



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL**

**FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE**

MARCELA HIRUMI UCHIMURA

RIO BRANCO, AC

2018

MARCELA HIRUMI UCHIMURA

**FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde da Amazônia Ocidental, da Universidade Federal do Acre, como requisito para obtenção do grau de **Mestre em Ciências da Saúde**.

Orientadora: Dra. Clarice Maia Carvalho

RIO BRANCO, AC

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL

FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLOS AMAZÔNICOS COM POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE

MARCELA HIRUMI UCHIMURA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 06-02-2018

Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho (Presidente)

Universidade Federal do Acre – Centro de Ciências Biológicas e da
Natureza

Prof. Dr. Emerson Correa Brasil da Costa (Membro Interno)

Universidade Federal do Acre – Centro de Ciências da Saúde e do Desporto

Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto (Membro Externo)

Universidade Federal do Acre – Centro de Ciências da Saúde e do Desporto

Dedico

Aos meus pais, Hiroshi e Maria Cacilda

Uchimura pelo amor, apoio e incentivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela oportunidade de cursar este mestrado em outro estado e poder contar com pessoas maravilhosas que me acolheram e me fizeram sentir em casa.

Aos meus pais Hiroshi Uchimura (*in memoriam*) e Maria Cacilda Uchimura e Antonio Francisco de Oliveira por estarem ao meu lado em todos os momentos, guarnecendo-me e dando coragem para não desistir dos meus objetivos.

Aos colegas e amigos que conheci em Rio Branco, à Família Imada, Reginaldo Francisco, pelo carinho e incentivo em todos os momentos. Aos colegas do programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde, em especial a Gabriela Castro, Hércules Magalhães, Mariane Ribeiro, Quíria Silva e Valéria Matos pelo seu auxílio dentro e fora da sala de aula, pelo seu carinho e companheirismo vocês estiveram presentes em minha vida nos momentos em que eu pensei em desistir, sempre com palavras amigas e não permitiram em momento algum que eu desanimasse.

A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação da UFAC, em especial o coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva e a Secretária Ana Caroline Vasconcellos de O. Salmento, bem como a CAPES pela concessão de bolsa.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; minha gratidão por todo conhecimento recebido.

Ao companheiro do Laboratório de Microbiologia, meu amigo irmão Raimundo Carmo de Oliveira que caminhou comigo lado a lado durante toda a minha pesquisa, sempre me auxiliando e incentivando, por me acolher, pelos ensinamentos compartilhados, pela troca de experiências, pelas risadas, nem tudo foram flores, mas de alguma forma tudo valeu a pena, a sua amizade vou guardar para sempre.

“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o auto-controle, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria”.

Napoleon Hill

RESUMO

A enzima L-asparaginase tem recebido atenção significativa devido a sua utilização como agente anticancerígeno, particularmente para o tratamento de Leucemia linfóide aguda (LLA) e Doença de Hodgkin, atuando como um agente fundamental em protocolos de quimioterapia a cerca de 30 anos. Atualmente poucos são os estudos relacionados à L-asparaginase fúngica no Brasil e até o momento não há trabalhos com este escopo na região Norte. Esse estudo teve como objetivo selecionar fungos de solos Amazônicos como potenciais produtores de L-asparaginase, isolar e identificar os fungos filamentosos e quantificar a sua produção enzimática. Foram isolados 126 fungos, utilizando a técnica de diluição seriada em meio de cultura CzapeckDox modificado, constituído de L-asparagina como única fonte de nitrogênio, suplementado com o corante indicador Púrpura de Bromocresol para a seleção de isolados potencialmente produtores de L-asparaginase sendo 54 fungos de solos de dez pontos distintos de Remanescente de Floresta Primária e 72 de dez pontos distintos de Remanescente de Floresta Secundária, tendo sido agrupados em 62 táxons. Foram identificados fungos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Foi analisado o potencial para a produção de L-asparaginase de 62 isolados, sendo observada a atividade enzimática em 56 destes isolados. O isolado 4.455, identificado como *Fusarium* sp., produziu maior atividade enzimática de 0,13 U/ml, os valores encontrados variaram de 0,01 U/ml e 0,13 U/ml. Esses resultados indicam que os solos da Região Amazônica apresentam diversos fungos produtores de L-asparaginase, alguns deles pela primeira vez citados na literatura científica como os gêneros *Acremonium* sp., com atividade enzimática de 0,07 U/ml, *Cylindrocladium* sp., 0,02 U/ml, *Epicoccum* sp., 0,01 U/ml e *Geotrichum* sp., 0,02 U/ml.

