

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIA

ANA BEATRIZ PEREIRA LELIS DA COSTA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE L-
ASPARAGINASE EXTRACELULAR**

COARI
2020

ANA BEATRIZ PEREIRA LELIS DA COSTA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÔNICOS PRODUTORES DE L-
ASPARAGINASE EXTRACELULAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Me. Michel Nasser Corrêa Lima Chamy.

COARI

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C837b Costa, Ana Beatriz Pereira Lelis da
Bioprospecção de fungos amazônicos produtores de L-
asparaginase extracelular / Ana Beatriz Pereira Lelis da Costa .
2020
25 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Michel Nasser Corrêa Lima Chamy
TCC de Graduação (Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Leucemia Linfoblástica Aguda. 2. Asparagina. 3. Fungos
Filamentosos. 4. Bioma Amazônico. I. Chamy, Michel Nasser
Corrêa Lima. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA BEATRIZ PEREIRA LELIS DA COSTA

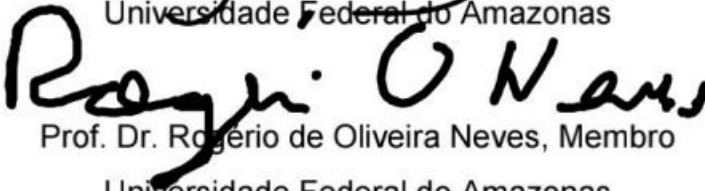
**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS AMAZÓNICOS PRODUTORES DE
LASPARAGINASE EXTRACELULAR**

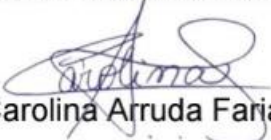
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Saúde e
Biotecnologia ISB da Universidade Federal
do Amazonas UFAM, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Aprovado em: 06 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Me. Michel Nasser Corrêa Lima Chamy, Presidente
Universidade Federal do Amazonas


Prof. Dr. Rogério de Oliveira Neves, Membro
Universidade Federal do Amazonas


Prof^a. Dr^a. Carolina Arruda Faria, Membro
Universidade Federal do Amazonas

*Ao meu querido e amado Jesus, meu melhor
amigo que sempre esteve comigo, sustentando a
mim nessa caminhada árdua. À Ti, todo o
meu amor e gratidão.*

AGRADECIMENTOS

Àquele que é, que era e que há de vir, toda minha gratidão por seus cuidados e amor incomparáveis, demonstrados em cada detalhe da minha vida. “Ó Deus de meus pais, eu te louvo e celebro porque me destes sabedoria e força” (DANIEL, cap. 2, versíc. 23).

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM, em especial ao Instituto de Saúde e Biotecnologia – ISB, pela oportunidade e concessão de auxílios que foram fundamentais para minha permanência na cidade e no curso.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC pelo incentivo financeiro e principalmente pela oportunidade de conhecer mais do âmbito de pesquisa científica.

Ao Prof. Me. Michel Nasser Correa Lima Chamy, meus sinceros agradecimentos pela orientação e amizade, por todas as críticas, correções e sugestões, e principalmente por acreditar em mais em mim que eu mesma.

À todos os professores do corpo docente de Biotecnologia do ISB, muito obrigada por estarem sempre solícitos a esclarecerem dúvidas, por toda ajuda e incentivo, pelas conversas, dicas e por toda contribuição profissional e pessoal, ficará marcado para sempre em minha vida.

Aos Técnicos de Laboratório do ISB que de alguma forma contribuíram nas execuções dos ensaios, em especial ao Uatyla Lima e Abinadabis Parentes que estiveram sempre a postos para toda e qualquer ajuda, meu muito obrigada por toda amizade e colaboração.

Aos meus amigos de jornada Bianca Kynseng, Camila Machado e Luan Castro que estiveram comigo durante essa motanha-russa de emoções que se chama vida universitária, partilhando de momentos únicos. Obrigada pelo apoio, pelos sorrisos e por tornarem minha vida mais leve.

A minha amiga Lorena Leão com quem compartilhei um lar, uma segunda casa, uma família, obrigada por toda amizade, carinho e respeito, por todo abraço amigo e amizade sincera, lembrarei com muito carinho pelo resto da vida.

À minha amiga de infância Stefane Souza que sempre torceu por todas as minhas conquistas e que já chorou com as minhas tristezas, obrigada por fazer eu me sentir a pessoa mais inteligente desse mundo.

Aos meus amados avós, tios e primos que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as tomadas de decisões, obrigada por fazerem me sentir a pessoa mais amada e especial desse mundo. Amo vocês.

Ao meu Fábio Simoni que apesar da distância sempre fez questão de se manter presente em minha vida, muito obrigada por toda paciência, amor e compreensão.

Aos meus pais e irmão que confiaram em mim desde o início, me incentivaram e foram meu suporte de apoio e amor incondicional. Isso é por vocês!

Obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para esta realização em minha vida.

“Quanto mais eu estudo a natureza mais fico impressionado com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias.”

