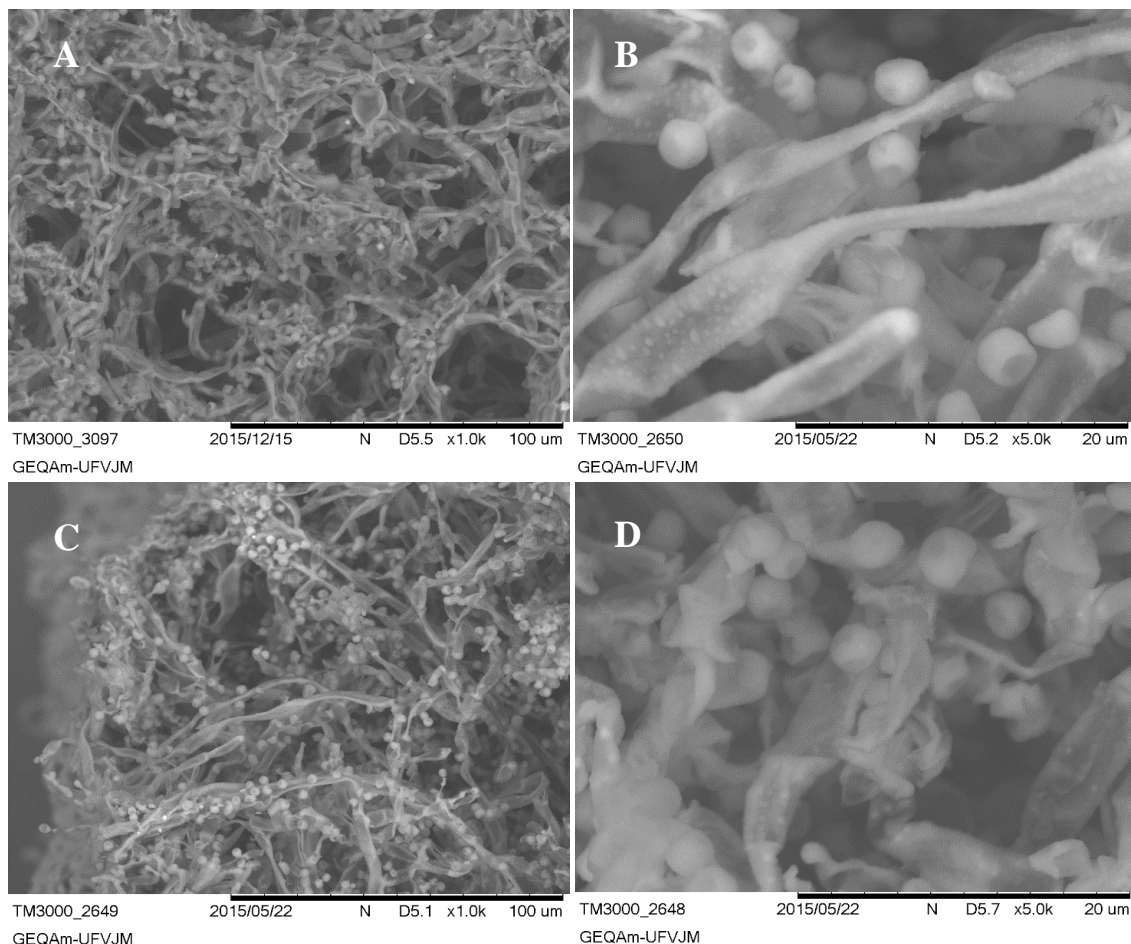
Própria

autora.



Amostras de culturas incubadas por 7 dias a 30°C em meio Czapek-Dox. Aumentos (A e C) 1000X e (B e D) 5000X.

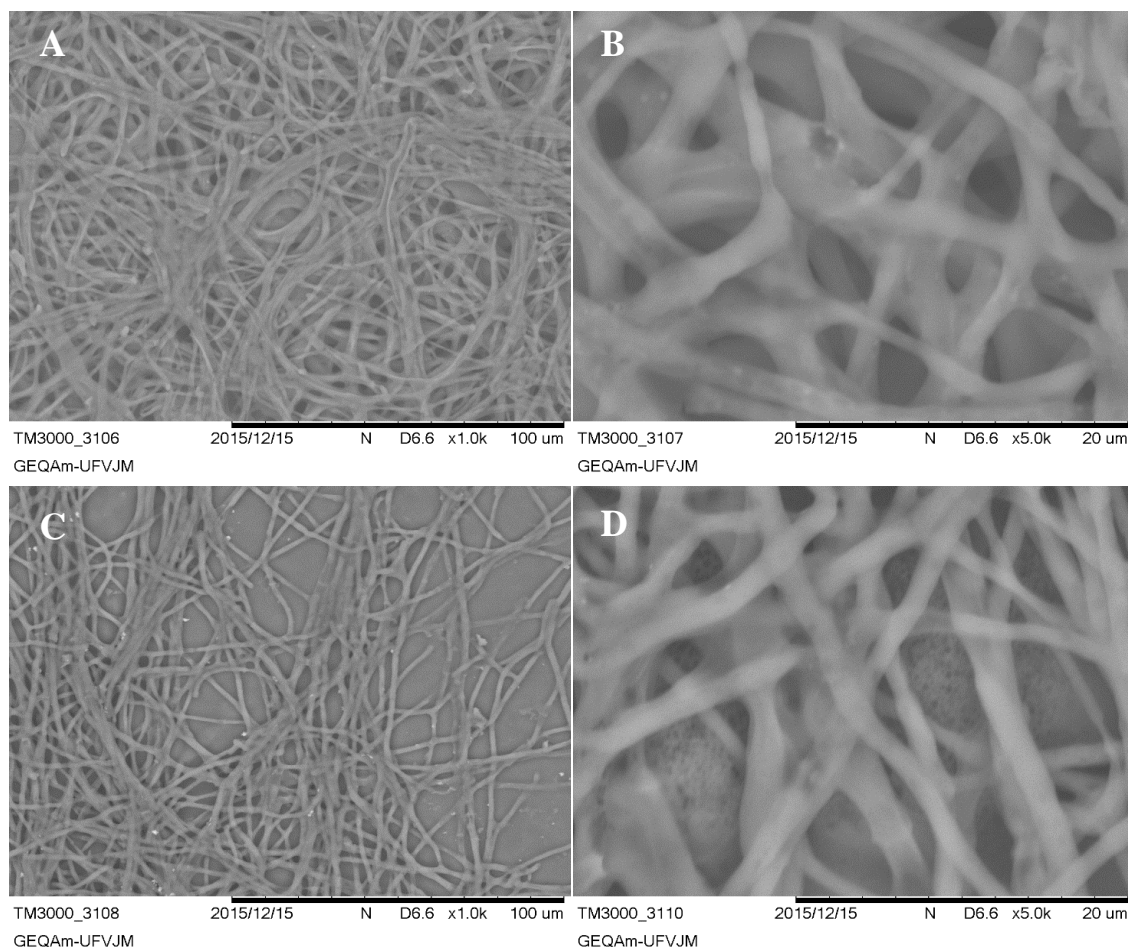
A Figura 21 do *Penicillium sp. T6.2* apresenta estrutura de hifas lisas, conídios globosos e organizados em longas fileiras. As imagens de micrografia eletrônica da linhagem *Penicillium sp. T8.3* evidenciam conídios globosos maiores, agrupados em fileiras mais finas e hifas levemente rugosas. As fileiras de conídios são mais curtas (FIG. 22).



Fonte: Própria autora. Amostras de culturas incubadas por 7 dias a 30°C em meio Czapek-Dox. Aumentos (A e C) 1000X e (B e D) 5000X.

A micrografia eletrônica da linhagem *Fusarium sp.* T22.2 não evidenciou esporos, possivelmente perdidos no processo de preparo das amostras, ou ainda ausentes devido à idade precoce das colônias. Foram preparadas amostras de colônia com três dias de crescimento, pois das amostras cultivadas por sete dias não foi possível o registro de imagens bem definidas. Entretanto é possível ver a estruturas formadas pelo crescimento e entrelaçamento das hifas. (FIG. 23).

Figura 23 – Micrografia Eletrônica de Varredura (MEV) do fungo filamentoso *Fusarium sp.* T22.2.



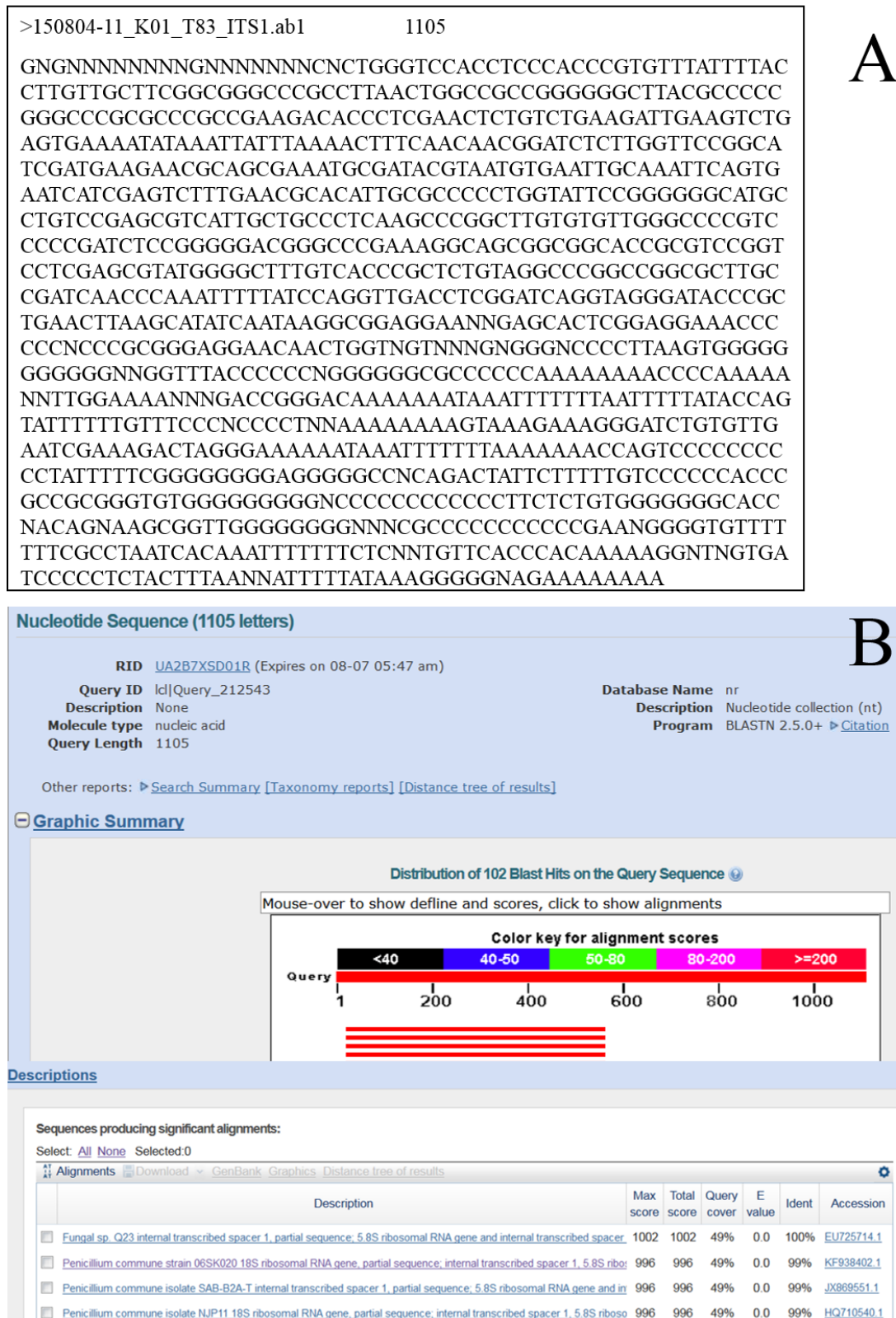
Fonte: Própria autora. Amostras de culturas incubadas por 3 dias a 30°C em meio Czapek-Dox. Aumentos (A e C) 1000X e (B e D) 5000X

5.2.5 Análise molecular

O alinhamento da sequência gerada para a linhagem T6.2 não foi realizado devido ao comprometimento da pureza da amostra, que sofreu contaminação e não gerou dados analisáveis.

A linhagem T8.3 teve a sequência da região ITS determinada, a qual é apresentada na Figura 24. As sequências homólogas recuperadas com a ferramenta BLAST incluíam 21 sequências ITS de isolados de *Penicillium commune* e 48 sequências de isolados de *Penicillium crustosum* com 99% de identidade. Três sequências de *P. crustosum* apresentaram 100% de identidade com a sequência ITS da linhagem T8.3. Estas espécies estão filogeneticamente relacionadas (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Figura 24 – Sequência ITS da linhagem *Penicillium sp.* T8.3 e análise comparativa com o programa BLAST.



Fonte: Própria autora. (A) Sequência amplificada da região ITS de *Penicillium sp.* T8.3. (B) Descrição gráfica das quatro primeiras sequências que produziram alinhamento significativo na pesquisa de similaridade com o programa BLAST contra o banco de dados do GeneBank.

A sequência ITS determinada para a linhagem T22.2 é apresentada na Figura 25. Quando analisada contra o banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST, foram recuperadas 35 sequências de ITS de *Fusarium proliferatum*, com 99% de identidade, sete sequências com 99% de identidade de *Fusarium oxysporum* e seis sequências também com 99% de identidade de *Fusarium fujikuroi*.

O alinhamento também apontou o gênero *Gibberella sp.* com alta identidade com a sequência analisada. Os resultados no BLAST indicaram 11 sequências de ITS recuperadas para *Gibberella intermedia*, seis sequências para *Gibberella moniliformis* e outras três sequências de *Gibberella fujikuroi*, todas estas espécies também com 99% de identidade. Este gênero *Gibberella sp.* é uma fase teleomorfa do *Fusarium sp.*, o estágio anamorfo, que justifica a similaridade genética e a identidade de 99% entre esses micro-organismos (DE VOS *et al.*, 2014; FOURIE *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2012).

A utilização da Região ITS como marcador molecular é uma ferramenta ainda muito recente, disponível somente nas últimas décadas, mas que já demonstra resultados que apontam para seu uso cada vez mais constante. Esse marcador pode possibilitar a identificação em nível de espécie ou pelo menos restringir o leque de micro-organismos para identificação, após etapas relativamente simples de extração e sequenciamento por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*). Um fator que influencia fortemente a confiabilidade dos dados é a qualidade das amostras. Portanto, faz-se absolutamente necessário que a obtenção das amostras para o sequenciamento seja realizada com muito cuidado para obtenção de amostras puras. Neste estudo a contaminação da amostra do *Penicillium sp.* T6.2, por exemplo, inviabilizou a geração da sua sequência ITS e resultado molecular para essa linhagem (SCHOCH *et al.*, 2014).

A identificação e taxonomia por amplificação da região ITS, procura solucionar também as divergências morfológicas numa mesma espécie quando são realizados apenas observação em diferentes cultivos (HOUBRAKEN *et al.*, 2014; VISAGIE *et al.*, 2014). Estudos para identificação de espécies de *Fusarium sp.*, muito semelhantes morfológicamente, utilizam estas técnicas como diagnóstico de contaminação agrícola por esse gênero. Estratégia que possibilita alto grau de confiabilidade e segurança (LABUDA; TANCINOVÁ; HUDEC, 2003). A associação de outras técnicas de biologia molecular, como o *PCR-based reverse line blot (RLB)* com hibridização, também mostrou-se uma estratégia efetiva para identificação destas espécies em achados clínicos (WANG *et al.*, 2011).

Figura 25 – Sequência ITS da linhagem *Fusarium sp.* T22.2 e análise comparativa com o programa BLAST.

>150804-11_I01_T222_ITS1.ab1 638

```

ANNNNNNNNNNNNNANNNGGNGNNGNNCNGGNGACCTGAGTACCANTTGTAA
GCCGGGGGAGATCCCCCGCTCCCGGTAACCGGGACGGCCCCGCCNGAGGAC
CCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAACCATAATAAATCAAA
ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAT
GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAA
CCCTCAAGCCCCCGGTTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCCCTTGCGGCAAGC
CGCCCCGAAATCTAGTGGCGGTCTCGCTGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAA
AACCTCGCAACTGGTACGCGGCGCGGCAAGCCGTTAAACCCCAACTTCT
GAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAT
AAGCGGAGGAAGNCCGCAGGTGCCCTCCGAACCATTCTTAAGGGGGGGG
AGNCCCTACTTCACCGGGGANNCCNTTGCGGGAGCGGGAGGTATTTGGGGA
AGANTTNAGN

```

A

Nucleotide Sequence (638 letters)

RID [UA3CUJC7016](#) (Expires on 08-07 06:05 am)

Query ID [|Query_181653](#) Database Name nr

Description None Description Nucleotide collection (nt)

Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.5.0+ [Citation](#)

Query Length 638

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#)

Graphic Summary

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Color key for alignment scores

Query 1 100 200 300 400 500 600

Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| Fusarium proliferatum isolate MC-21-F internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 | 867 | 867 | 73% | 0.0 | 99% | KU527802.1 |
| Fusarium proliferatum isolate FproDOB-21 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 | 867 | 867 | 73% | 0.0 | 99% | KU865563.1 |
| Fusarium sp. APMSU3 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2 | 867 | 867 | 73% | 0.0 | 99% | KT282392.1 |
| Fusarium proliferatum strain MW10 18S ribosomal RNA gene, partial sequence | 867 | 867 | 73% | 0.0 | 99% | KT803067.1 |

Fonte: Própria autora. (A) Sequência amplificada da região ITS de *Fusarium sp.* T8.3. (B) Descrição gráfica das quatro primeiras sequências que produziram alinhamento significativo na pesquisa de similaridade com o programa BLAST contra o banco de dados do GeneBank.

O perfil de crescimento em função das fontes de nitrogênio aponta para os mecanismos de regulação de nitrogênio nessas linhagens. As aplicações biotecnológicas para maior aproveitamento do metabolismo destes micro-organismos passam pelo conhecimento do comportamento fisiológico frente às diversas opções nutricionais, e também a aspectos genéticos. Estudos dos genes responsáveis pelo metabolismo de nitrogênio para a L-asparaginase II tem demonstrado as vantagens de unir os dois campos de investigação, genético e fisiológico, para obtenção de melhores resultados de produção enzimática (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Identificações por comparação filogenéticas de DNA, tem se mostrado como um caminho de referência para obtenção de resultados muito precisos, principalmente por reconhecer que a identificação através de informações exclusivamente morfológicas pode frequentemente subestimar a grande diversidade dos fungos. A identificação no presente estudo foi realizada por amplificação da região ITS 1, somadas aos aspectos macro e micromorfológicos considerando esta variabilidade e a natural limitação de uma observação exclusivamente morfológica. Diversas bases de dados estão atualmente disponíveis principalmente no portal NCBI e suas diversas ferramentas (SCHOCH *et al.*, 2014).