Palavras-chave: L-asparagina. Amazônia. Leucemia Linfóide Aguda

ABSTRACT

The enzyme L-asparaginase has received significant attention because of its use as an anticancer agent, particularly for the treatment of acute lymphoid leukemia (ALL) and Hodgkin's disease, acting as a key agent in chemotherapy protocols around 30 years. Currently there are few studies related to fungal L-asparaginase in Brazil and to date there are no studies with this scope in the North. This study aimed to select fungi of Amazonian soils as potential producers of L-asparaginase, isolate and identify filamentous fungi and quantify their enzymatic production. A total of 126 fungi were isolated using the serial dilution technique in modified CzapeckDox culture medium, made up of L-asparagine as the sole source of nitrogen, supplemented with the Bromocresol Purple indicator stain for the selection of isolates potentially producing L-asparaginase. fungi of soils of ten distinct points of Remnant of Primary Forest and 72 of ten distinct points of Remnant of Secondary Forest, having been grouped in 62 taxa. Fungi belonging to the genus *Acremonium*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium* and *Trichoderma* were identified. The potential for the production of L-asparaginase from 62 isolates was analyzed, and enzymatic activity was observed in 56 of these isolates. Isolate 4.455, identified as *Fusarium* sp., Produced a higher enzymatic activity of 0.13 U/ml, values found ranged from 0.01 U/ml and 0.13 U/ml. These results indicate that the soils of the Amazon Region present several L-asparaginase-producing fungi, some of them for the first time mentioned in the scientific literature as the genus *Acremonium* sp., With enzymatic activity of 0.07 U/ml, *Cylindrocladium* sp., 0,02 U/ml, *Epicoccum* sp., 0.01 U/ml and *Geotrichum* sp., 0.02 U/ml.

Keywords: L-asparagina. Amazon. Acute Lymphoid Leukemia.

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Reação catalisada pela L-asparaginase.....	16
Figura 2. Sequencia de resíduos de aminoácidos da enzima L-asparaginase de <i>Escherichia Coli</i> , a enzima conta com 338 resíduos de aminoácidos. Os resíduos destacados em amarelo indicam os aminoácidos que formam o sítio ativo enquanto que aqueles destacados em verde são sítios de ativação alostérica. A enzima cataliza a seguinte reação: L-asparagine + H ₂ O = L-aspartate + NH ₄	16
Figura 3. Ação da L-asparaginase em Célula Tumoral.....	18
Figura 4. Isolamento de fungos produtores de L-asparaginase. A. placa controle negativo; B. Placa de isolamento após 24 horas de incubação, com formação de halo roxo ao redor da colônia indicando a possível produção de L-asparaginase pela espécie fúngica.....	25
Figura 5. Identificação dos fungos isolados utilizando métodos clássicos. A. Técnica de Microcultivo; B. Observação de estrutura reprodutiva.....	26
Figura 6. Fermentação de fungos produtores de L-asparaginase para análise quantitativa da enzima. A. Meio líquido de Czapek-Dox Modificado; B. Obtenção do extrato bruto enzimático.....	27
Figura 7. Análise das características micromorfológicas de fungos produtores de L-asparaginases isolados de solos amazônicos. Visualização das estruturas microscópicas pela técnica de microcultivo. A. <i>Mucor</i> sp.; B. <i>Paecilomyces</i> sp.; C. <i>Penicillium</i> sp.; D. <i>Acremonium</i> sp.; E. <i>Fusarium</i> sp.; F. <i>Trichoderma</i> sp.; G. <i>Curvularia</i> sp.; H. <i>Aspergillus</i> sp.; I. <i>Cylindrocladium</i> sp.; J. <i>Epiccocum</i> sp. Barra = 100 µm.....	33
Figura 8. Curva padrão de Sulfato de Amônio (SIGMA-ALDRICH).....	36
Figura 9. Fungos de amostras de solos amazônicos, primeiro relato como produtores de L-asparaginase. A. <i>Acremonium</i> sp.; B. <i>Cylindrocladium</i> sp.; C. <i>Epiccocum</i> sp.; D. <i>Geotrichum</i> sp.....	40

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pag.
Quadro 1. Microrganismos produtores, pH e temperatura ótima de cultivo de algumas L-asparaginases produzidas por fungos.....	21
Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de coleta de solos para isolamento de fungos.....	24
Tabela 2. Análise quantitativa dos fungos isolados em amostras de solo em Remanescente de Floresta Primária (RFP) e de Floresta Secundária (RFS).....	31
Tabela 3. Relação das morfoespécies de fungos isolados em amostras de solo em Remanescente de Floresta Primária (RFP) e Remanescente de Floresta Secundária (RFS).....	34
Tabela 4. Gêneros dos fungos isolados e valores médios (U/ml) da atividade enzimática produzida em meio líquido Czapek dox modificado.....	37