(Louis Pasteur)

RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima que desempenha um papel fundamental na indústria farmacêutica e alimentícia. No entanto, sua maior aplicação tem sido na terapia da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). A L-asparaginase atua hidrolisando asparagina livre, e pode ser encontrada em alguns organismos eucariontes e procariotes. As enzimas utilizadas mundialmente como antileucêmico são de origem procariótica, sendo a *E. coli* sua principal representante. Contudo, tais fármacos causam hipersensibilidade imunológica aos humanos, motivo pelo qual os fungos filamentosos possibilitam a substituição viável da L-asparaginase procariótica, pois são enzimas de origem eucarionte, de fácil cultivo, mais compactas e com alta afinidade. Além disso, esses organismos podem produzir enzimas extracelulares, facilitando os processos de purificação. Nesse contexto, o bioma Amazônico destaca-se por sua biodiversidade, por seu vasto campo inexplorado e seu grande potencial microbiológico. O objetivo do presente trabalho é prospectar fungos filamentosos provenientes de solos Amazônicos produtores de L-asparaginase extracelular. Durante o estudo foram isoladas 63 cepas de amostras do solo do Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões na cidade de Coari – Amazonas, através da técnica de diluição seriada. Após o isolamento, dezessete colônias foram selecionadas para o teste de produção por fermentação em Meio Czapek Dox's modificado. Na 1ª Etapa, pré-fermentativa, foi obtido a massa micelial, a qual foi recuperada por filtração e submetida a 2ª Etapa, fermentativa (meio de cultivo suplementado com 0,07% de azul de bromotimol), para a indução de atividade asparaginolítica extracelular. Todos os fungos isolados foram conservados por congelamento simples com solução de glicerol a 20%. A avaliação qualitativa da atividade enzimática de L-asparaginase foi observada a partir da mudança de coloração do meio de cultivo amarelo para azul em 8 dos 17 fungos testados, indicando que os fungos amazônicos podem ser uma nova fonte a ser explorada para a produção enzimática de L-asparaginase extracelular.

PALAVRAS-CHAVE: Leucemia Linfoblástica Aguda. Asparagina. Fungos Filamentosos. Bioma Amazônico.

ABSTRACT

L-asparaginase is an enzyme that plays a fundamental role in pharmaceutical and food industry. However, its greatest application has been in acute lymphoblastic leukemia (ALL) therapy. L-asparaginase acts by hydrolyzing free asparagine, and can be found in some eukaryotic and prokaryotic organisms. Such enzymes, worldwide used as antileukemics, comes from prokaryotics, and *E. coli* are their main representatives. However, these drugs cause immunological hypersensitivity to humans. Thus, filamentous fungi enable the viable substitution of prokaryotic L-asparaginase, as they are enzymes from eukaryotics, easy to grow, more compact and with high affinity. In addition, they can use extracellular enzymes, facilitating purification processes. In this context, the amazonic biome stands out for its biodiversity, its vast unexplored field and its great microbiological potential. This work aims to prospect the filaments of fungi affiliated to amazonian producers of extracellular L-asparaginase. During the study, 63 pieces of soil were isolated from the Research Support Center of the Middle Solimões in the city of Coari - Amazonas, using the serial dilution technique. After isolation, seventeen colonies were selected for fermentation production test in the modified Czapek Dox's Medium. In the first one, pre-fermentative stage, was got the mycelial mass, which was recovery by filtration and then submitted to the second stage, the fermentative one (culture medium supplemented with 0.07% bromothymol blue), to induce extracellular asparaginolytic activity. All isolated fungies were preserved by simple freezing with 20% glycerol solution. A qualitative evaluation of the enzymatic activity of L-asparaginase was observed from the color change of the yellow to blue culture medium in 8 of the 17 fungi tested, that Amazonian fungi can be a new source or explored for the enzymatic production of L - extracellular asparaginase.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia. Asparagine. Filamentous Fungi. Amazonic Biome.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Local da coleta	15
2.2 Coleta.....	15
2.3 Isolamento dos fungos	15
2.4 Conservação dos isolados	16
2.5 Produção de L-asparaginase em meio líquido.....	16
2.5.1 Etapa pré-fermentativa	16
2.5.2 Etapa fermentativa.....	17
2.6 Análise Qualitativa	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4 CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