5.2.6 Análises comparativas entre as linhagens em estudo e espécies conhecidas

Os resultados dos testes de identificação, quando comparados à literatura fornecem subsídios para delimitação da identidade das prováveis espécies a partir dos resultados macroscópicos, microscópicos e de análise molecular. Estas comparações estão apresentadas nos Quadros 1, 2 e 3, entre as linhagens em estudo, *Penicillium sp.* T6.2 e T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2 e as espécies conhecidas com as quais mais apresentam identificação.

A análise comparativa das características morfológicas de *Penicillium sp.* T6.2, foram realizadas com a espécie *Penicillium roqueforti* e de *Penicillium sp.* T8.3, *Penicillium commune* e *Penicillium crustosum* Quadro 1 e Quadro 2.

A análise comparativa realizada entre *Fusarium sp.* T22.2, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium oxysporum*, no Quadro 3, considerou características micro e macromorfológicas de estruturas de ornamentação, como os clamidósporos observados na Figura 19 (NELSON; TOUSSOUN; MARASAS, 1983). A presença ou ausência de clamidósporos é extremamente importante para a classificação taxonômica, sendo encontrados isoladamente, pares, aglomerados e fileiras. Estas estruturas podem possuir paredes lisas ou rugosas (NELSON; DIGNANI; ANAISSIE, 1994).

Quadro 1 – Análise comparativa das características morfológicas de *Penicillium sp. T6.2*, *Penicillium roqueforti*.

| <i>Penicillium sp. T6.2</i> | Características da espécie | <i>Penicillium roqueforti</i> |
|---|---|---|
| - | Subgênero | Penicillium |
| Triverticilado, algumas vezes biverticilado, elementos unidos (<i>adpressed</i>), hifas profundas | Tipo de conidióforo | Terverticilado, ocasionalmente quarterverticilado, elementos unidos (<i>adpressed</i>), hifas profundas |
| Paredes Lisas, conídio globoso 2,1±0,4µm | Formato, textura e diâmetro do conídio | Paredes Lisas, conídio globoso 3,5-5 µm |
| Cilíndrica, com estreitamento (<i>collula</i>) curto 10,2±2,0µm | Formato e comprimento da fiálide | Cilíndrica, com estreitamento (<i>collula</i>) curto 8-10 µm x 2,5-3.0 µm |
| Cilíndrica, 12,9±1,7µm | Formato e comprimento da metula | Cilíndrica, 10-17 µm x 3-4 µm |
| Paredes lisas, 1,9±0,5µm | Textura e largura da estipe | Paredes rugosas, 100-250 µm x 4-5 µm |
| Isolado de bolacha caseira | Habitat comum | Queijos, silagem, pães e outros produtos em conserva ácida |
| 27mm | Diâmetro da colônia em meio YES a 25°C por 7 d | 38-71 mm |
| 2 | Esporulação em meio YES | 2 |
| Marron-bege claro | Cor do reverso em meio YES | Verde escuro |
| 25mm | Diâmetro da colônia em meio CYA a 25°C por 7 d | (17-) 40-77 mm |
| Violeta (+) | Reação de Ehrlich em meio CYA | Violeta (+/++) |
| Ausente | Produção de exsudato em CYA | Ausente |
| Bege pálido | Cor do reverso em meio CYA | Verde escuro |
| 30mm | Diâmetro da colônia em meio MEA a 25°C por 7 d | 26-43 mm |
| Bom (Realizado em Caseína – Meio CAS) | Crescimento em Creatina | Muito bom |
| - | Porcentagem de identidade na análise molecular com a linhagem: | Sem dados |

Fonte: Resultados da autora e FRISVAD, SAMSON, 2004.

Esporulação: 0: Nenhuma ou fraca esporulação. 1: Esporulação no centro da colônia. 2: Forte esporulação em mais de 90% da colônia.

Quadro 2 – Análise comparativa das características morfológicas de *Penicillium sp. T8.3*, *Penicillium commune* e *Penicillium crustosum*.

| <i>Penicillium sp. T8.3</i> | Características da espécie | <i>Penicillium commune</i> | <i>Penicillium crustosum</i> |
|---|---|--|--|
| - | Subgênero | Penicillium | Penicillium |
| Terverticilado, elementos unidos (<i>adpressed</i>), hifas profundas | Tipo de conidióforo | Terverticilado, elementos unidos (<i>adpressed</i>), hifas profundas | Terverticilado, elementos unidos (<i>adpressed</i>), hifas profundas |
| Paredes Lisas, conídio globoso a subgloboso 3,3±0,4µm | Formato, textura e diâmetro do conídio | Paredes Lisas, conídio globoso a subgloboso e (raramente) elipsoidal 3,5-4,5 µm. | Paredes Lisas, conídio globoso a subgloboso 3-4 µm |
| Cilíndrica, afinando até um estreitamento onde há inserção dos conídios (<i>collulum</i>) 12,9±1,7µm | Formato e comprimento da fiálide | Cilíndrica, afinando até um estreitamento onde há inserção dos conídios (<i>collulum</i>), 9-12 µm x 2,5-3 µm | Cilíndrica, afinando até um estreitamento onde há inserção dos conídios (<i>collulum</i>), 9-12 µm x 2.5-3 µm |
| Cilíndrica, 16,9±1,9µm | Formato e comprimento da metula | Cilíndrica, 10-15 µm x 3-4 µm | Cilíndrica, 10-15 µm x 3-3.5 µm |
| Parede levemente rugosa, 3,0±0,6µm | Textura e largura da estipe | Parede rugosa, 200-400 µm x 3-4 µm | Parede rugosa, 200-400 µm x 3,5-4,5 µm |
| Isolado de arroz doce | Habitat comum | Queijo, ar ambiente e produtos lácteos | Queijo, nozes, solo e frutos pomáceos |
| 27mm | Diâmetro da colônia em meio YES a 25°C por 7 d | 29-50 mm | 40-56 mm |
| 2 | Esporulação em meio YES | 0/1/2 | 2 |
| Creme amarelado | Cor do reverso em meio YES | Creme a creme amarelado, frequentemente se torna castanho escuro com cor difundindo para o ágar | Amarelo |
| 25mm | Diâmetro da colônia em meio CYA a 25°C por 7 d | (15-) 21-35 mm | 32-46 mm |
| Amarelo (+) | Reação de Ehrlich em meio CYA | Violeta (++)/+++) | Sempre negativo (Ocasionalmente amarelo) |

| | | | |
|--|---|---------------------------------|-----------------------------|
| Presente, claro | Produção de exsudato em CYA | Presente frequentemente, claro | Abundante, claro ou marrom |
| Alaranjado | Cor do reverso em meio CYA | Creme a bege ou creme amarelado | Creme a amarelo amarronzado |
| 30mm | Diâmetro da colônia em meio MEA a 25°C por 7 d | (16-) 20-37 mm | 25-46 mm |
| Bom (Realizado em Caseína – Meio CAS) | Crescimento em Creatina | Muito bom | Muito bom |
| - | Porcentagem de identidade na análise molecular com a linhagem: | 99% | 99%-100% |

Fonte: Resultados da autora e FRISVAD, SAMSON, 2004.

Esporulação: 0: Nenhuma ou fraca esporulação. 1: Esporulação no centro da colônia. 2: Forte esporulação em mais de 90% da colônia.

Quadro 3 – Análise comparativa das características morfológicas de *Fusarium sp. T22.2*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium oxysporum*.

| <i>Fusarium T22.2</i> | Características da espécie | <i>Fusarium proliferatum</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> |
|---|---|---|---|
| Abundantes | Microconídios | Abundantes | Abundantes |
| Geralmente unicelulares, ovais em formato de rim | Forma dos microconídios | Geralmente unicelulares ou em forma de disco com uma base achatada | Geralmente unicelulares, ovais em formato de rim |
| Em cadeias de comprimento variável | Formação dos microconídios | Em cadeias de comprimento variável | - |
| Não detectados | Macroconídios | Abundantes | Abundantes |
| Apresentam ligeira forma de foice, com paredes finas e célula apical e célula basal | Forma dos macroconídios | Desde ligeira forma de foice até em linha reta, com as superfícies dorsal e ventral paralelas na maior parte do comprimento | Apresentam ligeira forma de foice, com paredes finas e célula apical e célula basal |
| Monofiálides, ramificadas e não ramificadas | Conidióforos | Monofiálides e polifiálides, ramificadas e não ramificadas | Monofiálides, ramificadas e não ramificadas |
| Presentes | Clamidósporos | Ausentes | Presentes, isoladamente ou em pares. |
| - | Teleomorfo | Desconhecido* | Desconhecido* |
| - | Porcentagem de identidade na análise molecular com a linhagem: | 99% | 99% |

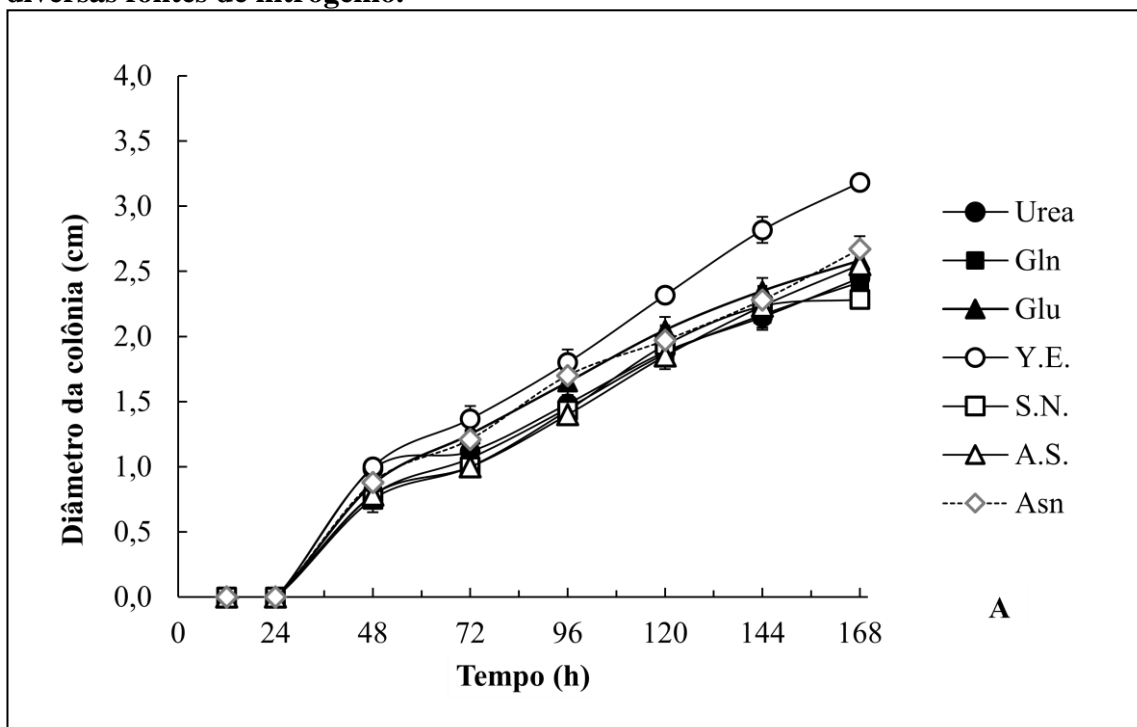
Fonte: Resultados da autora e NELSON; DIGNANI; ANAISSIE, 1994

*Estado teleomorfo desconhecido na publicação utilizada, já é assumido na literatura atual (DE VOS et al., 2014; FOURIE et al., 2013; LIMA et al., 2012), que aponta o género *Gibberella sp.* como seu Teleomorfo, conforme discutido na seção Análise molecular deste trabalho.

5.3 Perfil de crescimento em função da fonte de nitrogênio

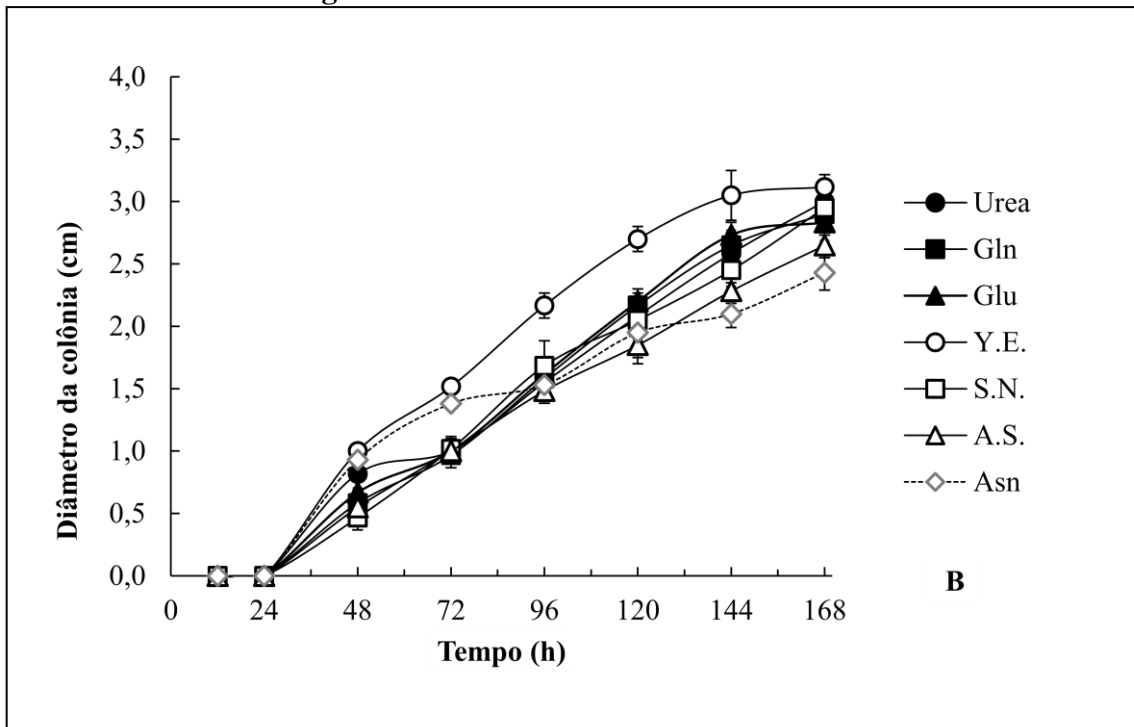
As linhagens foram submetidas às diversas condições de cultivo em meios sólidos suplementados com glicerol e diferentes fontes de nitrogênio com razão Carbono/Nitrogênio igual a um. O perfil de crescimento dos três fungos demonstrou que as linhagens T6.2 (FIG. 26), T8.3 (FIG. 27) e T22.2 (FIG. 28) são capazes de utilizar todas as fontes de nitrogênio avaliadas. Entre as fontes, a que possibilitou formação de colônias maiores, para todos os fungos, foi o extrato de levedura, uma fonte de nitrogênio e carbono rica e complexa.

Figura 26 - Perfil de crescimento do *Penicillium sp.* T6.2 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio.



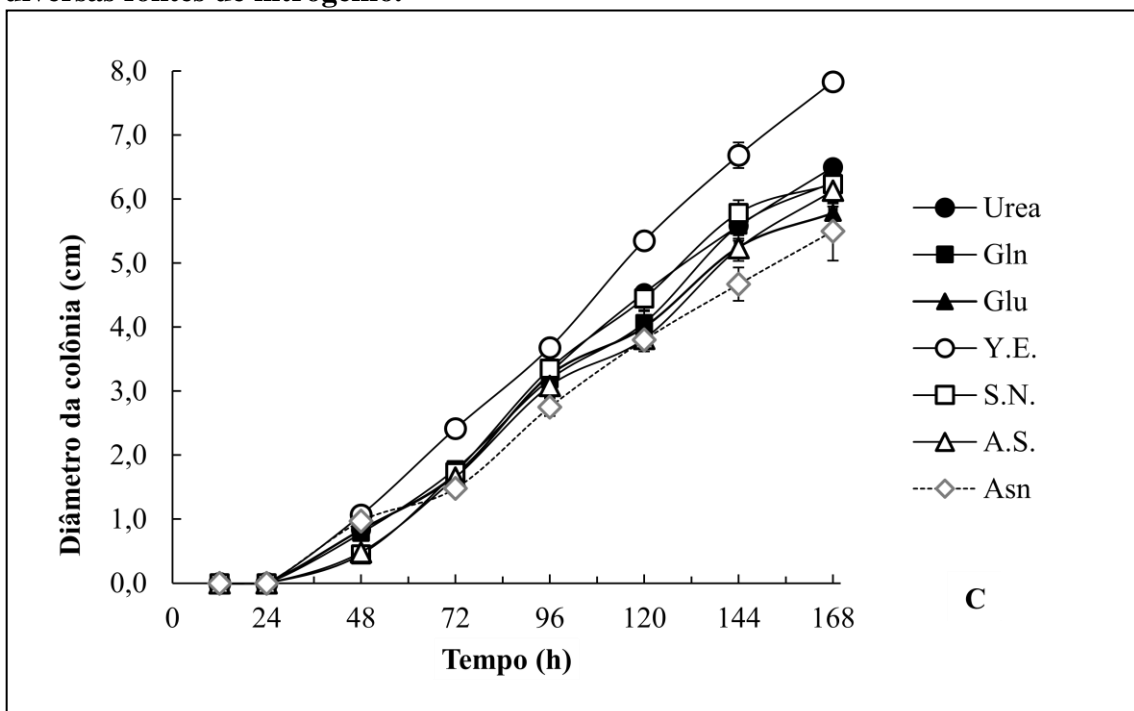
Fonte: Resultados da autora. Cultivo em meio Czapek-Dox suplementado com glicerol como fonte de carbono e ureia (urea), glutamina (Gln), glutamato (Glu), extrato de levedura (Y.E.), nitrato de sódio (S.N.), sulfato de amônio (A.S.) ou asparagina (Asn). Incubação a 30°C.

Figura 27 - Perfil de Crescimento do *Penicillium sp.* T8.3 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio.



Fonte: Resultados da autora. Cultivo em meio Czapek-Dox suplementado com glicerol como fonte de carbono e ureia (urea), glutamina (Gln), glutamato (Glu), extrato de levedura (Y.E.), nitrato de sódio (S.N.), sulfato de amônio (A.S.) ou asparagina (Asn). Incubação a 30°C.

Figura 28 - Perfil de Crescimento do *Fusarium sp.* T22.2 em função da utilização de diversas fontes de nitrogênio.



Fonte: Resultados da autora. Cultivo em meio Czapek-Dox suplementado com glicerol como fonte de carbono e ureia (urea), glutamina (Gln), glutamato (Glu), extrato de levedura (Y.E.), nitrato de sódio (S.N.), sulfato de amônio (A.S.) ou asparagina (Asn). Incubação a 30°C.