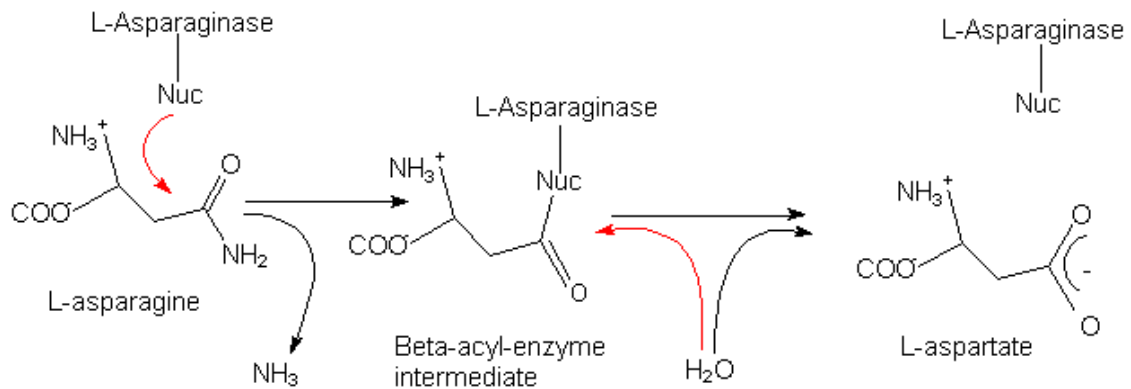
A L-asparaginase ou L-asparagina amidohidrolase – E.C. 3.5.1.1. (IUBMB, 1961), é uma enzima que possui aplicações importantes na indústria farmacêutica e alimentícia. Ela pertence a classe das hidrolases e atua em ligações de carbono e amidas lineares, catalisando a reação de asparagina livre em ácido aspártico e amônio. As reações de hidrólise acontecem a partir da quebra de uma única molécula com adição de elementos da água, resultando em uma despolimerização da enzima (VERMA *et al.*, 2007; NELSON e COX, 2014; CÂNDIDO, 2015).

A ação da L-asparaginase foi perceptível a partir de estudos pioneiros iniciados por Clementi (1922), que estudava linfomas em mamíferos, onde foi observado que o soro de 18 porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) ocasionava a morte dos linfomas, porém, não se sabia ainda qual substância era responsável pela morte dos linfomas. Kidd (1953), também pôde observar que quando induzia em camundongos o crescimento de tumores, eles entravam em remissão ou eram inibidos pelo soro de porquinhos-da-Índia (*Cavia porcellus*) que era usado como tratamento. Ainda no mesmo estudo, o autor realizou testes com soro humano, no qual não obteve resultados positivos (SREENIVASULU *et al.*, 2009).

Partindo desses estudos, Broome (1963), analisou os resultados de Clementi (1922) e Kidd (1953) e concluiu que a regressão dos linfomas transplantados em camundongos tinha haver com a dependência nutricional das células malignas, e realizou testes para descobrir qual substância tinha correlação com a doença, e partir disso descobriu-se que a L-asparagina estava diretamente envolvida com a dependência nutricional das células malignas, concluindo assim que a atividade antineoplásica do soro foi causada pela enzima L-asparaginase (SREENIVASULU *et al.*, 2009).

Diante disto, Sanson e Jaskolski (2004), sugerem que o mecanismo de reação da L-asparaginase ocorre a partir de um ataque nucleofílico pela enzima, no carbono da amida da asparagina, gerando um intermediário, o beta-acil-enzima, que sofre um novo ataque nucleofílico por uma molécula de água (FIGURA 1). O resultado final da reação é a transformação do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia.

Figura 1 – Mecanismo de reação da L-asparaginase



Fonte: Sanson e Jaskolski (2004).

Devido ao seu mecanismo de ação, a L-asparaginase é bastante utilizada pela indústria alimentícia, atuando na redução dos níveis de acrilamida. Alguns alimentos, quando expostos a altas temperaturas formam acrilamida, uma neurotoxina altamente cancerígena, da qual o aminoácido asparagina e açúcares redutores contribuem para sua formação. No entanto, faz-se uso da L-asparaginase durante os processos industriais alimentícios para evitar a formação da neurotoxina citada (CÂNDIDO, 2015).

Outra aplicação importante da enzima L-asparaginase tem sido realizada pela indústria farmacêutica. Estudos clínicos comprovam a eficácia desta enzima em tratamentos quimioterápicos de doenças como melanossarcoma, leucemia mielomonocítica, linfoma de Hodgkin e linfossarcoma, no entanto, dentre todas as indicações de tratamento com L-asparaginase, sua maior aplicação tem sido na terapia da Leucemia Linfoblástica Aguda ou Leucemia Linfóide Aguda (LLA) (THOMAS *et al.*, 2010; ZUO *et al.*, 2014).

A enzima L-asparaginase é o principal agente terapêutico utilizado no tratamento da LLA, com resultados promissores a cerca de 90% de cura entre crianças e 50% de remissão completa entre adultos (VERMA *et al.*, 2007; ABRALE, 2016).

A eficácia do tratamento é justificada pelo não comprometimento das células saudáveis, pois as mesmas possuem a capacidade de sintetizar o aminoácido asparagina para suas necessidades metabólicas no citoplasma, utilizando a enzima asparagina sintetase, o que não ocorre entre células malignas. (NARTA *et al.*, 2007; VAN DEN BERG, 2011).

A L-asparaginase pode ser encontrada em diversos seres vivos, tais como animais, vegetais, bactérias, fungos e algas. Porém, as enzimas utilizadas

mundialmente no tratamento quimioterápico têm sido produzidas pela bactéria *Escherichia coli*, o que causam diferentes reações adversas por conta da hipersensibilidade imunológica (VAN DEN BERG, 2011; CACHUMBA *et al.*, 2016).

O fungo, por sua vez, é de fácil cultivo e pode produzir enzimas de forma extracelular. Alguns autores acreditam que sua produção extracelular poderia facilitar em processos de *downstream*, tal condição causaria menos efeitos adversos. Devido às características encontradas nos fungos filamentosos, pode-se dizer que a L-asparaginase de origem fúngica é uma boa alternativa quanto a produção biotecnológica (VERMA *et al.*, 2007; HOSAMANI E KALIWAL, 2011; VAN DEN BERG, 2011).

No Brasil, havia uma grande dependência do mercado internacional para a obtenção do medicamento utilizado no tratamento de pacientes com LLA, devido alguns problemas observados quanto ao abastecimento deste importante quimioterápico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

Em 2013, o Laboratório Bagó do Brasil Ltda., que importava este medicamento, informou que o fármaco deixaria de ser produzido mundialmente. Diante das circunstâncias, o Ministério da Saúde passou a comprar o medicamento devido à escassa disponibilidade no mercado farmacêutico e por não haver nenhum produto com registro no país. Passou então a adquiri-lo da empresa chinesa Xatley, porém mostrava-se duvidosa a eficácia e segurança deste fármaco segundo especialistas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

Em 2017 o Ministério da Saúde foi notificado oficialmente de uma ação judicial que restringia a compra e o repasse do medicamento Leuginase para os hospitais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017c). E em janeiro de 2018, o Ministério da Saúde se reuniu com entidades de referência em oncologia no país para validar a nova aquisição do medicamento L-asparaginase (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017d), e um novo modelo foi proposto, dividido por fases (indução, consolidação, intensificação e manutenção). O Ministério da Saúde decidiu repassar o pagamento correspondente a cada etapa do tratamento para os hospitais, tornando-os autônomos para realizarem novas compras do fármaco. Vale ressaltar que os efeitos adversos são os mesmos citados em literaturas disponíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Devido às condições apresentadas, estimulou-se um interesse maior quanto à procura de novos produtores da enzima. Baseado nisso, os fungos filamentosos tem mostrado maior potencial para serem bons produtores da L-asparaginase. Por serem

seres eucariontes, produzem enzimas mais compactas e com alta afinidade, além de poder produzir enzimas extracelularmente, facilitando assim, os processos de purificação (VERMA *et al.*, 2007; HOSAMANI E KALIWAL, 2011; VAN DEN BERG, 2011; CÂNDIDO, 2015). Diferentemente das bactérias, que produzem enzimas de forma intracelular e requerem técnicas de lise celular que são mais complexas e com custos mais elevados quando feitas em larga escala (GACESA E HOBBLE, 1990; WISEMAN, 1985).

Nesse cenário, o Brasil se destaca por sua biodiversidade, em especial o bioma Amazônico, que tem um vasto campo inexplorado e um grande potencial microbiológico devido suas características definidas através de fatores climáticos, temperatura, umidade do ar, tipo de solo, entre outros (NEVES *et al.*, 2006).

A região Amazônica é vista com potencial para descobertas de fungos produtores de L-asparaginase, por esse motivo, torna-se viável selecionar fungos filamentosos do solo e investigar sua potencialidade quanto à produção da enzima L-asparaginase de forma extracelular, contribuindo assim, para o avanço biotecnológico brasileiro (SREENIVASULU *et al.*, 2009; PIROTA *et al.*, 2015). Portanto, o presente trabalho visa prospectar fungos filamentosos produtores de L-asparaginase extracelular provenientes de solos Amazônicos da área territorial da cidade de Coari – AM.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local da coleta

As amostras de solo foram coletadas na cidade de Coari que está localizada na região central do estado do Amazonas, ocupando uma área territorial de 57.970,768 km², com população estimada de 84.272 pessoas para 2018 e densidade demográfica de 1,31 hab/km², segundo o último censo em 2010 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2019). A região apresenta característica climática equatorial quente e úmido, sendo uma região tropical Af segundo à classificação de Köppen (PEEL *et al.*, 2007). As coletas foram realizadas em cinco pontos aleatórios dentro das coordenadas 04°07'31.4" S e 063°04'23.9" W, no Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões – CAPMEDSOL na cidade de Coari – AM.

2.2 Coleta

Para a realização da coleta, foi utilizada uma espátula para que o solo fosse escavado a uma profundidade de aproximadamente 10 a 20 centímetros (SCHAEFER, 2002), onde foram retiradas amostras e acondicionadas em sacos de papel, devidamente identificadas com informações básicas e encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ISB/UFAM), seguindo a metodologia adotada por Mello, Reis e Silva (2011), para manipulação posterior.

2.3 Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos filamentosos as amostras foram submetidas a técnica de diluição em série, onde foram transferidas 10 g de cada amostra para frascos de *Erlenmeyer* de 250 mL, contendo 225 mL de solução salina 0,85% estéril (CLARK, 1965; TORTORA *et al.*, 2017), sendo vedados e homogeneizadas na incubadora *Shaker SL 222*, sob agitação constante de 120 rpm e temperatura de 28°C, permanecendo em *overnight*.