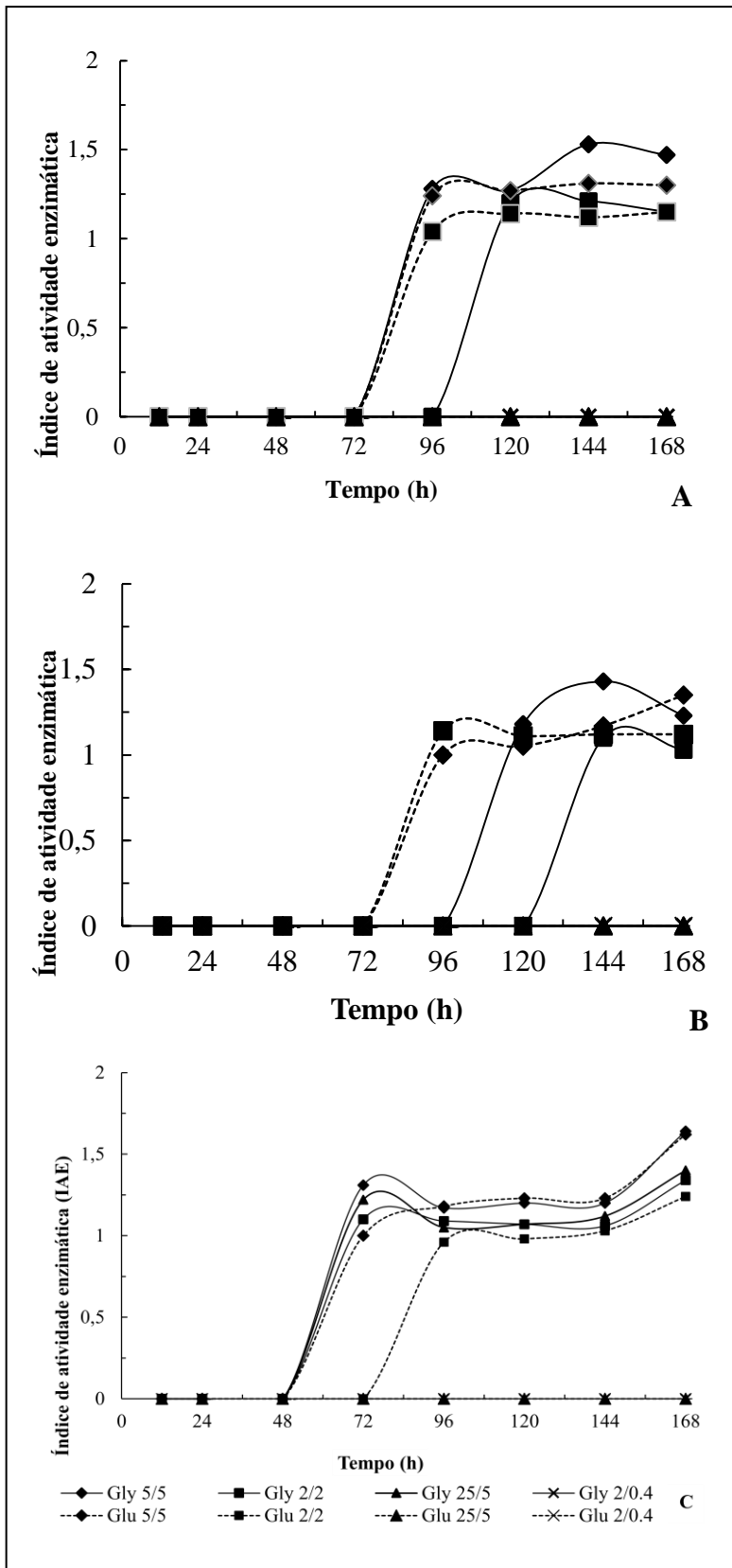
5.4 Efeito da fonte de carbono e da razão Carbono/Nitrogênio (C/N) sobre a expressão da atividade de L-asparaginase

O glicerol induziu IAE maiores do que a glicose (FIG. 29). As melhores razões C/N foram 1/10 e 1/1 em maiores concentrações de Asparagina (5g/L). A diminuição da concentração de asparagina, o aumento da concentração de glicerol e da razão C/N foi prejudicial à expressão enzimática, pois reduziu a atividade dessa enzima. A linhagem T22.2 produziu em tempos mais curtos, sustentou a produção em maiores variações de carbono e nitrogênio e em diferentes razões, mantendo o índice de expressão de L-asparaginase, conforme resultado apresentado na Figura 29.

Outros estudos também apontaram o glicerol como fonte de carbono que permitiu maior produção de L-asparaginase. Kavitha e colaboradores testaram diversos meios suplementados para o crescimento e produção de L-asparaginase por *Nocardia levis*, com as fontes de carbono arabinose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, sorbitol, amido, sacarose e xylose, comparados a um cultivo em um meio contendo glicerol 1%. Neste trabalho, o meio basal contendo glicerol obteve uma produção enzimática de 4.15 ± 0.063 U/mg de peso seco, seguido por arabinose (4.03 ± 0.16 U/mg), frutose (3.9 ± 0.223 U/mg) e galactose (3.75 ± 0.221 U/mg), com glicose foi obtida uma atividade de 0.32 ± 0.016 U/mg (KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

Entre as concentrações de glicerol testadas, as maiores taxas de produção alcançaram 4.28 ± 0.016 U/mg em 2% de glicerol. Entre as fontes de nitrogênio testadas no estudo mencionado, obteve-se as seguintes atividades: em extrato de levedura 4.56 ± 0.172 U/mg, em triptona 4.34 ± 0.076 U/mg, em l-asparagina 4.28 ± 0.016 U/mg, com l-glutamina 4.19 ± 0.008 U/mg, com peptona 3.86 ± 0.154 U/mg, com extrato de malte 2.47 ± 0.075 U/mg, e com extrato de carne 0.64 ± 0.061 U/mg (KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

Figura 29 – Efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre o índice de atividade de L-asparaginase



Fonte: Resultados da autora. As linhagens T6.2 (A), T8.3 (B) e T22.2 (C) foram cultivadas em meio suplementado com glicerol (Gly, linhas contínuas) ou glicose (Glu, linhas pontilhadas) e asparagina como fonte de nitrogênio. As concentrações de fonte de carbono/nitrogênio em g/L são indicadas na legenda.

5.5 Germinação e crescimento apical das linhagens selecionadas

O estudo de germinação e crescimento apical realizado por Trinci (1969) com as espécies *Aspergillus nidulans*, *Mucor hiemalis* e *Penicillium chrysogenum* em meio sólido e meio submerso (TRINCI, 1969), que direcionou os estudos de germinação, foram adaptados em análises em meio líquido e meio sólido, divididas em quatro fases de crescimento, apolar, polar, tubo germinativo e bi-germinado. Esta análise suscitou o questionamento da influência da própria membrana de celulose no crescimento fúngico e sua aparente contribuição para um processo de germinação mais precoce quando comparado ao meio sem essa membrana.

5.5.1 Germinação e Crescimento Apical do *Penicillium sp. T6.2*

O processo de germinação e crescimento apical do *Penicillium sp. T6.2*, apresentou algumas diferenças quando submetido ao cultivo em meio sólido com membranas de nitrocelulose e meio líquido sob agitação. Os resultados podem ser observados nas Figuras 30 e 31 dos cultivos em meio sólido e Figuras 32 e 33 em meio líquido, os dados das dimensões das estruturas no processo de germinação e crescimento apical se encontram nas Tabelas 10 e 11, e correspondem aos cultivos em meio sólido e meio líquido, respectivamente.

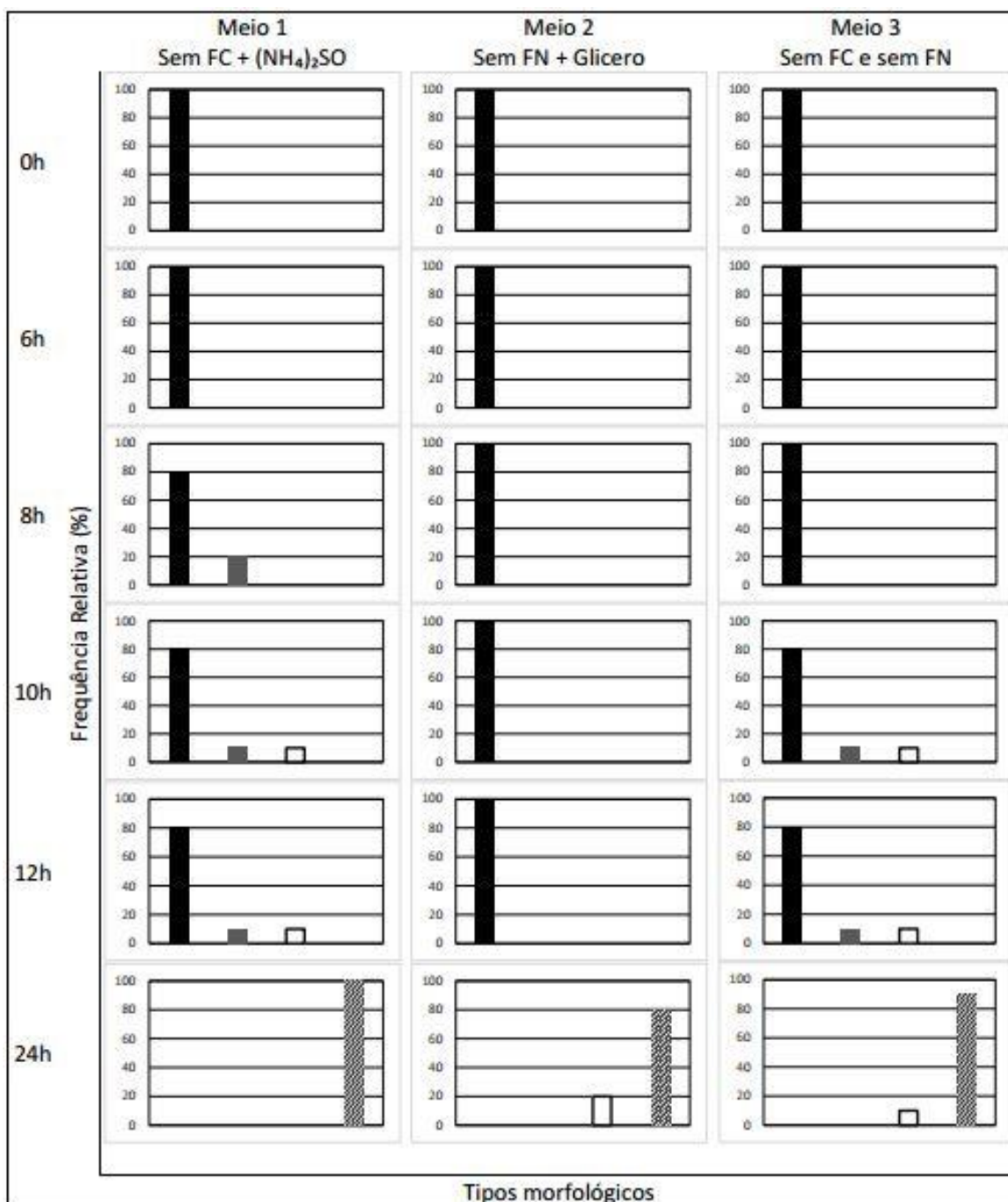
Submetido ao Meio 1 (Sem FC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), a polarização dos conídios começou ser observada a partir de 8h de incubação em meio sólido e somente após as 24h quando em meio líquido. A germinação no Meio 2 (Sem FN + Glicerol) foi observada após 12h no meio líquido e após as 24h no meio sólido. No Meio 3 (Sem FC e FN) não houve germinação no meio líquido e houve germinação a partir das 10h no meio sólido. No Meio 4 (Asn+Glicerol), a germinação ocorreu no mesmo horário, após 12h de cultivo, entretanto no meio líquido os tubos germinativos apresentavam um tamanho $119,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$ enquanto no meio sólido $9,1 \pm 1,1 \mu\text{m}$. No Meio 5 (Glu+Glicerol), foi possível observar conídios polarizados a partir das 8h em meio sólido, enquanto em meio líquido não foi observada germinação até 24h de cultivo. A germinação no Meio 6 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ +Glicerol) não foi observada no meio líquido e foi observada após 24h no meio sólido. A germinação foi observada após 24h em ambas condições, embora no meio líquido as dimensões dos tubos germinativos foram $7,1 \pm 2,1 \mu\text{m}$ e em meio sólido foram $227,2 \pm 39,7 \mu\text{m}$.

O maior crescimento desta linhagem foi observado com o Meio 5, após 24h de cultivo em meio sólido, quando foram observados tubos bi-germinados com $474,9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ de dimensão.

A ausência de fontes de carbono e nitrogênio em meio líquido não permitiram a germinação dos conídios, porém a germinação ocorreu quando em meio sólido, levantando o questionamento quanto a capacidade de utilização da nitrocelulose das membranas como substrato nutritivo.

A linhagem T6.2, identificada como *Penicillium roqueforti*, cresceu satisfatoriamente em meios com caseína e nitrato, resultado comparável com os fungos da seção Roqueforti que crescem bem em meios suplementados com creatina e nitrito (FRISVAD; SAMSON, 2004).

Figura 30– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.

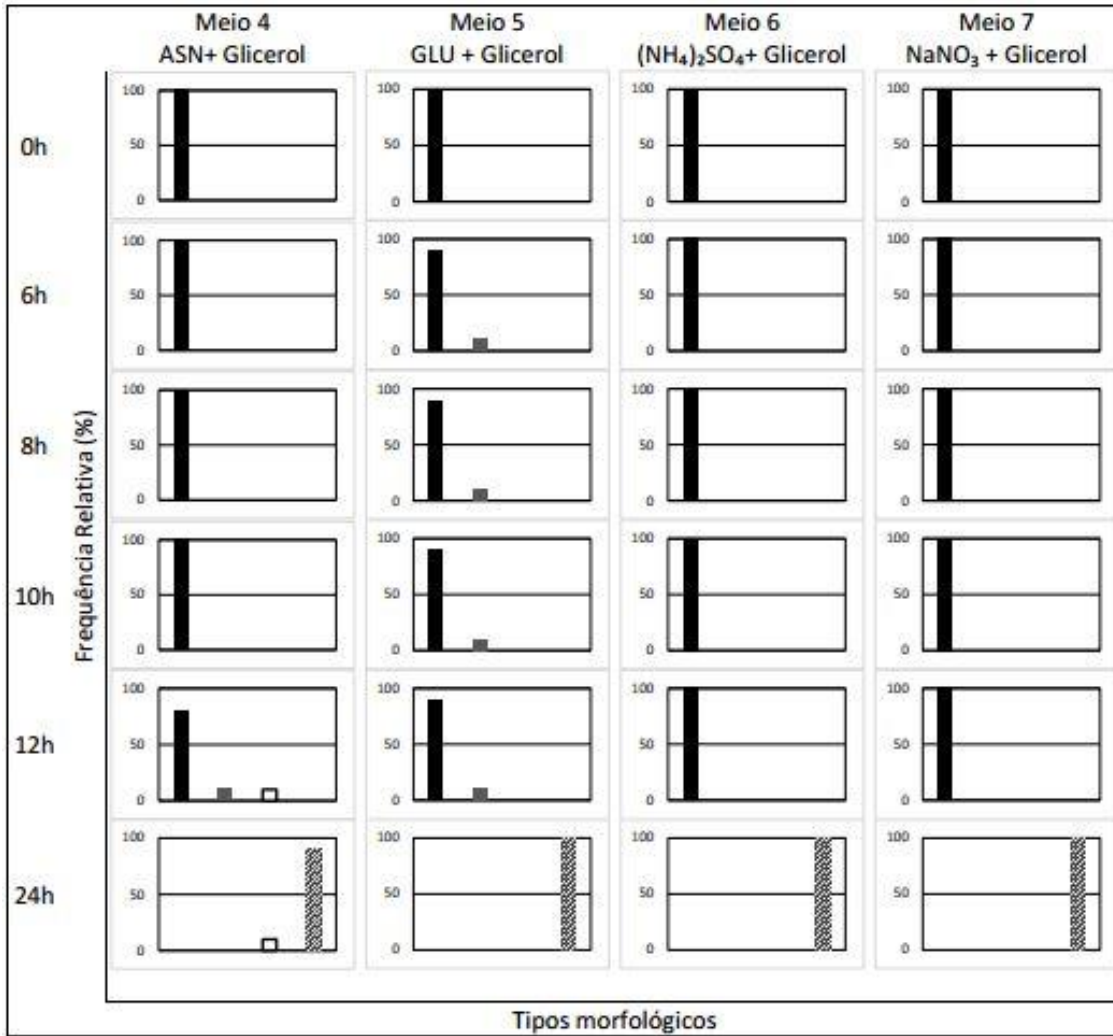


Fonte: Própria autora.

Legenda:

- Apolar
- Polar
- Tubo Germinativo
- ▨ Bi-Germinado

Figura 31– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ +Glicerol; Meio 7 – NaNO_3 + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato



Fonte: Própria autora.