Após o pré-cultivo foi realizada diluição seriada seguida de plaqueamento em meio de cultura *Sabouraud Dextrose Agar* com clorafenicol (50 mg/L) (COUTINHO *et al.*, 2010). As placas de Petri foram devidamente identificadas e incubadas a 30°C, por um período de sete dias.

Para a obtenção de colônias puras foi realizado sucessivos repiques utilizando o método *Hyphae Tip* (MELLO *et al.*, 2011), onde as pontas de hifas mais isoladas eram retiradas e reinoculadas em um novo meio de cultura. O método se repetiu até o completo isolamento de apenas uma espécie por placa.

2.4 Conservação dos isolados

Após o isolamento dos fungos, foram realizadas as conservações das colônias em duplicatas pelo método de congelamento simples, com adição de uma solução crioprotetora de glicerol a 20 %, que foi mantida a uma temperatura de - 10 °C em freezer (ROSA, 2014).

2.5 Produção de L-asparaginase em meio líquido

Para a produção de L-asparaginase foram selecionadas cepas com características morfológicas distintas (coloração e textura). As colônias foram reativadas em meio de cultivo *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), onde, após sete dias de crescimento as mesmas foram submetidas ao um novo inóculo em meio líquido Czapek Dox's modificado (LOUREIRO *et al.*, 2012).

2.5.1 Etapa pré-fermentativa

Cerca de 1×10^7 esporos/mL em meio do cultivo SDA foi inoculado em *Erlenmeyers* de 250 mL, contendo 50 mL do meio Czapek Dox's modificado (Glicose (C₆H₁₂O₆) 12,00 g, L- asparagina (C₄H₈N₂O₃) 10,00 g, Fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) 1,52 g, Cloreto de potássio (KCl) 0,52 g, Sulfato de magnésio hepta-hidratado (MgSO₄. 7H₂O) 0,52 g, Nitrato de cobre tri-hidratado (Cu (NO₃) 2. 3H₂O) 0,01 g, Sulfato de zinco hepta-hidratado (ZnSO₄.7H₂O) 0,01 g, Sulfato de ferro

hepta-hidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,01 g, Nitrato de amônia ($(\text{NH}_4) (\text{NO}_3)$) 2,00 g, Água destilada (H_2O) q.s.p.), sendo realizadas em triplicatas. As culturas foram mantidas sob agitação constante (120 rpm) durante 96 horas a 30 °C para o crescimento da massa micelial.

2.5.2 Etapa fermentativa

Para a etapa fermentativa, foi necessário recuperar por filtração o micélio produzido na 1ª etapa. A filtração foi realizada por um sistema montado com *Erlenmeyer*, funil de vidro e papel filtro comum estéril. Com o micélio recuperado, o mesmo foi reinoculado em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL de um novo meio Czapek Dox's, obedecendo as seguintes modificações: adição de 0,07% de azul de bromotimol – BTB (indicador químico), concentração de glicose 2 g.L⁻¹ e ausência de nitrato de amônia. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições da etapa anterior.

2.6 Análise Qualitativa

A análise qualitativa foi realizada após a etapa fermentativa, sendo observada a mudança ou não da coloração do meio de cultivo amarelo para azul, onde é possível indicar a presença ou ausência da atividade de L-asparaginase, visto que o indicador químico BTB é amarelo em pH ácido e azul em pH alcalino (MAHAJAN *et al.*, 2013).

Os critérios de avaliação qualitativa (TABELA 1) foram propostos de acordo com grau de intensidade da cor. Quanto mais intenso o azul no meio, maior é o pH, logo, maior a atividade da L-asparaginase.

Tabela 1 – Critérios de avaliação qualitativa

Grau de intensidade	Critérios
Forte	(+++)
Moderado	(++)
Fraco	(+)
Não detectado	(-)

Fonte: A autora (2019).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo, Murray, Rosenthal e Pfaller (2014), os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos que se nutrem por absorção de matéria orgânica. Tortora, Funke e Case (2017), afirmam que os fungos são encontrados nos mais diversos ambientes, especialmente em lugares úmidos e ricos em matéria orgânica, entre eles, solo, água do mar, água doce, hospedeiro animal ou vegetal.

Para Sotão, Campos e Costa (2004), os fungos possuem um arsenal enzimático que está correlacionado com a absorção realizada pelos mesmos. Enzimas são produzidas intracelularmente e excretadas para o meio extracelular, contribuindo para quebra de macromoléculas, formando moléculas mais simples de fácil absorção. Esse mecanismo contribui principalmente para a dinâmica do solo em termos de reciclagem de resíduos orgânicos, devido a rica disponibilidade de matéria orgânica e umidade encontradas no solo.

Por meio das amostras de solo foram isolados um total de sessenta e três colônias de fungos filamentosos da área do Centro de Apoio à Pesquisa do Médio Solimões – CAPMEDSOL na cidade de Coari – AM, evidenciando a diversidade fúngica na Amazônia. Segundo Sotão, Campos e Costa (2004), regiões tropicais, em especial a Amazônia, apresentam características que a tornam um potencial para novas descobertas de fungos, devido a composição química do solo, umidade e temperatura.

A metodologia adotada neste estudo para diluição seriada, foi baseada em Clark (1965), Tortora *et al.*, (2017) modificados, os quais mostram-se bastante eficazes para o objetivo proposto, onde pôde-se observar que o meio de cultura seletivo (SDA + Cloranfenicol 50,0 mg/L⁻¹) apresentou um resultado esperado, visto que o antibiótico utilizado possui amplo espectro de ação, suprimindo o crescimento bacteriano durante as fases de crescimento e manutenção das sessenta e três colônias fúngicas. Resultados semelhantes a este, foram descritos por Oliveira (2013), que utilizou o mesmo método descrito por Clark (1965), e obteve o isolamento de oitenta e cinco espécies de fungos do solo na área semiárida de Pernambuco, Brasil, confirmando que a metodologia utilizada neste estudo foi efetiva.

Os fatores fotoperíodo e temperatura foram determinantes para o crescimento fúngico, pois ao longo do estudo foi observado que durante o período de incubação em que os fungos eram mantidos em temperatura constante e ausência de luz, os

mesmos mantinham crescimento lento, quando comparados aos fungos que foram mantidos posteriormente em temperatura ambiente e luz natural. As observações do presente trabalho podem ser justificadas pelos estudos realizados por Loureiro *et al.* (2002), que enquanto estudava os efeitos da temperatura e luminosidade no desenvolvimento do fungo *Sporothrix insectorum* pôde observar que a ausência de luz afetou a esporulação do fungo e constatou que houve um melhor desenvolvimento fúngico quando a utilização da luz era alternada para 12 horas de luz e 12 horas de escuro, além de identificar as temperaturas ideais para um bom desenvolvimento fúngico de *S. insectorum*, que estava em torno de 22, 25 e 28°C.

Bem como os resultados de Marcuzzo e Xavier (2017), que também destacaram o melhor desenvolvimento dos fungos *Sclerotium cepivorum* Berk., quando os mesmos eram mantidos em um fotoperíodo com 12 horas de luz. Uma vez isoladas as colônias, as mesmas foram conservadas a – 10°C em freezer.

A triagem de fungos filamentosos para a produção enzimática de L-asparaginase é um passo fundamental para a descoberta de novas fontes da enzima. Diante disto, dentre os isolados foram selecionadas dezessete cepas fúngicas para as etapas fermentativas, a seleção ocorreu baseada em suas respectivas características morfológicas distintas observadas macroscopicamente como: coloração e textura. Vale ressaltar que não foram realizadas identificação morfológica e molecular das espécies.

Dados na literatura sugerem que a atividade asparaginolítica está diretamente associada a regulação de nitrogênio, Sarquis (2004), apresentou a melhor condição para produção de L-asparaginase por fungos filamentosos, quando utilizou prolina como fonte de nitrogênio (indutor). Enquanto Farag *et al.* (2015), observou que as melhores condições de cultivo para a atividade de L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* estavam na utilização de L-asparagina como fonte de nitrogênio. No entanto, Cachumba (2017), apresentou como melhor fonte de nitrogênio L-glutamina seguida da L-asparagina para a produção de asparaginase extracelular de *A. terreus*.

No entanto, no presente trabalho optou-se pela utilização de L-asparagina, que é considerada pela literatura uma das melhores fontes indutoras para a produção da enzima de interesse do estudo. Ainda assim, embora a atividade enzimática possa estar relacionada com a regulação de nitrogênio, foi observado por Cachumba *et al.* (2016), que as maiores atividades de L-asparaginase realizada por fungos, ocorreram

pelo método de fermentação submersa e temperatura média de 30 °C, quando o mesmo correlacionou estudos recentes sobre a produção de L-asparaginase por bactérias e fungos. Em estudos realizados por Farag *et al.* (2015), demonstraram que a maior atividade asparaginolítica de *A. terreus*, ocorreu em pH 6,0 e temperatura de 35 °C, apesar disso, as atividades enzimáticas aconteceram entre a variação de temperaturas de 25 °C a 35 °C.

No presente estudo, as cepas selecionadas foram submetidas as etapas fermentativas a temperatura de 30 °C e pH 6,2, sendo posteriormente avaliadas por meio de análise colorimétrica, segundo a metodologia descrita por Mahajan *et al.* (2013), onde o BTB avalia de forma indireta a presença de L-asparaginase. A técnica descrita baseia-se na conversão do meio líquido amarelo para azul, uma vez havendo atividade enzimática da L-asparaginase, será liberado no meio moléculas de ácido aspártico e amônia, provocando o aumento do pH e conseqüentemente a mudança na coloração de amarelo para a azul.

Através da análise colorimétrica (FIGURA 2), foi possível observar que dentre as dezessete colônias testadas ao longo do estudo, oito foram capazes de produzir a enzima L-asparaginase extracelularmente, sendo indicadas pela mudança de coloração do meio de cultivo.