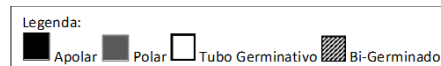
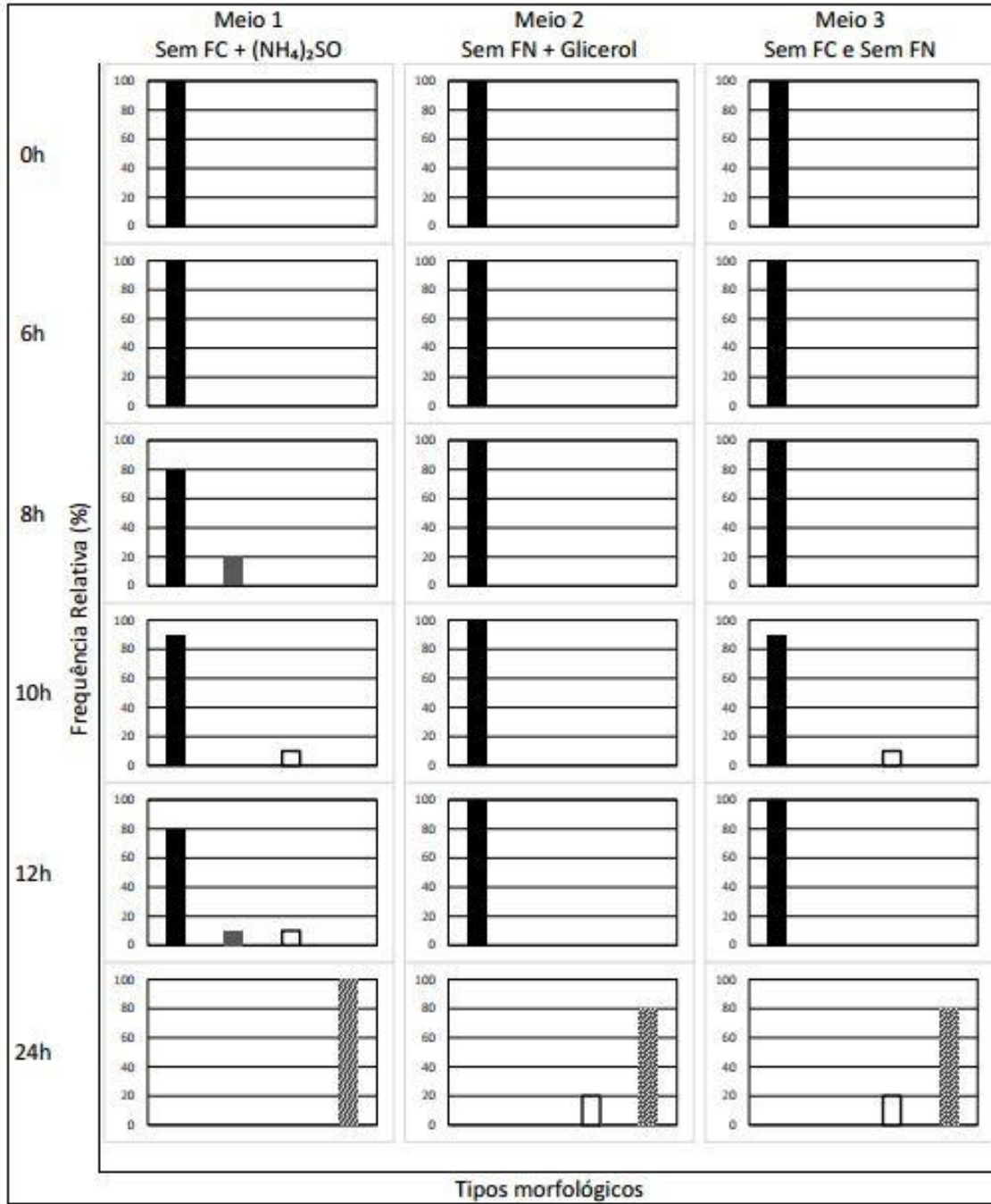


Tabela 10 - Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Penicillium sp.* T6.2 cultivados em meio sólido.

| | | Meio Sólido | | | |
|--|-----------|--|---------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC (NH ₄) ₂ SO ₄) | 0 | 2,3±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 4,2±2,0 | - | - | - |
| | 8 | 4,6±0,5 | 8,5±1,0 | - | - |
| | 10 | 4,3±1,3 | 7,3±1,7 | 32,9±13,6 | - |
| | 12 | 3,9±0,7 | - | - | 209,7±42,6 |
| | 24 | - | - | - | 197,6±63,1 |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 3,8±1,2 | - | - | - |
| | 6 | 2,4±0,3 | - | - | - |
| | 8 | 3,8±1,2 | - | - | - |
| | 10 | 3,5±1,7 | - | - | - |
| | 12 | 3,0±1,1 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 299,2±112,2 |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 3,7±2,5 | - | - | - |
| | 6 | 3,1±1,5 | - | - | - |
| | 8 | 6,0±1,4 | - | - | - |
| | 10 | 9,9±2,7 | - | 36,3±2,7 | - |
| | 12 | 8,3±3,0 | - | 19,6±2,0 | - |
| | 24 | - | - | - | 286,8±96,6 |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 3,2±0,3 | - | - | - |
| | 6 | 3,0±0,6 | - | - | - |
| | 8 | 3,7±0,8 | - | - | - |
| | 10 | 3,5±1,3 | - | - | - |
| | 12 | 3,9±0,2 | - | 9,1±1,1 | - |
| | 24 | - | - | - | 345,7±57,9 |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 2,2±0,6 | - | - | - |
| | 6 | 2,7±0,9 | - | - | - |
| | 8 | 2,9±0,6 | 6,0±0,9 | - | - |
| | 10 | 3,6±1,1 | - | - | - |
| | 12 | 4,5±1,9 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 474,9±0,7 |
| 6 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄ +Glicerol) | 0 | 2,4±0,8 | - | - | - |
| | 6 | 2,8±0,5 | - | - | - |
| | 8 | 2,4±0,8 | - | - | - |
| | 10 | 3,4±0,5 | - | - | - |
| | 12 | 2,4±0,6 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 332,7±57,9 |
| 7- NaNO ₃ (NO ₃ +Glicerol) | 0 | 2,9±1,0 | - | - | - |
| | 6 | 2,4±0,5 | - | - | - |
| | 8 | 3,0±1,1 | - | - | - |
| | 10 | 3,2±0,7 | - | - | - |
| | 12 | 5,6±1,8 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 227,2±39,7 |

Figura 32 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.



Fonte: Própria autora.

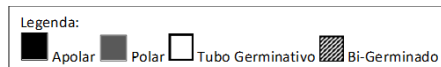
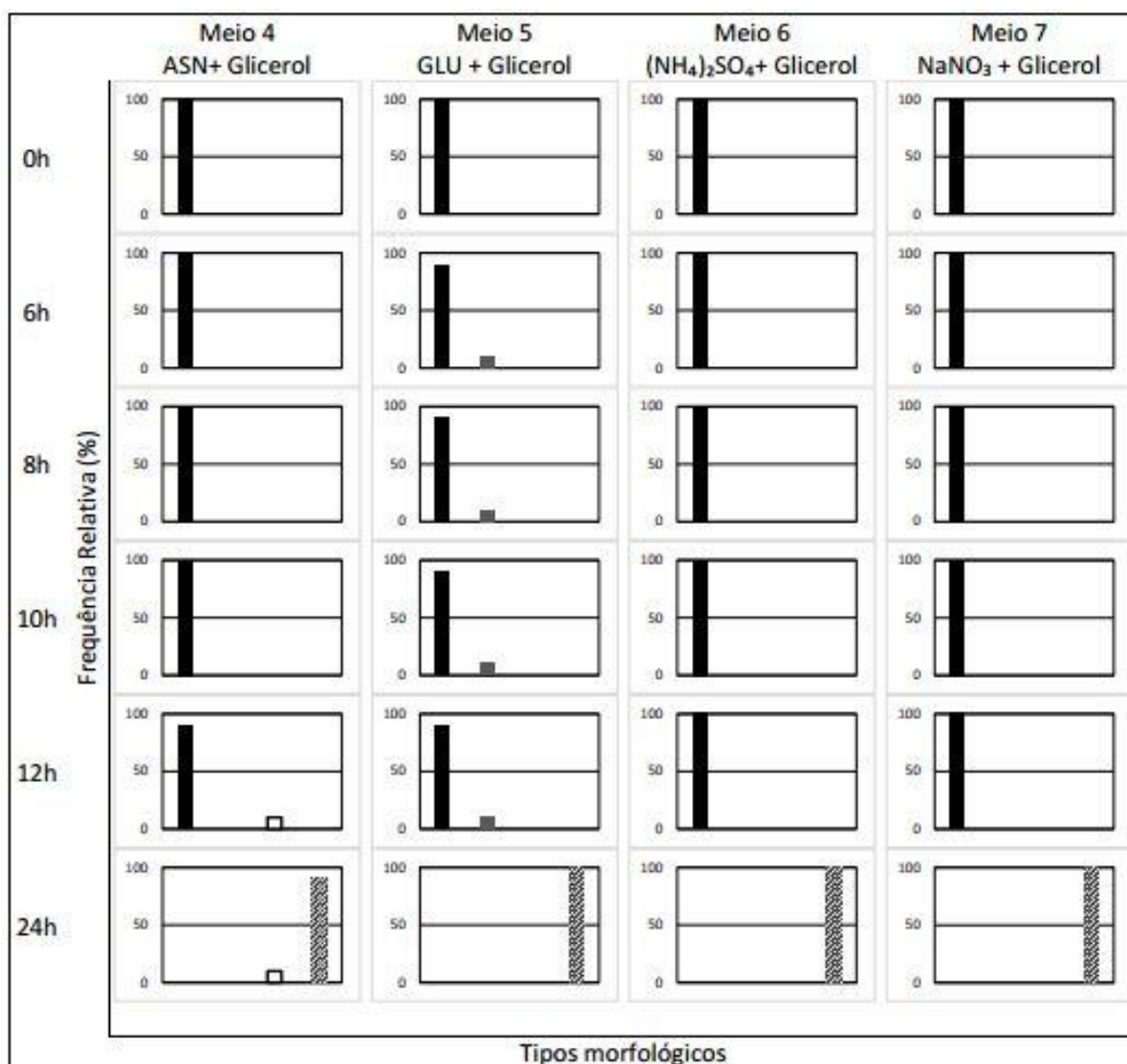


Figura 33– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T6.2 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ +Glicerol; Meio 7 – NaNO_3 + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato.



Fonte: Própria autora.

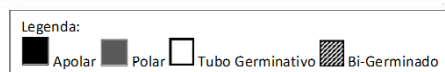


Tabela 11- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Penicillium* sp. T6.2 cultivados em meio líquido sob agitação.

| Meio Líquido | | | | | |
|--|-----------|--|-------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC (NH ₄) ₂ SO ₄) | 0 | 1,6±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 1,7±0,6 | - | - | - |
| | 8 | 1,7±0,3 | - | - | - |
| | 10 | 1,8±0,2 | - | - | - |
| | 12 | 2,1±0,3 | - | - | - |
| | 24 | 3,7±1,6 | - | 55,3 ± 0,9 | - |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 2,2±0,4 | - | - | - |
| | 6 | 2,5±0,1 | - | - | - |
| | 8 | 2,1±0,9 | - | - | - |
| | 10 | 2,2±0,2 | - | - | - |
| | 12 | 2,4±0,9 | - | 7,9 ± 1,8 | - |
| | 24 | 3,4±0,3 | - | - | - |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 2,1±0,6 | - | - | - |
| | 6 | 2,7±0,6 | - | - | - |
| | 8 | 2,7±0,6 | - | - | - |
| | 10 | 2,7±0,8 | - | - | - |
| | 12 | 2,6±0,8 | - | - | - |
| | 24 | 2,6±0,6 | - | - | - |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 2,1±0,7 | - | - | - |
| | 6 | 2,2±0,6 | - | - | - |
| | 8 | 1,9±0,3 | - | - | - |
| | 10 | 1,9±0,3 | - | - | - |
| | 12 | 1,6±0,4 | - | 119,8±1,7 | - |
| | 24 | 2,7±0,6 | - | - | - |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 2,4±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 2,4±0,7 | - | - | - |
| | 8 | 2,5±0,6 | - | - | - |
| | 10 | 2,3±0,7 | - | - | - |
| | 12 | 2,3±0,2 | - | - | - |
| | 24 | 2,3 ± 0,1 | - | - | - |
| 6 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄ +Glicerol) | 0 | 1,9±0,2 | - | - | - |
| | 6 | 1,6±0,4 | - | - | - |
| | 8 | 1,9±0,7 | - | - | - |
| | 10 | 1,9±0,4 | - | - | - |
| | 12 | 1,8±0,9 | - | - | - |
| | 24 | 2,1±0,8 | - | - | - |
| 7- NaNO ₃ (NO ₃ +Glicerol) | 0 | 1,6±0,3 | - | - | - |
| | 6 | 1,1±0,5 | - | - | - |
| | 8 | 1,6±0,6 | - | - | - |
| | 10 | 1,9±0,6 | - | - | - |
| | 12 | 2,6±0,6 | - | - | - |
| | 24 | - | - | 7,1±2,1 | - |

5.5.2 Germinação e Crescimento Apical do *Penicillium sp. T8.3*

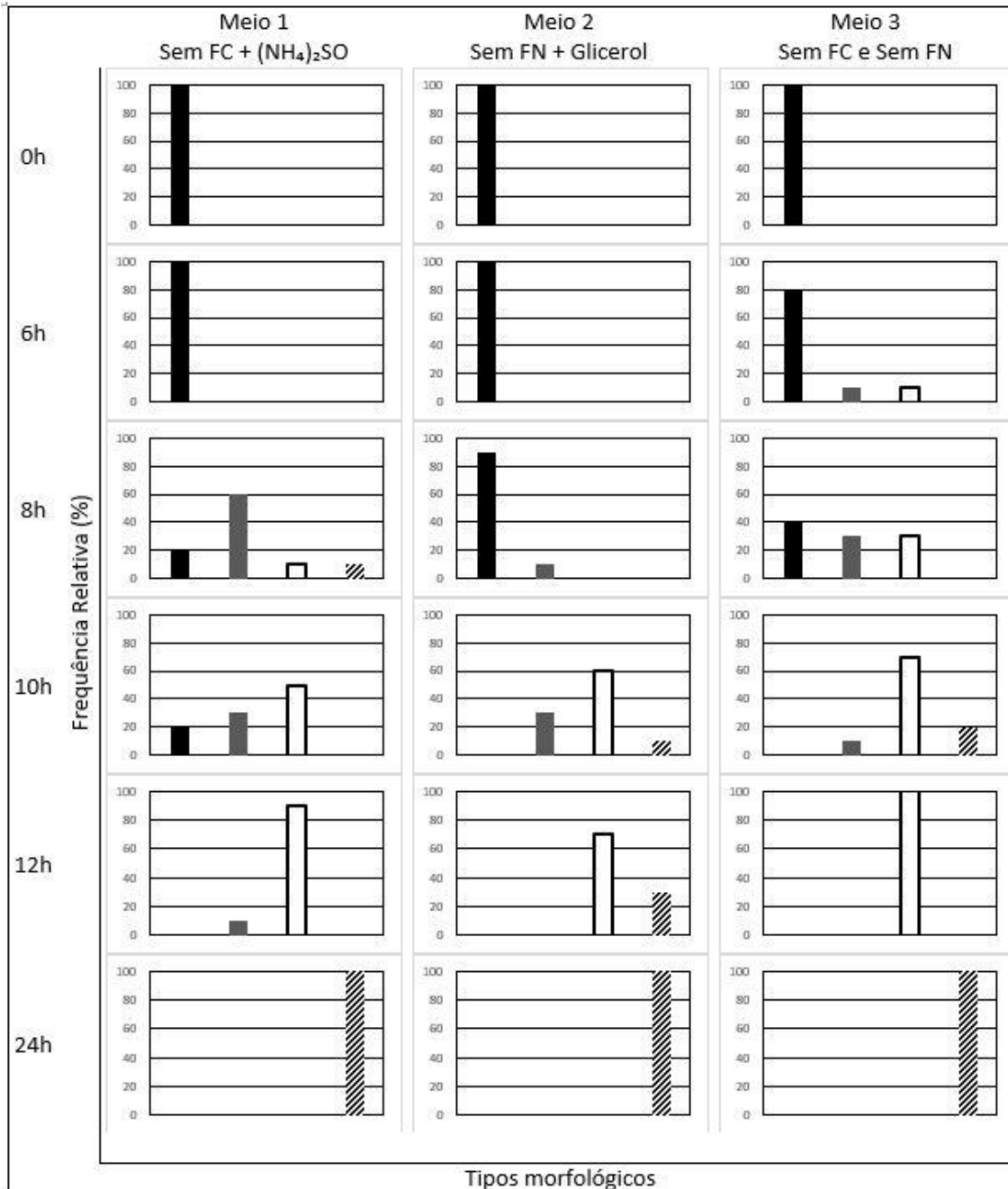
O *Penicillium sp. T8.3*, apresentou rápido crescimento neste estudo, porém mais uma vez a germinação em meio sólido foi mais rápida e produziu maior crescimento apical quando comparada ao cultivo em meio líquido. Os dados estão apresentados nas Figuras 34, 35 dos cultivos em meio sólido e Figuras 36 e 37 em meio líquido, as dimensões das estruturas no processo de germinação e crescimento apical estão nas Tabelas 12, cultivos em meio sólido e 13, em meio líquido.

A germinação no Meio 1 (Sem FC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ocorreu a partir das 8h no meio sólido e não ocorreu em meio líquido. Quando submetido ao Meio 2 (Sem FN + Glicerol) houve germinação a partir das 8h em meio sólido e das 12h em meio líquido. No Meio 3 (Sem FC e FN) após 6h de cultivo em meio sólido e após 12h de cultivo em meio líquido, houveram os primeiros indícios de germinação. No Meio 4 (Asn + Glicerol), a germinação em meio líquido foi observada após as 12h e em meio sólido após às 10h de incubação. Os conídios incubados Meio 5 (Glu + Glicerol) apresentaram germinação após 24h em meio líquido e após 8h em meio sólido. Quando incubados no Meio 6 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Glicerol), houve tubos bi-germinados após 24h em meio líquido e em meio sólido, após 10h. No Meio 7 (NaNO_3 + Glicerol) também foi verificada germinação após 10h no meio sólido e após 24h no meio líquido.

O Meio 5 (Glu + Glicerol), foi onde se observou maior crescimento na linhagem de *Penicillium sp. T8.3*, que apresentou tubos bi-germinados de dimensões $898,2 \pm 517,7 \mu\text{m}$ após 24h de cultivo. O menor crescimento em meio sólido ocorreu no Meio 1 (Sem FC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), onde após 24h de cultivo, os tubos possuíam $176,7 \pm 80,0 \mu\text{m}$ de comprimento. Também foi neste Meio 1 (Sem FC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), no cultivo em meio líquido, o menor crescimento desta linhagem, onde não foi verificada qualquer germinação.

O *Penicillium sp. T8.3* foi capaz de apresentar germinação no Meio 3 (Sem FC e FN), em ambas condições, embora com crescimento mais retardado quando em meio líquido.

Figura 34– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.



Fonte: Própria autora.