Figura 2 – Análise colorimétrica



Figura: a) Atividade asparaginolítica
Fonte: A autora (2019).

b) Sem atividade asparaginolítica.

Os resultados obtidos através da mudança de coloração do meio de cultivo das oito cepas apresentaram intensidades de cor diferentes, tendo seus resultados

expressos na Tabela 2, de acordo com o grau de intensidade da coloração, conforme citado na metodologia.

Tabela 2 – Resultado da avaliação qualitativa de L-asparaginase

Amostra	Resultado
AS 2	(+++)
AS 6	(+++)
AS 8	(+++)
AS 13	(-)
AS 16	(-)
AS 23	(-)
AS 32	(-)
AS 34	(-)
AS 36	(-)
AS 38	(+)
AS 39	(-)
AS 42	(++)
AS 47	(-)
AS 48	(+)
AS 59	(+++)
AS 60	(+)
AS 61	(-)

Fonte: A autora (2019).

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível observar que há bons candidatos para produção enzimática de L-asparaginase a partir de fontes naturais, o que torna o trabalho mais suscetível a um melhoramento genético, aumentando ainda mais a produtividade e reduzindo os custos da produção enzimática de forma significativa. Segundo, Cachumba *et al.* (2016), a maioria dos micro-organismos produz L-asparaginase intracelularmente, o que dificulta os processos de extração e purificação, nesse sentido, as enzimas produzidas extracelularmente podem adiantar, pular e/ou facilitar etapas nos processos de *Downstream*, e conseqüentemente diminuir os efeitos adversos.

Nossos resultados sugerem que experimentos futuros sejam realizados para quantificar a produção enzimática das oito cepas que apresentaram atividade asparaginolítica e identificar os melhores produtores de L-asparaginase extracelular. Visto que há uma escassa demanda de trabalhos realizados sobre a produção enzimática de L-asparaginase por fungos filamentosos de solo amazônico.

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados evidenciaram que os métodos e procedimentos adotados para o isolamento de fungos filamentosos e a indução dos mesmos para a atividade enzimática de L-asparaginase extracelular, apresentaram eficácia para o objetivo proposto. E que a Amazônia, em especial o município de Coari, apresentou um potencial microbiológico evidenciado pelas sessenta e três colônias de fungos filamentosos isolados do solo do CAPMEDSOL. Além do que, dentre os dezessete fungos selecionados para as etapas fermentativas, oito apresentaram resultados positivos para a produção enzimática de L-asparaginase extracelular, os quais demonstraram ser fortes candidatos a novos produtores enzimáticos da supracitada enzima.

REFERÊNCIAS

ABRALE. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LINFOMA E LEUCEMIA. **O que é leucemia**, 2016. Disponível em: <https://www.abrale.org.br/lla/o-que-e>. Acesso em 02/11/2018.

BROOME, J. D. Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. **The Journal of experimental medicine**, v. 118 n. 1 p. 99-120, 1963.

CACHUMBA, J. J. M.; ANTUNES, F. A. F.; PERES, G. F. D.; BRUMANO, L. P.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. Current applications and different approaches for microbial l-asparaginase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, 47: 77-85, 2016.

CACHUMBA, J. J. M. **Produção de L-asparaginase extracelular por fermentação em estado sólido**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

CÂNDIDO, M. A. **Formação de acrilamida em alimentos processados e sua possível ação carcinogênica**. 2015. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena. Lorena.

CIDADES, I. B. G. E.; DO BRASIL, Estados. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2018. Coari. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/am/coari/panorama>. Acesso em: 04/07/2019.

CLARK, F. E. Agar-plate method for total microbial count. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties*, **Agricultural Research Service**. v. 9, p. 1460-1466, 1965.

CLEMENTI, A. La désamidation enzymatique de l'asparagine chez les différentes espèces animales et la signification physio logique de sa presence dans l'organisme. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, n. 4, p. 369-398, 1922.

COUTINHO, F. P.; CAVALCANTI, M. A. Q.; YANO-MELO, A. M. Filamentous fungi isolated from the rhizosphere of melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Gold Mine) cultivated in soil with organic amendments. **Acta Botânica Brasílica**, v. 24: 292-298, 2010.

FARAG, A. M.; HASSAN, S. W.; BELTAGY, E. A.; EL-SHENAWY, M. A. Optimization of production of anti-tumor L-asparaginase by free and immobilized marine *Aspergillus terreus*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015.

GACESA, P.; HUBBLE, J. **Tecnologia de las enzimas**. Zagora: Acriba, 1990. P. 206.

HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. L-asparaginase-an anti-tumor agent production by *Furasium equiseti* using solid-state fermentation. **International Journal of Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011.

KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine** v. 98, n. 6, p. 565-582, 1953.

LOUREIRO, E. S.; FILHO, A. B.; ALMEIDA, J. E. M.; LEITE, L. G.; LAMAS, C. Efeito da temperatura e da luminosidade no desenvolvimento do Fungo *Sporothrix insectorum* (hoog & evans). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 79-83, 2002.