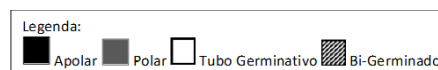
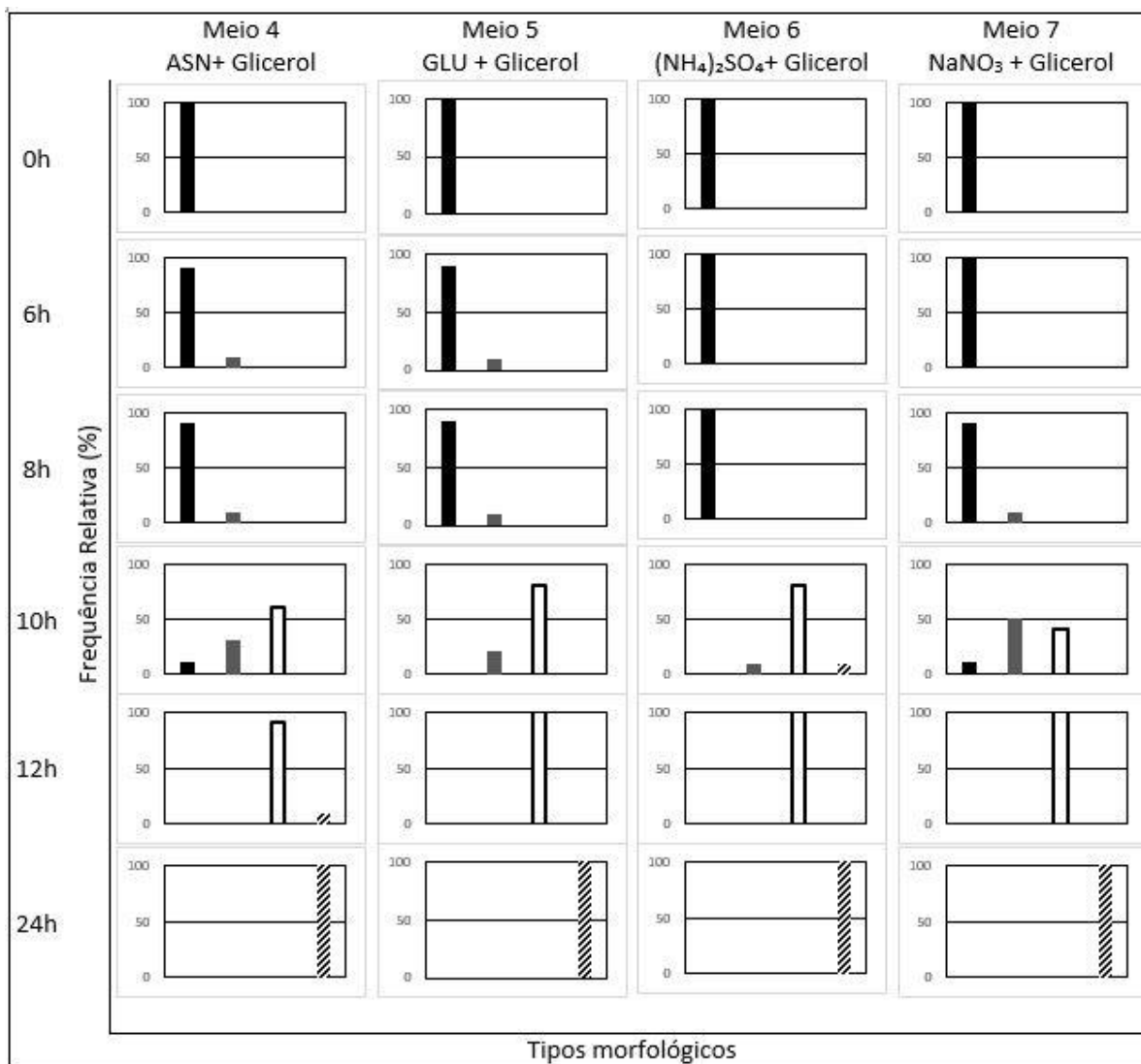


Figura 35 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ +Glicerol; Meio 7 – NaNO_3 + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato.



Fonte: Própria autora.

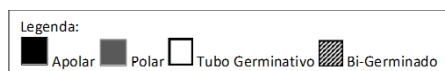


Tabela 12 - Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Penicillium* sp. T8.3 cultivados em meio sólido.

| Meio Sólido | | | | | |
|--|-----------|--|----------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) | 0 | 6,4±0,9 | - | - | - |
| | 6 | 5,5±0,5 | - | - | - |
| | 8 | - | 8,3±1,9 | 15,7±11,2 | - |
| | 10 | - | - | 12,9±2,4 | - |
| | 12 | - | - | 42,0±2,9 | - |
| | 24 | - | - | - | 176,7±80,0 |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 7,5±3,0 | - | - | - |
| | 6 | 8,8±2,9 | - | - | - |
| | 8 | - | - | 18,4±1,1 | - |
| | 10 | - | - | 42,6±15,3 | 29,7±5,9 |
| | 12 | - | - | 57,3±8,0 | 56,3±9,1 |
| | 24 | - | - | - | 518,3±166,9 |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 5,8±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 7,2±2,4 | 14,5±2,8 | - | - |
| | 8 | - | - | 33,3±11,4 | - |
| | 10 | - | - | 33,0±8,3 | 292,7±144,3 |
| | 12 | - | - | 111,3±25,1 | 267,7±67,0 |
| | 24 | - | - | - | 683,2±276,9 |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 7,9±1,5 | - | - | - |
| | 6 | 7,8±0,5 | - | - | - |
| | 8 | 9,1±1,5 | - | - | - |
| | 10 | 11,3±2,6 | - | 50,0±10,2 | - |
| | 12 | - | - | 157,1±33,0 | 92,3±12,1 |
| | 24 | - | - | - | 621,0±248,8 |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 5,5±1,4 | - | - | - |
| | 6 | 5,3±1,3 | - | - | - |
| | 8 | - | 11,9±0,3 | - | - |
| | 10 | - | - | 20,9±1,6 | - |
| | 12 | - | - | - | 71,6±28,5 |
| | 24 | - | - | - | 898,2±517,7 |
| 6 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NH_4 +Glicerol) | 0 | 5,0±1,7 | - | - | - |
| | 6 | 4,4±0,9 | - | - | - |
| | 8 | 4,7±0,9 | - | - | - |
| | 10 | - | - | 39,9±1,1 | 110,1±40,6 |
| | 12 | - | - | - | 105,3±39,6 |
| | 24 | - | - | - | 497,8±196,0 |
| 7 - NaNO_3 (NO_3 +Glicerol) | 0 | 5,4±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 5,4±0,3 | - | - | - |
| | 8 | 4,5±0,3 | - | - | - |
| | 10 | - | - | 19,8±4,3 | - |
| | 12 | - | - | 35,4±4,8 | - |
| | 24 | - | - | - | 328,8±131,1 |

Figura 36 – Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.

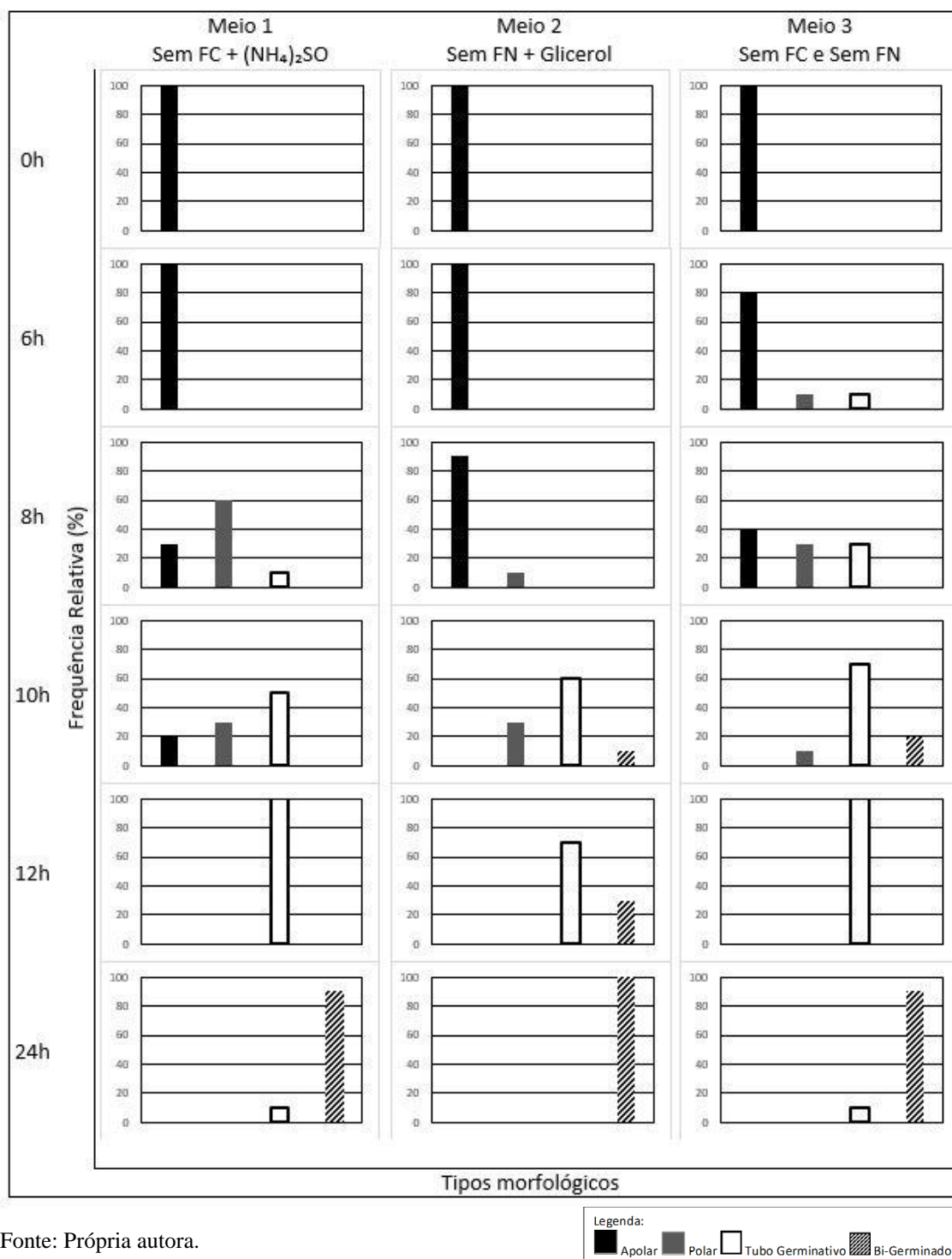
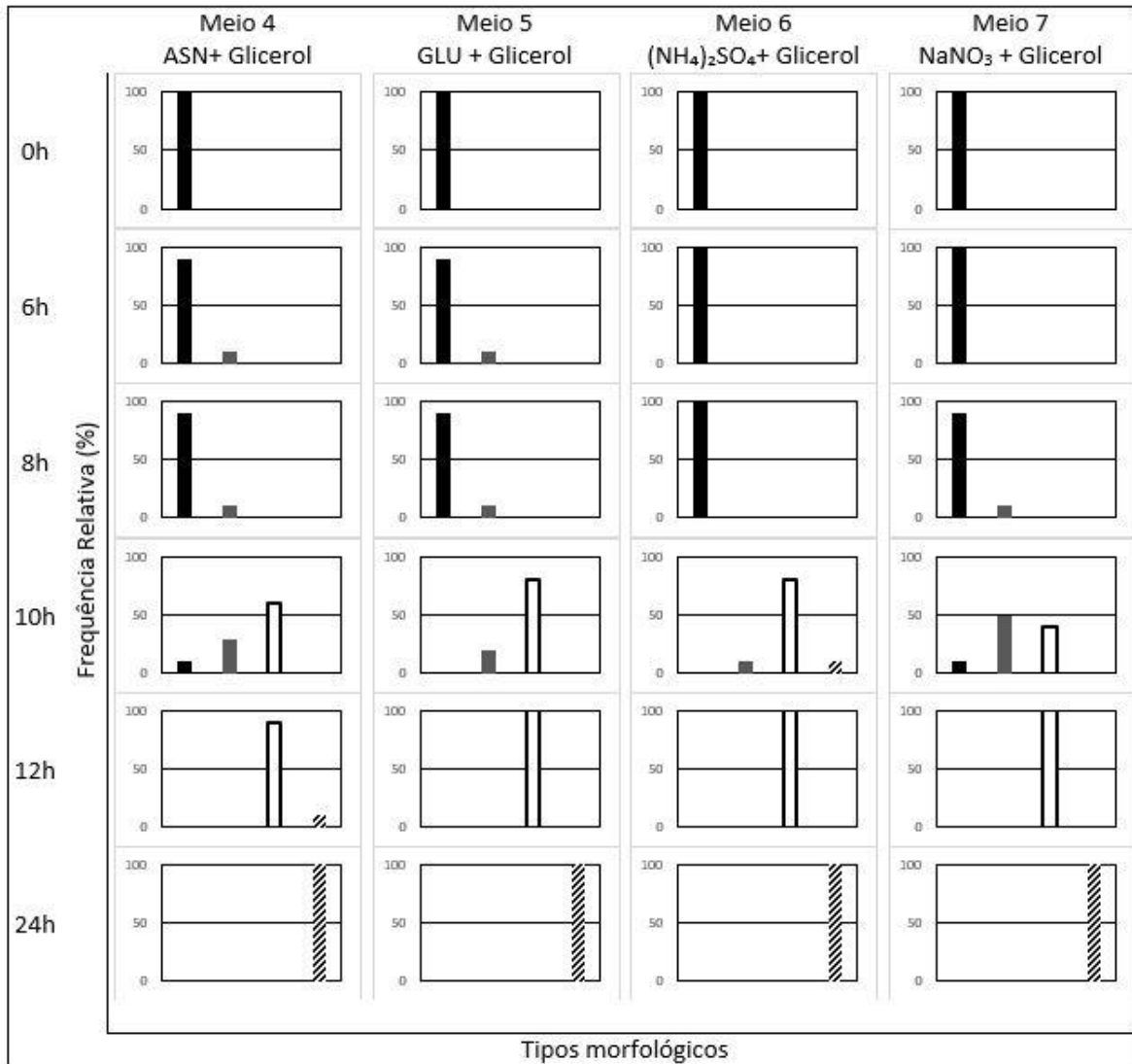


Figura 37– Germinação e crescimento apical de *Penicillium sp.* T8.3 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato.



Fonte: Própria autora.

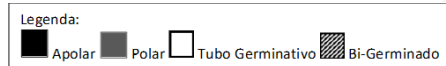


Tabela 13- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Penicillium* sp. T8.3 cultivados em meio líquido.

| | | Meio Líquido | | | |
|--|-----------|--|---------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) | 0 | 3,6±1,4 | - | - | - |
| | 6 | 3,4±0,9 | - | - | - |
| | 8 | 4,0±0,8 | - | - | - |
| | 10 | 3,9±0,6 | - | - | - |
| | 12 | 3,6±1,6 | - | - | - |
| | 24 | 4,6±3,0 | - | - | - |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 3,5±0,8 | - | - | - |
| | 6 | 3,1±0,9 | - | - | - |
| | 8 | 3,7±1,0 | - | - | - |
| | 10 | 3,3±0,5 | - | - | - |
| | 12 | 7,0±1,1 | 5,9±2,5 | 27,0±6,1 | - |
| | 24 | 1,6±0,5 | 3,8±0,2 | 6,0±0,1 | 41,7±8,2 |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 3,5±0,4 | - | - | - |
| | 6 | 3,3±0,5 | - | - | - |
| | 8 | 4,4±0,9 | - | - | - |
| | 10 | 4,8±1,2 | - | - | - |
| | 12 | 5,6±1,2 | 6,8±0,8 | 18,3±0,5 | 59,4±32,4 |
| | 24 | 4,6±1,1 | 6,5±1,5 | 31,2±12,3 | 273,8± 61,9 |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 2,7±0,2 | - | - | - |
| | 6 | 2,8±0,8 | - | - | - |
| | 8 | 2,8±1,0 | - | - | - |
| | 10 | 2,6±0,6 | - | - | - |
| | 12 | 3,2±0,6 | 5,7±1,6 | 16,8±7,6 | - |
| | 24 | 5,4±1,2 | - | 17,1±2,7 | - |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 2,0±0,9 | - | - | - |
| | 6 | 3,9 ± 1,2 | - | - | - |
| | 8 | 3,4±0,6 | - | - | - |
| | 10 | 4,6±0,6 | - | - | - |
| | 12 | 4,1± 0,7 | - | - | - |
| | 24 | 4,7±1,4 | - | - | 47,1±16,0 |
| 6 - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NH_4 +Glicerol) | 0 | 3,4±0,4 | - | - | - |
| | 6 | 3,5±1,0 | - | - | - |
| | 8 | 3,6±0,4 | - | - | - |
| | 10 | 6,2±1,9 | - | - | - |
| | 12 | 4,8±0,3 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 82,9 ± 0,7 |
| 7- NaNO_3 (NO_3 +Glicerol) | 0 | 3,1±1,1 | - | - | - |
| | 6 | 2,8±0,4 | - | - | - |
| | 8 | 4,4±0,9 | - | - | - |
| | 10 | 4,7±0,7 | - | - | - |
| | 12 | 4,6±0,9 | - | - | - |
| | 24 | - | - | 199,5 ± 72,0 | 69,3 ± 7,8 |

5.5.3 Germinação e Crescimento Apical do *Fusarium sp.* T22.2

As condições de germinação observadas nos cultivos do *Fusarium sp.* T22.2 também apontaram diferenças quando em meio líquido sob agitação e em meio sólido com membrana de nitrocelulose. As Figuras 38 e 39 dispõem os resultados dos cultivos em meio sólido e as Figuras 40 e 41 em meio líquido, os dados das dimensões das estruturas no processo de germinação e crescimento apical em meio sólido e meio líquido se encontram nas Tabelas 14 e 15.