LOUREIRO, C. B.; BORGES, K. S.; ANDRADE, A. F.; TONE, L. G.; SURAIÁ, S. Purification and biochemical characterization of native and pegylated form of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* and evaluation of its antiproliferative activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 138-145, 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, 2013.

MARCUZZO, L. L.; XAVIER, A. Efeito da temperatura e do fotoperíodo no desenvolvimento micelial de *Sclerotium cepivorum*, agente causal da podridão branca do alho e da cebola. **Summa Phytopathol.**, v. 43, n. 1, p. 68-69, 2017.

MELLO, S. C. M.; REIS, A.; SILVA, J. B. T. Manual de curadores de germoplasma-microorganismos: fungos filamentosos. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**. 2011.

MINISTERIO DE SAÚDE. **Ministério da Saúde enviou medicamento para teste de qualidade**, 2017a. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/28021-ministerio-da-saude-envioumedicamento-para-teste-de-qualidade>. Acesso em: 05/04/2018.

MINISTERIO DE SAÚDE. **Ministério fez consulta mundial para compra de asparaginase**, 2017b. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/27975-ministerio-fez-consulta-mundial-paracompra-de-asparaginase>. Acesso em: 05/04/2018.

MINISTERIO DE SAÚDE. **Seis laboratórios atestam L-Asparaginase adquirida pelo Ministério da Saúde**, 2017c. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/29718-seis-laboratoriosatestam-l-asparaginase-adquirida-pelo-ministerio-da-saude>. Acesso em: 05/04/2018.

MINISTERIO DE SAÚDE. **Ministério da Saúde reúne entidades de referência em oncologia para validar a nova compra do medicamento**, 2017d. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agenciasaude/42283-ministerio-da-saude->

reune-entidades-de-referencia-em-oncologia-para-validar-anova-compra-do-medicamento. Acesso em: 05/04/2018.

MINISTERIO DE SAÚDE. **Ministério passará a pagar hospitais por fases da quimioterapia de leucemia (LLA)**, 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/42285-ministerio-passaraa-pagar-hospitais-por-fases-da-quimioterapia-de-leucemia-lla>. Acesso em: 05/04/2018.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2014, 1808 p.

NARTA, U. K; KANWAR, S. S; AZMI, W. Pharmacological and clinical evaluation of Lasparaginase in the treatmentof leukemia. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 61, n. 3, p. 208-221, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, 1250 p.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (NCIUBMB). **IUBMB Enzyme Nomenclature EC 3.5.1.1**. 1961. Disponível em: <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/5/1/1.html>. Acesso em: 02/11/2018.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49-54, 2013.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and earth system sciences discussions**, 4: 439-473, 2007.

PIROTA, R. D. P. B.; TONELOTTO, M.; DELABONA, P. S.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, C. S. Characterization of fungi isolated from the Amazon region for the potential of biomass-degrading enzymes production. **Cienc. Rural**, v. 45, n. 9, p. 1606-1612, 2015.

ROSA; I. Z. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos termofílicos produtores de celulases, xilanases e celobiose desidrogenase com potencial para sacarificação do bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IBILCE-UNESP. São José do Rio Preto.

SANSON, E.; JASKOLSKI, M. Structure, dynamics and electrostatics of the L-asparaginase catalytic centre: Implications for reaction mechanism. **London: Department of Crystallography, Birkbeck College, London and Venus Internet Ltd.**, 2004.

SARQUIS, M. I. M.; OLIVEIRA, E. M. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by Filamentous Fungi. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

SCHAEFER, C. E. R. *et al.* Perdas de solo, nutrientes, matéria orgânica e efeitos microestruturais em Argissolo Vermelho-Amarelo sob chuva simulada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 669-678, 2002.

SREENIVASULU, V.; JAYAVEERA, K. N.; MALLIKARJUNA R. P. Solid-State fermentation for the production of L-asparaginase by *Aspergillus* sp. **Research J. Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

SOTÃO, H. M. P.; CAMPOS, E. L.; COSTA, S. P. S. E. Micologia Diversidade dos fungos na Amazônia. **Série Cadernos de Alfabetização Científica**, v. 1, p. 1-27, 2004.

THOMAS, X.; CANNAS, G.; CHELGHOUM, Y.; GOUGOUNON, A. Therapeutic alternatives to native L-asparaginase in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Bulletin du Cancer**, v. 97, n. 9, p. 1105–1117, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Artmed, Porto Alegre, 2017, 962 p.

VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & lymphoma**, v. 52, n. 2, p. 168-178, 2011.

VERAS, B. O. **Produção de L-asparaginase por bactérias cultiváveis do coral *Siderastrea stellata* dos recifes costeiros do cabo branco – Paraíba**. 2017. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba.

VERMA, N. K.; KUMAR, G.; KAUR, A. S. L-asparaginase: A promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45-62, 2007.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zagoroza: Acriba, 1985, 445 p.

ZUO, S. H.; ZHANG, T.; JIANG, B.; WANMENG, M. Recent research progress on microbial lasparaginases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1069–1079, 2014.