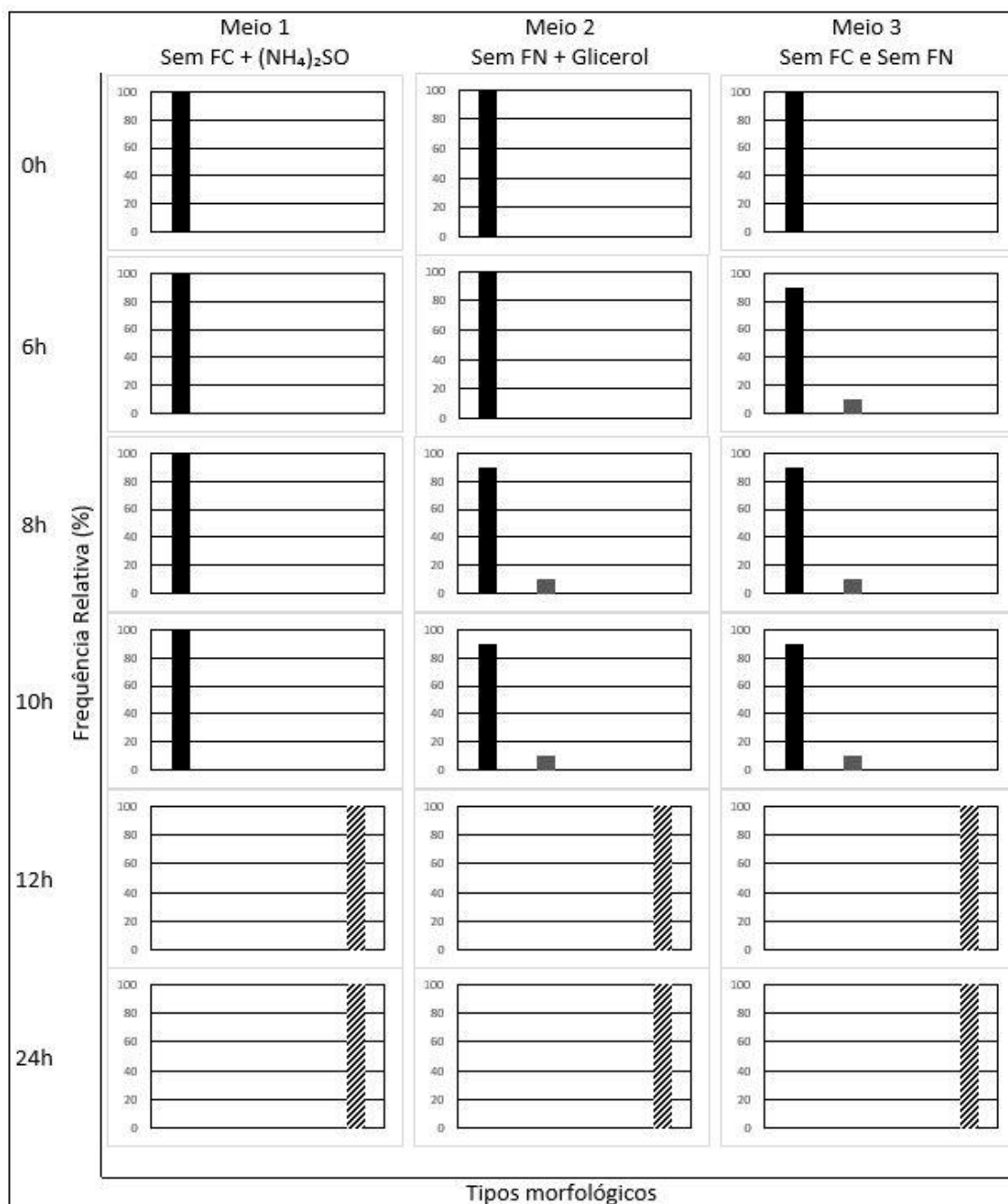
O cultivo dessa linhagem no Meio 1 (Sem FC + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) nas condições em meio líquido e em meio sólido, apresentou germinação a partir de 12h. No Meio 2 (Sem FN + Glicerol) sólido, foi possível observar formação de tubo germinativo a partir de 8h enquanto em meio líquido apenas após 24h. O Meio 3 (Sem FC e FN) possibilitou a germinação após 10h em meio sólido e 24h em meio líquido. No Meio 4 (Asn + Glicerol) a germinação ocorreu antes em meio líquido que em meio sólido, aquele em 12h e este em 24h. No Meio 5 (Glu + Glicerol), foi observada germinação em 8h no meio sólido e em 24h no meio líquido. O Meio 6 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + Glicerol) também levou a germinação em 24h no meio líquido e 10h no meio sólido. No Meio 7 (NaNO_3 + Glicerol), foi verificada germinação após 10h em meio líquido e após 12h em meio sólido.

Nesta linhagem, diferentemente dos *Penicillium*, em duas condições de cultivo ocorreram germinações em meio líquido antes do meio sólido, nos meios Meio 4 (Asn + Glicerol) e Meio 7 (NaNO_3 + Glicerol).

A condição que gerou menor crescimento foi no método com meio líquido o Meio 1 com crescimento em 24h de $107,2 \pm 37,4 \mu\text{m}$, enquanto no meio sólido foi o Meio 7 nas dimensões de $239,9 \pm 98,8 \mu\text{m}$ após 24h. o maior crescimento foi verificado em meio líquido no Meio 4 com $486,2 \pm 186,8 \mu\text{m}$ e no meio sólido foi o Meio 4 com dimensões $1072,0 \pm 299,9 \mu\text{m}$.

O *Fusarium sp.* foi capaz de germinar em todos os meios de cultivo, ainda que tardiamente, mas também neste caso, o crescimento e a germinação no meio sólido com as membranas de nitrocelulose foi superior aos meios líquidos sob agitação.

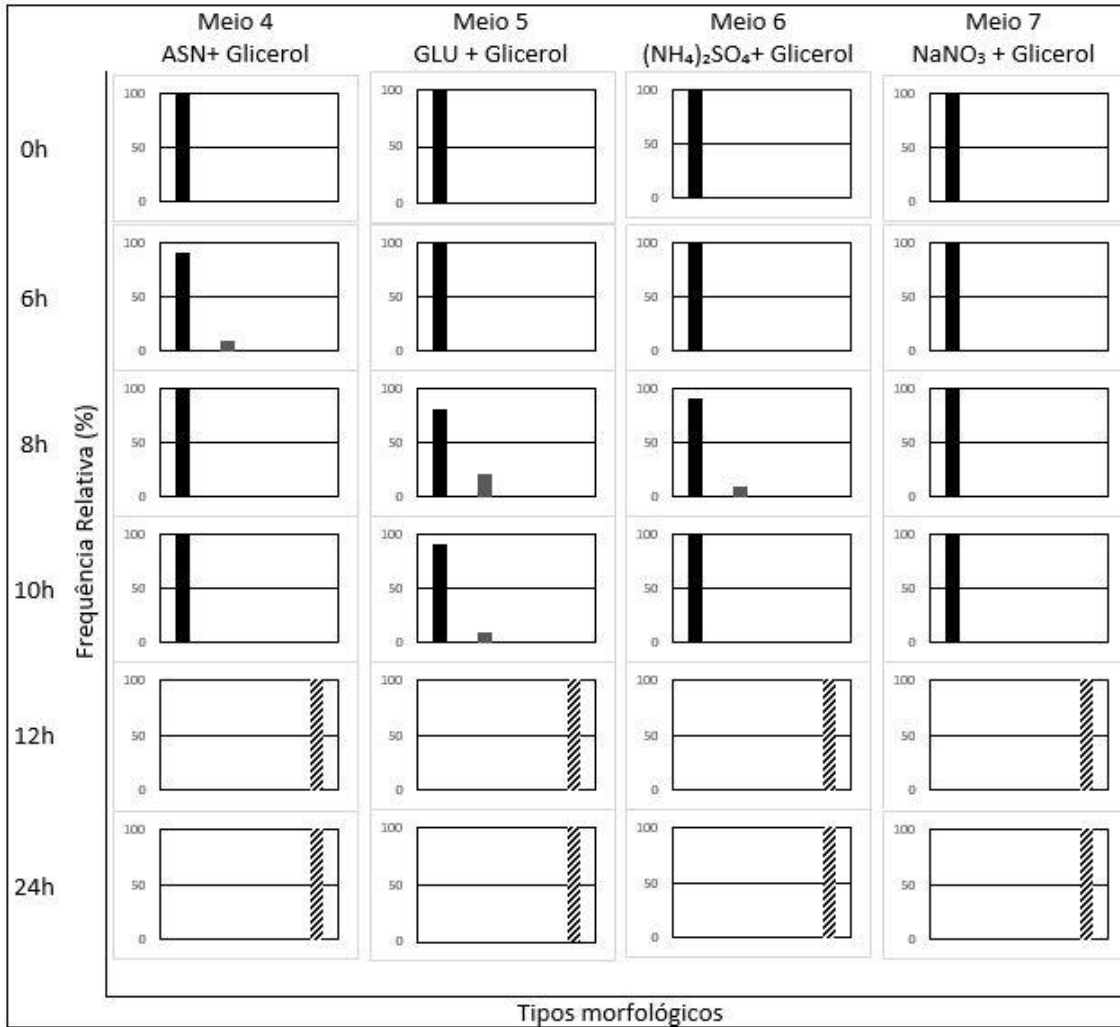
Figura 38 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.



Fonte: Própria autora.

Legenda:
 ■ Apolar ■ Polar □ Tubo Germinativo ▨ Bi-Germinado

Figura 39 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio sólido com membranas de nitrocelulose. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – (NH₃)₂SO₄+Glicerol; Meio 7 – NaNO₃ + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato.



Fonte: Própria autora.

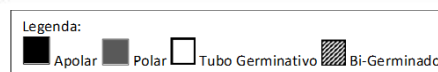
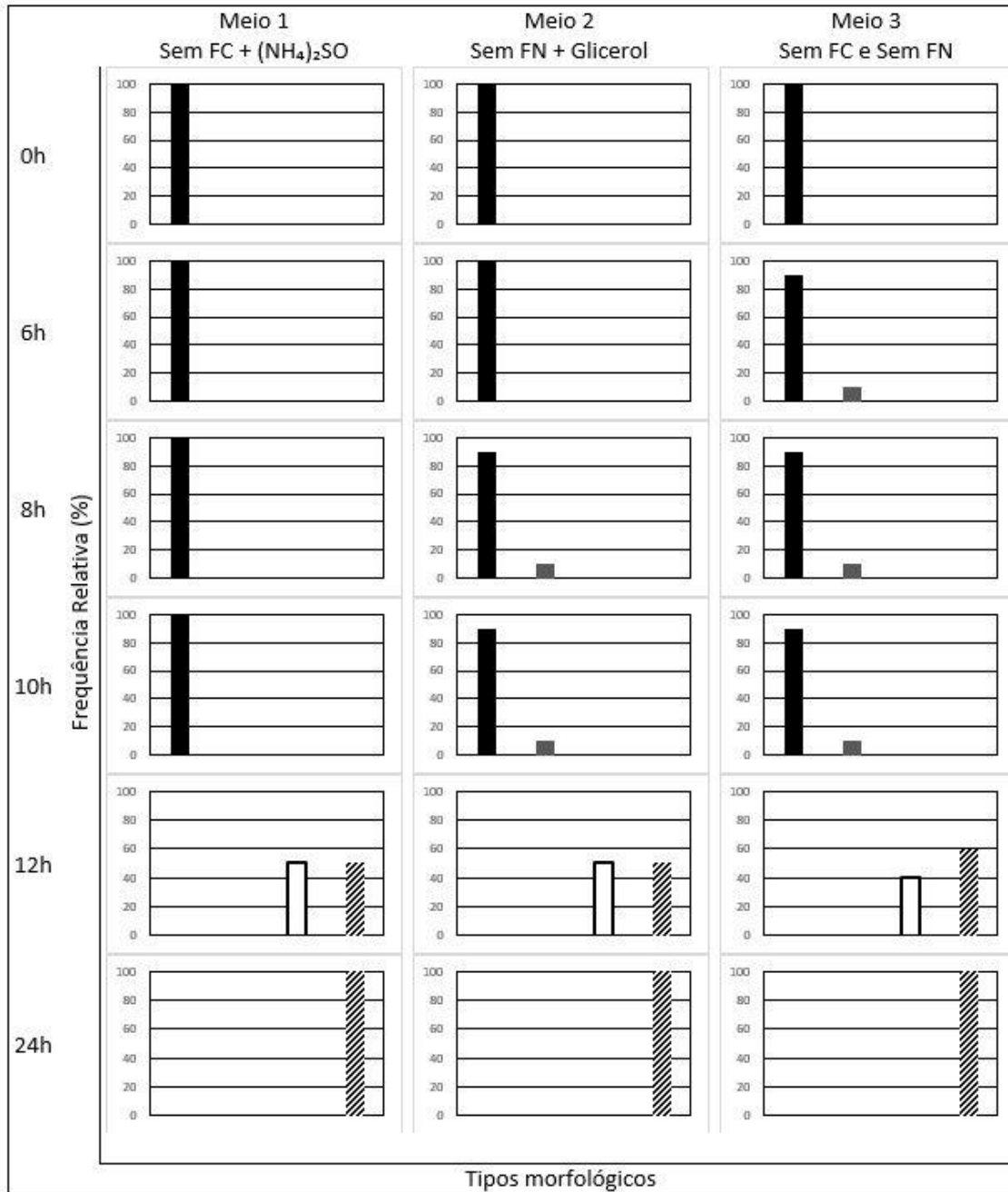


Tabela 14- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Fusarium sp.* T22.2 cultivados em meio sólido.

| Meio Sólido | | | | | |
|--|-----------|--|-------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC (NH ₄) ₂ SO ₄) | 0 | 5,9±2,1 | - | - | - |
| | 6 | 10,0±1,9 | - | - | - |
| | 8 | 13,5±4,9 | - | - | - |
| | 10 | 10,2±1,3 | - | - | - |
| | 12 | 10,9±1,0 | - | 46,6±11,6 | - |
| | 24 | - | - | - | 738,6±160,6 |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 10,6±2,6 | - | - | - |
| | 6 | 14,4±2,9 | - | - | - |
| | 8 | 12,6±3,6 | - | 22,9±8,2 | - |
| | 10 | 10,2±3,2 | - | 21,2±7,8 | - |
| | 12 | 17,3±6,7 | - | 47,9±14,9 | - |
| | 24 | - | - | - | 522,8±233,6 |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 9,4±2,2 | - | - | - |
| | 6 | 9,3±2,4 | - | - | - |
| | 8 | 9,4±2,3 | - | - | - |
| | 10 | - | - | 15,4±3,8 | - |
| | 12 | - | - | 27,6±18,6 | - |
| | 24 | - | - | - | 1072,0±299,9 |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 10,6±0,2 | - | - | - |
| | 6 | 11,6±1,3 | - | - | - |
| | 8 | 11,8±1,0 | - | - | - |
| | 10 | 11,9±1,2 | - | - | - |
| | 12 | 11,6±1,3 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 836,1±424,3 |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 8,4±2,9 | - | - | - |
| | 6 | 9,0±0,6 | - | - | - |
| | 8 | - | - | 16,5±4,8 | - |
| | 10 | - | - | 15,0±4,263 | - |
| | 12 | 12,9±1,4 | - | 14,9±4,0 | - |
| | 24 | - | - | - | 274,3±66,3 |
| 6 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄ +Glicerol) | 0 | 9,6±2,1 | - | - | - |
| | 6 | 10,9±2,8 | - | - | - |
| | 8 | 16,2±3,1 | - | - | - |
| | 10 | - | - | - | 37,3±6,8 |
| | 12 | - | - | - | 99,7±55,6 |
| | 24 | - | - | - | 438,9±210,8 |
| 7- NaNO ₃ (NO ₃ +Glicerol) | 0 | 11,4±0,5 | - | - | - |
| | 6 | 12,2±5,8 | - | - | - |
| | 8 | 13,8±2,8 | - | - | - |
| | 10 | 15,4±2,0 | - | - | - |
| | 12 | - | - | - | 67,1±5,2 |
| | 24 | - | - | - | 239,9±98,8 |

Figura 40– Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio líquido sob agitação. Meio 1 – Sem Fonte de Carbono + (NH₄)₂SO₄; Meio 2 – Sem Fonte de Nitrogênio + Glicerol; Meio 3 – Sem Fonte de Carbono e Sem Fonte de Nitrogênio. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura.



Fonte: Própria autora.

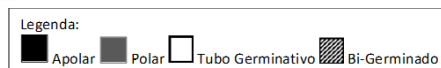
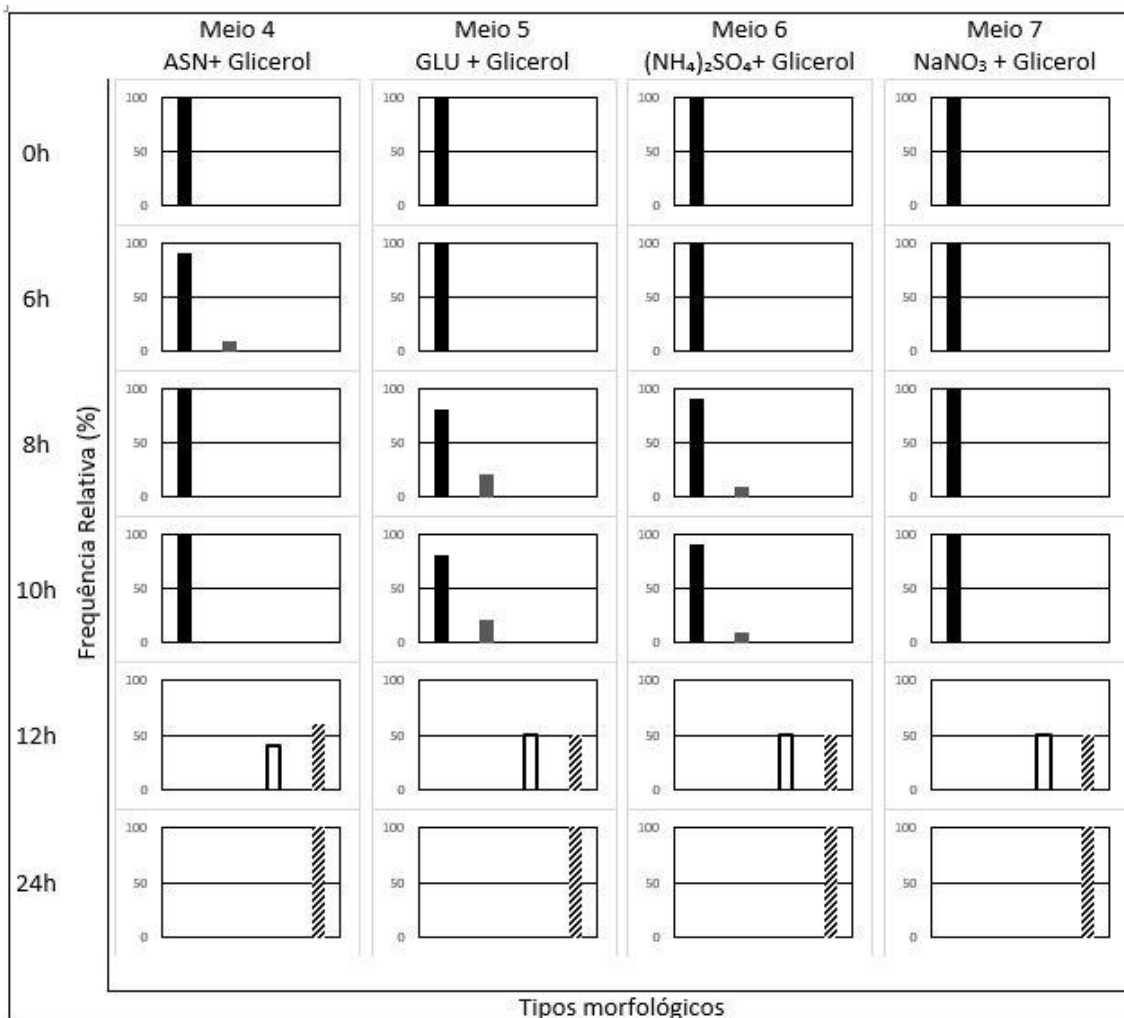


Figura 41 – Germinação e crescimento apical de *Fusarium sp.* T22.2 em meio líquido sob agitação. Meio 4 – ASN + Glicerol; Meio 5 – GLU + Glicerol; Meio 6 – $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ +Glicerol; Meio 7 – NaNO_3 + Glicerol. Acompanhamento da germinação dos esporos, polarização e crescimento apical por 24h, conforme indicado na figura. ASN: L-asparagina; GLU: glutamato.



Fonte: Própria autora.

Legenda:
 ■ Apolar ■ Polar □ Tubo Germinativo ▨ Bi-Germinado

Tabela 15- Dimensões das estruturas durante a germinação e crescimento apical do *Fusarium sp.* T22.2 cultivados em meio líquido.

| Meio Líquido (média ± sd em µm) | | | | | |
|--|-----------|--|------------|------------------|--------------|
| Meio | Tempo (H) | Estágio Germinativo - Dimensões (média ± sd em µm) | | | |
| | | Apolar | Polar | Tubo Germinativo | Bi-Germinado |
| 1 - Sem FC (NH ₄) ₂ SO ₄) | 0 | 9,7±2,9 | - | - | - |
| | 6 | 10,4±2,3 | - | - | - |
| | 8 | 10,3±0,9 | - | - | - |
| | 10 | 9,4±2,8 | - | - | - |
| | 12 | - | - | 19,9±5,8 | 47,8± 14,2 |
| | 24 | - | 13,3±4,3 | 31,4±10,5 | 107,2 ± 37,4 |
| 2 - Sem FN (Glicerol) | 0 | 10,5±0,8 | - | - | - |
| | 6 | 11,2±0,6 | - | - | - |
| | 8 | 11,0±0,7 | - | - | - |
| | 10 | 10,9±1,3 | - | - | - |
| | 12 | 10,4±2,3 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 122,5 ± 53,4 |
| 3 - Sem FC e FN | 0 | 8,7±1,0 | - | - | - |
| | 6 | 9,4±3,2 | - | - | - |
| | 8 | 13,3±1,5 | - | - | - |
| | 10 | 14,0±1,9 | - | - | - |
| | 12 | 13,0±3,3 | - | - | - |
| | 24 | 14,8±3,5 | - | - | 125,9±66,0 |
| 4 - ASN (Asn+Glicerol) | 0 | 14,5±1,9 | - | - | - |
| | 6 | 14,2±2,4 | - | - | - |
| | 8 | 14,6±3,5 | - | - | - |
| | 10 | 22,6±6,3 | - | - | - |
| | 12 | - | - | 44,0±6,6 | - |
| | 24 | - | - | 55,7±6,8 | 486,2±186,8 |
| 5 - GLU (Glu+Glicerol) | 0 | 11,4±2,9 | - | - | - |
| | 6 | 11,2±2,0 | - | - | - |
| | 8 | 12,1±2,2 | - | - | - |
| | 10 | 15,0±2,9 | - | - | - |
| | 12 | 14,5±3,0 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 395,1± 47,6 |
| 6 - (NH ₄) ₂ SO ₄ (NH ₄ +Glicerol) | 0 | 9,6±1,7 | - | - | - |
| | 6 | 11,2±2,5 | - | - | - |
| | 8 | 13,0±3,7 | - | - | - |
| | 10 | 12,4±2,3 | - | - | - |
| | 12 | 13,3±2,3 | - | - | - |
| | 24 | - | - | - | 202,0±56,2 |
| 7- NaNO ₃ (NO ₃ +Glicerol) | 0 | 8,9±1,9 | - | - | - |
| | 6 | 10,2±2,2 | - | - | - |
| | 8 | 11,2±2,0 | - | - | - |
| | 10 | - | 49,3± 27,8 | - | - |
| | 12 | - | - | 63,2±20,6 | - |
| | 24 | - | - | - | 456,9±185,4 |

5.6 Dosagem da atividade de L-asparaginase

5.6.1 Determinação da atividade de L-asparaginase

Os meios B1 e B2, apresentaram um maior crescimento fúngico e maior atividade enzimática, comparado ao meio B3, resultado esperado devido à ausência de fonte de nitrogênio em sua composição. A atividade enzimática começou a ser observada após 24h, para os fungos *Penicillium sp.* (T6.2) e *Fusarium sp.* (T22.2) e após 48h para o *Penicillium sp.* (T6.2). A maior atividade enzimática foi observada no meio B1, pelo *Fusarium sp.* (T22.2), após 72h de incubação, onde verificou-se uma atividade de 0,7 U/ml/min, este meio composto por glicerol/ASN 1/1 (5g/L). Uma unidade internacional (UI) de atividade de L-asparaginase, definida como a quantidade enzimática necessária para a conversão de 1 μ mol de amônia por ml por minuto a 37°C (MAHAJAN *et al.*, 2012).

Tabela 16 – Atividade de L-asparaginase após 30 min de tempo reacional incubado a 37°C. Linhagens cultivadas em meio líquido estacionário a 30°C, após 24h, 48h e 72h. Valores expressos em U/ml/min. Linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 cultivadas nos Meios B1, B2 e B3

| <i>Penicillium sp. T6.2</i> | | | |
|-----------------------------|---------------|----------------|----------------|
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 0,2 \pm 0,3 | 0,4 \pm 0,6 | 7,7 \pm 2,6 |
| B2 | 0,2 \pm 0,2 | 0,3 \pm 0,27 | 2,0 \pm 0,8 |
| B3 | 0 \pm 0 | 0,5 \pm 0,5 | 0,9 \pm 0,7 |
| <i>Penicillium sp. T8.3</i> | | | |
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 0 \pm 0 | 0,3 \pm 0,4 | 0 \pm 0 |
| B2 | 0 \pm 0 | 0,5 \pm 0,8 | 0 \pm 0,1 |
| B3 | 0 \pm 0 | 0,2 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,3 |
| <i>Fusarium sp. T22.2</i> | | | |
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 0,2 \pm 0,4 | 0 \pm 0,2 | 12,6 \pm 4,6 |
| B2 | 0,2 \pm 0,4 | 0,2 \pm 0,2 | 1,4 \pm 1,6 |
| B3 | 0,2 \pm 0,3 | 0,3 \pm 0,4 | 0,7 \pm 0,7 |

Fonte: Própria autora.

Considerando os efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade enzimática, optou-se por realizar os ensaios a $37^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ uma vez que a principal aplicação esperada desta enzima é o seu uso terapêutico, de administração essencialmente parenteral. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho, foi obter uma enzima potencialmente utilizável nesta faixa de temperatura. Entretanto, outros trabalhos demonstraram diferentes temperaturas ideais, desde $30 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013) , temperatura ambiente em 21°C (DUNLOP; ROON, 1975) e 37°C (PAUL; COOKSEY, 1981).

Como a concentração de substrato influencia na velocidade de reação, estabeleceu-se uma concentração equivalente da solução de asparagina em todos os ensaios, de maneira que o produto dessa reação fosse um parâmetro confiável.

Os resultados obtidos na produção da enzima são comparáveis aos verificados na literatura, cuja faixa de produção se mostrou bastante variável, sendo obtidos os valores: 44,38 UI/ml (BASKAR; SAHADEVAN, 2012), 0,76 IU/mg.(DHEVAGI; POORANI, 2006), 26,1 – 132,6 IU e 0,9 – 9,4 U/mg (ABDEL-FATTAH; OLAMA, 2002) e 0.259 IUml⁻¹ (DHALE; MOHAN-KUMARI, 2014).

O cultivo para dosagem enzimática foi realizado em meio líquido estacionário em condições de livre demanda de oxigênio, condições muito adequadas para os organismos estudados. Mas há relatos de produção de L-asparaginase por *Escherichia coli* em condições anaeróbicas com taxas de produção enzimática entre 100 e 1000 vezes maiores que quando submetida a condições aeróbias (CEDAR; SCHWARTZ, 1968), entretanto não há indícios da produção dessa enzima por fungos anaeróbios.

A atividade de L-asparaginase pode ocorrer ainda sobre outros aminoácidos, além da asparagina, como caseína e a L-glutamina (CEDAR; SCHWARTZ, 1968; MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013). A atividade de L-asparaginase é de 4% sobre a L-glutamina quando comparada ao substrato natural, o que pode comprometer a comparação. (CLAUSEN; CHRISTENSEN, 1986). A presença de amônio também pode ser um inibidor enzimático, e há indícios que o L-aspartato também seja (JR, 1971; KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; MARSH; DENIS; WRISTON, 1977; NOVAK; PHILLIPS, 1973). A atividade de uma L-asparaginase produzida por *Cladosporium sp.*, foi também inibida não competitivamente por SDS (*sodium dodecyl sulfate*), glutatona, L-cistina e β -mercaptoetanol (MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013).

5.6.2 Determinação da concentração e Amônio

A concentração de amônio para as três linhagens cresceu no decorrer do tempo de incubação, como reflexo da utilização das fontes de nitrogênio presentes nos meios. As linhagens de *Penicillium sp.* apresentaram maior concentração de amônio, quando submetidas aos meios B1 e B2, enquanto a linhagem de *Fusarium sp.* apresentou maior concentração de amônio no meio B2 até as primeiras 48h, sendo superado pelo meio B1 nas horas seguintes. No meio B3, o meio sem fontes de nitrogênio, foram obtidas as menores concentrações.

Tabela 17– Concentração de amônio no sobrenadante. Linhagens cultivadas em meio líquido estacionário a 30°C, após 24h, 48h e 72h. Valores expressos em µg/ml. Linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 em cultivadas nos Meios B1, B2 e B3.

| <i>Penicillium sp. T6.2</i> | | | |
|-----------------------------|------------|--------------|--------------|
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 29,0 ± 0,9 | 140,7 ± 8,5 | 145,6 ± 35,0 |
| B2 | 4,5 ± 0,4 | 23,0 ± 3,1 | 31,2 ± 7,5 |
| B3 | 1,8 ± 1,2 | 3,7 ± 1,4 | 0,2 ± 0,4 |
| <i>Penicillium sp. T8.3</i> | | | |
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 2,0 ± 0,7 | 20,2 ± 9,47 | 58,5 ± 2,5 |
| B2 | 0,1 ± 0,2 | 6,7 ± 4,9 | 1,8 ± 1,7 |
| B3 | 0,0 ± 0,2 | 2,7 ± 0,8 | 0,1 ± 0,2 |
| <i>Fusarium sp. T22.2</i> | | | |
| | <i>24h</i> | <i>48h</i> | <i>72h</i> |
| B1 | 34,7 ± 5,0 | 51,9 ± 3,9 | 276,7 ± 32,9 |
| B2 | 14,0 ± 2,2 | 139,8 ± 13,7 | 72,0 ± 18,2 |
| B3 | 1,0 ± 0,7 | 4,9 ± 1,3 | 0 ± 0 |

Fonte: Própria autora.

6 CONCLUSÕES

Considerando as duas metodologias de triagem, três linhagens fúngicas foram selecionadas como potenciais produtoras, sendo que a transferência de discos de micélio evidenciou a expressão da enzima mais rapidamente. Assim, os resultados apontaram as linhagens T6.2, T8.3 e T22.2 como opções interessantes para o desenvolvimento de um processo biotecnológico de produção de L-asparaginase.

As fontes de carbono e nitrogênio, bem como a razão entre elas nos processos de cultivo dos fungos filamentosos para produção de enzimas terapêuticas são importantes fatores para a otimização da produção. Os resultados mostraram que a linhagem *Fusarium sp.* T22.2 apresenta boas características biotecnológicas, como a rapidez na produção enzimática e crescimento de biomassa sustentando a produção de L-asparaginase em diferentes condições, o que a torna adequada para o desenvolvimento de um processo produtivo.

Os três produtores de L-asparaginase, *Penicillium sp.* T6.2, *Penicillium sp.* T8.3 e *Fusarium sp.* T22.2 foram capazes de utilizar fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio, tanto primárias quanto secundárias, incluindo sais de nitrato e amônio de baixo custo, uma flexibilidade que é vantajosa para o desenvolvimento de processos produtivos.

O desenvolvimento do meio de cultivo Bacelar 1 (B1), um meio com razão C/N=1 (Glicerol 5g/L e L-asparagina 5g/L) possibilitou os melhores resultados na produção e dosagem da enzima. Este meio possui uma fonte de carbono de baixo custo e que também pode ser obtida como coproduto de outros processos biotecnológicos, viabilizando ainda mais seu aproveitamento industrial. Estudos adicionais podem prover substitutos mais baratos a fonte de nitrogênio utilizada, a L-asparagina, sendo estes resultados apresentados um ponto de partida para a otimização das condições ideais de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, Y. R.; OLAMA, Z. A. L -asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture : evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 115–122, 2002.

AL-HATMI, A. M. S.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. *Fusarium*: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005464, 7 abr. 2016.

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2010.

AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. **Global Experiment for the International Year of Chemistry - pH of the Planet**American Chemical Society, 2011Disponível em: <www.acs.org/content/dam/acsorg/global/iyc2011/global-water-experiment-acidity.pdf>

ANDO, M. et al. Selective apoptosis of natural killer-cell tumours by l-asparaginase. **British Journal of Haematology**, v. 130, n. 6, p. 860–868, set. 2005.

ANESE, M. et al. Effect of formulation on the capacity of l-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2837–2842, nov. 2011.

ANVISA. **NCM - Sistema Harmonizado**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/datavisa/Substancia/NCM.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BANCEWICZ, R. et al. **O teste da fé: Os cientistas também creem**. 1. ed. Viçosa, MG: Editora Ultimato, 2013.

BASKAR, G.; SAHADEVAN, R. Optimization of Culture Conditions and Bench-Scale Production of L - Asparaginase by Submerged Fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal of Microbiology and Biotecnology Microbiology and Biotecnology**, v. 22, p. 923–929, 2012.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, 2015.

BOYSEN, M. E.; JACOBSSON, K.-G.; SCHNÜRER, J. Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1523–1526, 2000.

BRENDA - THE COMPREHENSIVE ENZYME INFORMATION SYSTEM. **Information on EC 3.5.1.1 - asparaginase**. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=3.5.1.1#SYNONYMS>>. Acesso em: 7 ago. 2016.

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 L-asparagine lose their susceptibility to the effects of guinea pig serum in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 118, p. 121–148, 1963a.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of Guiana 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**, v. 118, p. 99–120, 1963b.

BURKI, F. The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 5, p. a016147–a016147, 1 maio 2014.

CASTRO, L. A. S. DE. Processamento de Amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, v. 93, p. 37 p, 2002.

CAVALIER-SMITH, T. Only six kingdoms of life. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 201, p. 1251–1262, 2004.

CEDAR, H.; SCHWARTZ, J. H. Production of L-asparaginase II by Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 96, n. 6, p. 2043–2048, 1968.

CHARLOP-POWERS, Z. et al. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. **eLife**, v. 2015, n. 4, p. 1–10, 2015.

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

CICCARELLI, F. D. et al. Toward Automatic Reconstruction of a Highly Resolved Tree of Life. **Science**, v. 311, n. 5765, 2006.

CIESAROVÁ, Z.; KISS, E.; BOEGL, P. Impact of l-Asparaginase on Acrylamide Content in Fried Potato and Bakery Products. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 45, n. 4, p. 141–146, 2006.

CLAUSEN, N.; CHRISTENSEN, E. Determination of L-asparaginase activity in serum by thin-layer chromatography: application to the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 161, p. 111–116, 1986.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Determinação de nitrogênio amoniacal em águas: método da nesslerização com destilação prévia: método de ensaio**. CETESB ed. São Paulo: [s.n.].

COONEY, D. A.; HANDSCHUMACHER, R. E. L-asparaginase and l-asparagine metabolism. **Annual Rev. Pharmacol.**, v. 10, p. 421–440, 1970.

DE VOS, L. et al. Genome-Wide Macrosynteny among Fusarium Species in the Gibberella fujikuroi Complex Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphisms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114682, 8 dez. 2014.

DHALE, M. A.; MOHAN-KUMARI, H. P. A comparative rapid and sensitive method to screen l-asparaginase producing fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 102, p. 66–68, 2014.

DHEVAGI, P.; POORANI, E. Isolation and characterization of L -asparaginase from marine actinomycetes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 514–520, 2006.

DUNLOP, P. C.; ROON, R. J. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. **Journal of bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 1017–1024, 1975.

EBRAHIMINEZHAD, A. et al. *Chlorella vulgaris*, a novel microalgal source for L -asparaginase production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 214–217, 2014.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EMBL-EBI). **FASTA**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/help/index.html>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

FIOCRUZ. **L-asparaginase passará a ser produzido no Brasil pela Fiocruz em 2015**. Disponível em: <<http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=1430>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

FOURIE, G. et al. Evidence for inter-specific recombination among the mitochondrial genomes of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 605, 2013.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticilliate penicillia and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 49, p. 1–173, 2004.

GESTO, D. S. et al. Unraveling the Enigmatic Mechanism of L -Asparaginase II with QM/QM Calculations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 19, p. 7146–7158, 15 maio 2013.

GOLTERMAN, H. L. Direct nesslerization of ammonia and nitrate in fresh-water. **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 27, n. 1, p. 99–101, 1 fev. 1991.

GOMES, V. S.; AMADOR, T. A. Estudos publicados em periódicos indexados sobre decisões judiciais para acesso a medicamentos no Brasil: uma revisão sistemática. **Cad. Saúde Pública**, v. 31, n. 3, p. 451–462, 2015.

GULATI, R.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A rapid plate assay for screening l-asparaginase producing micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 23–26, jan. 1997.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Resistência do corpo à Infecção: I. Leucócitos, Granulócitos, Sistema Monocítico-Macrofágico e Inflamação. In: **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 447–456.

HALEY, E. E.; FISCHER, G. A.; WELCH, A. D. The requirement for L-asparagine of mouse leukemia cells L5178Y in culture. **Cancer research**, v. 21, p. 532–536, 1961.

HANSEN, M. E.; LUND, F.; CARSTENSEN, J. M. Visual clone identification of *Penicillium commune* isolates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, n. 2, p. 221–229, 2003.

HILL, J. M. et al. Response to Highly Purified l-Asparaginase during Therapy of Acute Leukemia Response to Highly Purified L-Asparaginase during Therapy of Acute Leukemia.

CANCER RESEARCH, v. 29, p. 1574–1580, 1969.

HOUBRAKEN, J. et al. A taxonomic and phylogenetic revision of *Penicillium* section *Aspergilloides*. **Stud Mycol**, v. 78, p. 373–451, 2014.

IMADA, A. et al. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85–99, 1 maio 1973.

INCA. A Saúde e o Lucro. **Rede Câncer**, v. 20, p. 28–30, dez. 2012.

INCA. Remédio (?) amargo. **Rede Câncer**, v. 29, p. 30–32, abr. 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2015.

JHA, S. K. et al. MICROBIAL L-ASPARAGINASE: A REVIEW ON CURRENT SCENARIO AND FUTURE PROSPECTS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 9, p. 3076–3090, 2012.

JR, J. C. W. L-Asparaginase. In: BOYER, P. D. (Ed.). . **The Enzimes: IV Hidrolisis**. 3. ed. New York: Academic Press, 1971. p. 101–121.

KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A Study on L-Asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

KEGG: KYOTO ENCYCLOPEDIA OF GENES AND GENOMES. **KEGG Enzyme: 3.5.1.1**. Disponível em: <http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:3.5.1.1>. Acesso em: 7 ago. 2016.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. II Studies on the Nature of the Active serum constituent: Histological mechanism of the regression: Tests for Effects of Guinea pig serum on lymphoma cells in vitro: . **The Journal of experimental medicine**, v. 98, n. 6, p. 583–606, dez. 1953.

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

KUMAR, S.; DASU, V. V.; PAKSHIRAJAN, K. Localization and production of novel L-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 223–229, fev. 2010.

LABUDA, R.; TANCINOVÁ, D.; HUDEC, K. Identification and enumeration of *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. **Ann Agric Environ Med**, v. 10, p. 61–66, 2003.

LIMA-PERIM, J. E. et al. Linking the Composition of Bacterial and Archaeal Communities to Characteristics of Soil and Flora Composition in the Atlantic Rainforest. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146566, 11 jan. 2016.

LIMA, C. S. et al. *Fusarium tupiense* sp. nov., a member of the *Gibberella fujikuroi* complex

that causes mango malformation in Brazil. **Mycologia**, v. 104, n. 6, p. 1408–1419, 1 nov. 2012.

LIN, Z. et al. Species-Specific Detection and Identification of Fusarium Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104195, 20 ago. 2014.

LIU, C. et al. Clinical utility and implications of asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 26, n. 11, p. 2303–2309, 9 nov. 2012.

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

MAHAJAN, R. V et al. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 2, p. 122–126, abr. 2013.

MANFIO, G. P. Microorganismos. In: **Microorganismos**. São Paulo, SP: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - UNICAMP, 2009. p. 113–145.

MAPA. **Biotecnologia Agropecuária**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2010.

MARSH, J. W.; DENIS, J.; WRISTON, J. C. Glycosylation of *Escherichia coli* L-asparaginase. **The Journal of biological chemistry**, v. 252, n. 21, p. 7678–84, 10 nov. 1977.

MARTINELLI, P. R. P.; SANTOS, J. M. DOS. Microscopia eletrônica de varredura de fungos nematófagos associados a *Tylenchulus semipenetrans* e *Pratylenchus jaehni*. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 5, p. 809–816, 2010.

MERCK & CO. ELSPAR®. . 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RENAME 2010**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RENAME 2013**. 8. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas em Oncologia**. Brasília: [s.n.].

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RENAME 2014**. 9. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M.; NELSON, G. H. Physiologic Activity of Some Fungal Estrogens Produced by *Fusarium*. **CANCER RESEARCH**, p. 2319–2322, 1968.

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

NAKASHIMA, T. et al. Effect of L-asparaginase and asparagine deprivation on RNA metabolism in mouse leukemia L 5178Y cells in suspension culture. **Cancer Res**, v. 36, n. 10,

p. 3616–3621, 1976.

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*, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidação de Aminoácidos e Produção de Ureia. In: **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2011. p. 673–706.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy , Biology , and Clinical Aspects of Fusarium Species. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 7, n. 4, p. 479–504, 1994.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. **Fusarium species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press University Park and London, 1983.

NOVAK, E. K.; PHILLIPS, A. W. L-Glutamine as a Substrate for L-Asparaginase from *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 117, n. 2, p. 593–600, 1973.

OLD, L. J. et al. Treatment of Lymphosarcoma in the dog with L-asparaginase. **Cancer**, v. 20, p. 1066–1070, 1967.

OLIVEIRA, E. M. M. et al. The role of the GATA factors Gln3p, Nil1p, Dal80p and the Ure2p on ASP3 regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 20, n. 1, p. 31–37, 15 jan. 2003.

ORLANDELLI, R. C. et al. ENZIMAS DE INTERESSE INDUSTRIAL: PRODUÇÃO POR FUNGOS E APLICAÇÕES. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, p. 97–109, 2012.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.

PAUL, J. H.; COOKSEY, K. E. Regulation of L-asparaginase in a *Chlamydomonas* species in response to ambient concentrations of combined nitrogen. **Journal of bacteriology**, v. 147, n. 1, p. 9–12, jul. 1981.

PETERSON, R. E.; CIEGLER, A. L-asparaginase production by various bacteria. **Applied microbiology**, v. 17, n. 6, p. 929–30, jun. 1969.

PIETERS, R. et al. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238–249, 15 jan. 2011.

RASBAND, W. **ImageJ** Bethesda, Maryland, USA National Institute of Mental Health, , 2016. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/>>

RIDDELL, R. W. Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265–270, 1950.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 4. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SAMUDIO, I.; KONOPLEVA, M. Asparaginase unveils glutamine-addicted AML. **Blood**, v. 122, n. 20, p. 3398–3400, 2013.

SARQUIS, M. I. DE M. et al. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489–492, ago. 2004.

SCHOCH, C. L. et al. Finding needles in haystacks: Linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. **Database**, v. 2014, p. 1–21, 2014.

SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. Política Nacional de Medicamentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 206–209, abr. 2000.

SEVER, Z. et al. Identification of Fusarium Species Isolated From Stored Apple Fruit in Croatia / Identifikacija Vrsta Roda Fusarium Izoliranih S Plodova Jabuke Nakon Skladištenja. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 463–70, 1 jan. 2012.

SILVA, T. J. DA. **Seleção de fungos filamentosos para fermentação cítrica de glicerina residual da produção de biodiesel**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI, 2011.

SOBOPE. **Desabastecimento de L-asparaginase**. Disponível em: <http://soboep.org.br/apex/f?p=106:13:14287896637375::NO::DFL_PAGE_ID:661>. Acesso em: 1 mar. 2016a.

SOBOPE. **Parceria entre SOBOPE e MS garante tratamento para leucemia infantil**. Disponível em: <http://soboep.org.br/apex/f?p=106:13::NO::DFL_PAGE_ID:901>. Acesso em: 1 mar. 2016b.

STAJICH, J. E. et al. The Fungi. **Current Biology**, v. 19, n. 18, p. R840–R845, set. 2009.

STERN, M. L.; PHILLIPS, A. W.; GOTTLIEB, A. J. Physical properties of L-asparaginase from *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 2, p. 719–727, 1976.

THEANTANA, T.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants : cytotoxicity properties Sources of endophytic fungi Isolation of endophytic fungi Identification of endophytic fungi Identification was based on colony and hyphal. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2009.

TIME. Secret from the Guinea Pigs. **TIME**, v. 89, n. 15, p. 67–68, 1967a.

TIME. Fingerprints from the Virus. **TIME**, v. 89, n. 15, p. 70, 1967b.

TIME. Enzyme v. Leukemia. **TIME**, v. 90, n. 1, p. 77, 1967c.

TIME. Answers About L-Asparaginase. **TIME**, v. 90, n. 23, p. 65, 1967d.

TRINCI, A. P. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. **Journal of general microbiology**, v. 57, n. 1, p. 11–24, jul. 1969.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 2000, p. 343–371, set. 2014.

WANG, H. et al. Accurate and practical identification of 20 *Fusarium* species by seven-locus sequence analysis and reverse line blot hybridization, and an in vitro antifungal susceptibility study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1890–1898, 2011.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**, p. 315–322, 1990.

WINDELS, C. E. **Current status of *Fusarium* taxonomy** *Phytopathology*, 1991.

WOESE, C. R.; KANDLERT, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms : Proposal for the domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, n. June, p. 4576–4579, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **WHO Model List of Essential Medicines - 18th List (April 2013)**. 19. ed. [s.l.] World Health Organization - WHO, 2013.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Curva Analítica da dosagem de L-asparaginase e amônio

O preparo da curva analítica de amônio, para a dosagem de L-asparaginase e amônio no meio de cultivo, foi realizado com a utilização do padrão de Sulfato de Amônio. O padrão de sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5mg/ml, foi preparado conforme descrito no Anexo A. Foram utilizados diferentes volumes deste padrão de Sulfato de Amônio e feitas diluições, para obtenção de soluções com concentração final de amônio $[\text{NH}_4]$, denominadas P1=2,5; P2=5; P3=10; P4=25 e P5=50 $\mu\text{g/ml}$.

Preparou-se 750 μL de Reagente de Nessler e 300 μL de água destilada em microtubos. Aos tubos preparados, adicionou-se 100 μL das soluções padrão preparadas (P1, P2, P3, P4 e P5) a partir do padrão de sulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5mg/ml.

A leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda em 450nm, após 15 minutos de incubação das amostras a $28\pm 2^\circ\text{C}$ em banho maria. O Tabela 18 apresenta as leituras de absorvância realizadas, a média e o desvio padrão dessas leituras.

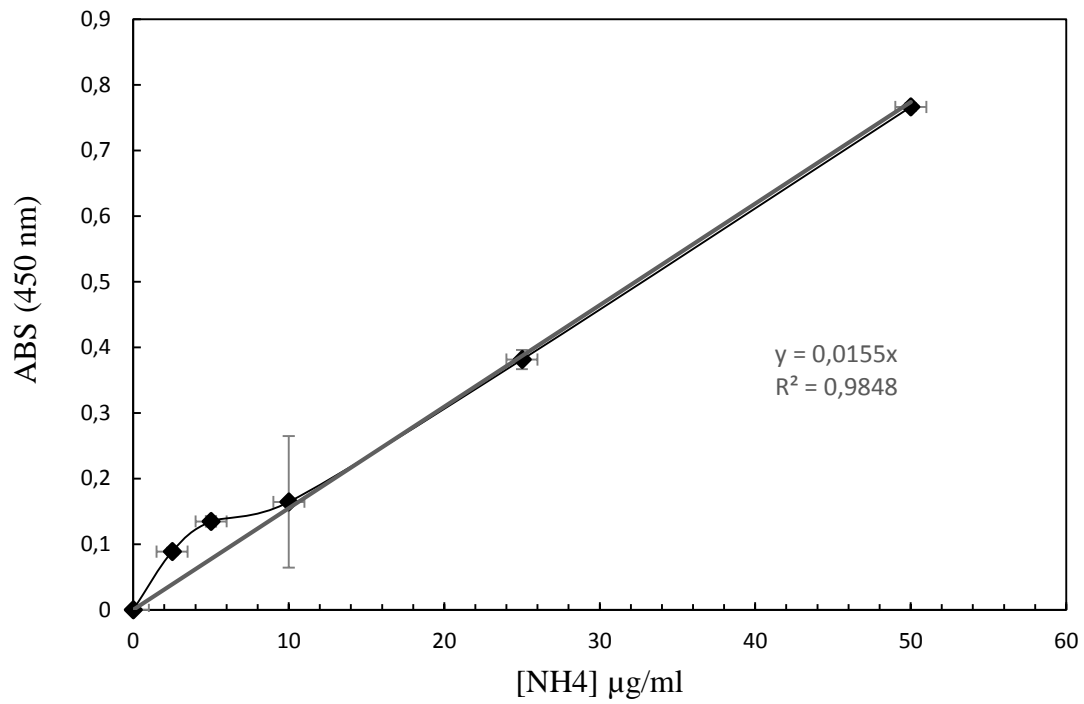
A equação da reta obtida pela curva analítica gerada (GRAF. 1) foi utilizada nos cálculos de atividade enzimática e de amônio livre no meio de cultura.

Tabela 18– Dados da curva analítica de dosagem de L-asparaginase. ABS: leituras de absorvância realizadas; \bar{X} : média; e SD: desvio padrão das leituras.

| Tubo | Água (μL) | Padrão de amônio $[\text{NH}_4]$ (P1 a P5) (μL) | $[\text{NH}_4]$ (mg/ml) | Reagente de Nessler (μL) | Absorvância (450nm) | | | | |
|--------|------------------------|--|-------------------------|---------------------------------------|---------------------|-------|-------|---------------|--------|
| | | | | | ABS 1 | ABS 2 | ABS 3 | \bar{X} ABS | SD ABS |
| Branco | 400 | - | 0 | 750 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P1 | 300 | 100 | 2,5 | 750 | 0,084 | 0,095 | 0,087 | 0,088 | 0,006 |
| P2 | 300 | 100 | 5 | 750 | 0,136 | 0,142 | 0,126 | 0,135 | 0,008 |
| P3 | 300 | 100 | 10 | 750 | 0,280 | 0,100 | 0,113 | 0,164 | 0,100 |
| P4 | 300 | 100 | 25 | 750 | 0,396 | 0,381 | 0,367 | 0,381 | 0,014 |
| P5 | 300 | 100 | 50 | 750 | 0,772 | 0,760 | 0,767 | 0,766 | 0,006 |

Fonte: Própria autora.

Gráfico 1 – Curva analítica de amônio para dosagem de L-asparaginase e Amônio.
Equação da reta: $y = 0,0155x$; $R^2 = 0,9848$



Fonte: Própria autora.

ANEXOS

Anexo A – Meios de Cultivo e Soluções

Tabela A 1 – Meio Czapek-Dox

| Componentes | Quantidade |
|--|-------------------|
| Sacarose | 30,0g |
| NaNO ₃ | 3,0g |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 1,3g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| KCl | 0,5g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 6,3±0,2

Fonte:FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 2 – Meio Czapek-Dox Modificado

| Componentes | Quantidade |
|--------------------------------------|-------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 6,0g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0g |
| NaCl | 0,5g |
| L-asparagina | 10,0g |
| Glicerol | 2,0g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2g |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,0005g |
| Azul de Bromotimol | 0,007% |
| Ágar | 2% |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 5,5

Fonte: GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997

Tabela A 3– Meio Czapek Extrato de Levedura – CYA

| Componentes | Quantidade |
|--|-------------------|
| NaNO ₃ | 3,0g |
| Extrato de Levedura | 5,0g |
| Sacarose | 30,0g |
| K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 1,3g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| KCl | 0,5g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 6,3±0,2

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 4– Meio Czapek Extrato de Levedura – MEA

| Componentes | Quantidade |
|--------------------------------------|-------------------|
| Extrato de Malte | 30,0g |
| Peptona bacteriológica | 1,0g |
| Glicose | 20,0g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| Ágar | 20g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 5,3±0,3

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 5 – Meio Czapek Extrato de Malte – ME2

| Componentes | Quantidade |
|--------------------------------------|-------------------|
| Extrato de Malte | 20,0g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 5,4±0,3

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 6 – Meio Yeast Extract Sucrose – YES

| Componentes | Quantidade |
|---|-------------------|
| Extrato de Levedura | 20,0g |
| Sacarose | 30,0g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| KCl | 0,5g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| K ₃ PO ₄ .7H ₂ O | 1,6g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 8,0±0,2

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 7 – Caseína Sacarose – CAS (Equivalente ao meio CREA)

| Componentes | Quantidade |
|---|-------------------|
| Caseína | 3,0g |
| Sacarose | 30,0g |
| K ₃ PO ₄ .7H ₂ O | 1,6g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5g |
| KCl | 0,5g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| CuSO ₄ .2H ₂ O | 0,005g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,01g |
| Azul de Bromotimol | 0,05g |
| Ágar | 15g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH 8,0

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 8 – Solução de L-Asparagina 0,04M

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| L-asparagina | 5,28g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 9 – Solução Tampão Tris-HCl (pH7,2) 1M

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| Tris-HCl | 5,28g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH=7,2 (Ajustar o pH com HCl)

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 10 – Solução de Ácido Tricloroacético (TCA) 1,5M

| Componentes | Quantidade |
|-----------------------|-------------------|
| Ácido Tricloroacético | 24,45g |
| Água destilada | q.s.p. 100,0ml |

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 11– Solução Tampão Tris-HCl 1M pH7,2

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| Tris-HCl | 12,114g |
| Água destilada | q.s.p. 100,0ml |

pH=7,2 (Ajustar o pH com HCl)

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 12 – Reagente de Ehrlich

| Componentes | Quantidade |
|----------------------------|-------------------|
| 4-dimetilamino-benzaldeído | 2g |
| Etanol comercial (96%) | 85ml |
| HCl 10M | 15ml |

Fonte: FRISVAD; SAMSON, 2004

Tabela A 13 – Solução Tampão Fosfato de Potássio (pH=7,2) 0,05M

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| Tris-HCl | 5,28g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH=7,2 (Ajustar o pH com HCl)
Fonte: CASTRO, 2002; MARTINELLI; SANTOS, 2010

Tabela A 14 – Solução Tampão Fosfato de Sódio (pH=6) 100mM

| Componentes | Quantidade |
|----------------------------------|-------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | 11,2976g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,8288g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

pH=6,0
Fonte: CASTRO, 2002; MARTINELLI; SANTOS, 2010

Tabela A 15 – Solução de p-formaldeído 1%

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| p-Formaldeído | 5,28g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

Fonte: CASTRO, 2002; MARTINELLI; SANTOS, 2010

Tabela A 16 – Solução padrão de Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄) 0,5mg/ml

| Componentes | Quantidade |
|--|-------------------|
| (NH ₄) ₂ SO ₄ anidro | 0,37g |
| Água destilada | q.s.p. 200,0ml |

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 17 – Solução de EDTA 0,001M

| Componentes | Quantidade |
|--------------------|-------------------|
| NaHCO ₃ | 20,0g |
| EDTA | 0,3722g |
| Água destilada | q.s.p. 1000,0ml |

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 18 – Solução de Tris-HCl 1M pH 8,0

| Componentes | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| Tris-HCl | 60,57g |
| Água nanopurificada | q.s.p. 500,0ml |

pH 8,0

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 19 – Solução de EDTA 0,5M pH 8,0

| Componentes | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| EDTA 0,5M pH 8,0 | 29,22g |
| Água nanopurificada | q.s.p. 200,0ml |

pH 8,0

Fonte: IMADA *et al.*, 1973

Tabela A 20 – Solução de TE pH 8,0 (10mM de Tris-HCl; 1mM EDTA)

| Componentes | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| Tris-HCl 1M pH 8,0 | 1ml |
| EDTA 0,5M pH 8,0 | 0,2ml |
| Água nanopurificada | q.s.p. 100,0ml |

Fonte: Adaptado de SAMBROOK; GREEN, 2012

Tabela A 21 – Solução de Extração Genômica

| Componentes | Quantidade |
|---------------------|-------------------|
| Tris-HCl 1M pH 8,0 | 1ml |
| EDTA 0,5M pH 8,0 | 0,2ml |
| Água nanopurificada | q.s.p. 100,0ml |

Fonte: Adaptado de SAMBROOK; GREEN, 2012

Anexo B – Preparo do Reagente de Nessler (1000ml)

1. Dissolver 61,75g de Iodeto de Potássio, KI, p.a., em 200 ml de água destilada isenta de amônia.
2. Dissolver 180g de Hidróxido de Potássio, KOH, p.a., em 250 ml de água destilada isenta de amônia.
3. Preparar uma solução saturada de Cloreto de Mercúrio, HgCl₂, p.a., a quente (aproximadamente 25g/400 ml de água destilada isenta de amônia).
4. Pesar 0,75 de Iodeto de Potássio, KI, p.a., em separado.
5. Adicionar (3) em (1), vagarosamente e com agitação, até a precipitação do HgI₂, vermelho intenso, dissolver o precipitado com (4)
6. Adicionar (2) quando frio e completar a 1000 ml de água destilada isenta de amônia.
7. Guardar em frasco âmbar.

A água destilada isenta de amônia, utilizada no preparo do reagente, foi obtida por meio de osmose reversa de água destilada.

Fonte: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB, 1968