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASN	Asparagina sintetase
BDA	Batata-dextrose-ágar
CDM	Meio Czapek Dox modificado
Cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al	Expressão em latim para “e outros” usada em citações bibliográficas quando há vários autores
g	Gramas
ha	Hectare
HCl	Ácido clorídrico
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
Km	Constante de Michaelis
LMA	Leucemia mielóide aguda
M	Molar
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm ²	Milímetro quadrado
MS	Ministério da Saúde
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEG	L-asparaginase de <i>E. coli</i> conjugada ao polietilenoglicol
p.H	Potencial hidrogeniônico
PZ	Parque Zoobotânico da Univesidade Federal do Acre
RNA	Ácido ribonucleico
RNA ^t	RNA transportador
rpm	Rotação por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UFAC	Universidade Federal do Acre
UI	Unidades internacionais
°C	Grau Celsius
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. INTRODUÇÃO	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 L-asparaginase	16
3.2 Fungos produtores de L-asparaginase	20
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo Geral	23
4.2 Objetivos Específicos	23
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1 Área de Estudo	24
5.2 Isolamento e Conservação de Fungos de Solos Amazônicos	24
5.3 Identificação Taxonômica	26
5.4 Análise quantitativa de produção de L-asparaginase	27
5.5 Análise Estatística	28
5.5.1 Cálculo da atividade de L-asparaginase	28
5.5.2 Determinação da concentração de amônio	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Fungos de amostras de solos amazônicos produtores de L-asparaginase	31
6.2 Seleção de fungos produtores de L-asparaginase em cultivo submerso	35
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. APRESENTAÇÃO

A presente dissertação, intitulada “Fungos de Amostras de Solos Amazônicos com Potencial para a Produção de L-asparaginase” está organizada em: Introdução, Revisão de Literatura, Objetivos, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão, Referências Bibliográficas e Anexos.

A introdução aborda um breve histórico sobre a L-asparaginase, sua indicação clínica, epidemiologia da Leucemia Linfóide Aguda, tratamento e novas perspectivas para o desenvolvimento de uma L-asparaginase de origem fúngica.

A revisão de literatura aborda temas como: Origem da L-asparaginase, mecanismo de ação, indicação clínica, Leucemia Linfóide Aguda, Fungos produtores de L-asparaginase, dinâmica da sua farmacologia e toxicologia.

Os objetivos estão organizados em Geral e Específicos, estando destacados no artigo.

O material e métodos aborda com detalhes o que foi realizado no estudo a fim de facilitar a sua reprodutibilidade no futuro.

Os resultados e discussão trazem a resposta do objetivo geral e dos objetivos específicos quanto ao isolamento e identificação dos fungos de solo, e sua quantificação enzimática.

Em seguida é apresentada a conclusão do estudo, posteriormente são apresentadas todas as referências utilizadas.

2. INTRODUÇÃO

Dentre os fármacos que podem ser utilizados no tratamento de Leucemia Linfóide Aguda (LLA), a enzima L-asparaginase tem sido empregada como o agente quimioterapêutico mais eficaz em oncoterapia pediátrica (EL-NAGAR, 2014). Trata-se de um produto natural que possui um amplo espectro de atividade antitumoral, tendo aplicabilidade no tratamento de muitas doenças, como a leucemia linfóide aguda, leucemia mielóide aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfóide crônica, doença de Hodgkin's, linfossarcoma, melanossarcoma e reticulossarcoma (DURVAL et al., 2002; WINK, 2009; KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012; SINGH; SRIVASTAV, 2013).

A L-asparaginase é a enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina, resultando em ácido aspártico e amônia (ALMEIDA, 2015). Atualmente, apenas as asparaginases de origem bacteriana provenientes de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* estão disponíveis para utilização médica (PIETERS et al., 2011; CORTIJO-CASCAJARES et al., 2012; RIZZARI et al., 2013; CHEN, 2015).

A leucemia é um câncer que afeta a medula óssea e o sangue, caracterizada por um acúmulo descontrolado de células sanguíneas anormais que leva à inibição das funções normais das células e em muitos casos, à morte (EL-NAGAR, 2014).

A Leucemia linfóide aguda (LLA) é uma neoplasia maligna, caracterizada por um elevado número de glóbulos brancos imaturos, que surgem devido a uma disfunção das células tronco da medula óssea, o que leva a proliferação clonal desordenada de células precursoras de origem linfóide que passam a circular no sangue na sua forma imatura, chamada de blastos (MORAIS et al., 2014; ALI, et al., 2016; MORAIS et al., 2016). Trata-se do câncer mais comum entre crianças, apresentando maior incidência entre o segundo e o quinto ano de vida (ALMEIDA, 2015). Apresenta variação entre sexo e raça, sendo que há maior frequência em crianças do sexo masculino, acometendo principalmente crianças caucasianas (ADELMAN et al., 2007; BELSON et al., 2007; ONCIU, 2009). E causa mais mortes do que qualquer outro câncer em crianças na fase da infância (KWAN et al., 2009).

Segundo Hunger et al. (2012), anualmente nos Estados Unidos são diagnosticados 6.000 novos caso de LLA, 60% desse total acomete pessoas com idade inferior a 20 anos. Já no Brasil, de cada 10 a 15 novos casos de câncer na faixa etária entre 1-19 anos, quatro são LLA, o que constitui cerca de um terço de todas as neoplasias mais frequentes na infância, sendo a principal causa de morte entre os jovens, perdendo apenas para causas externas. Em 2010 representou de 16 a 45% de todas as doenças malignas diagnosticadas nesta faixa etária

(CAMARGO et al., 2010; SILVA et al., 2014).

Ainda são desconhecidas as ocorrências patológicas que levam ao surgimento desta doença, no entanto, é improvável que seja resultado de apenas um único evento, neste contexto, surgem prováveis causas para o surgimento da LLA, como a interação entre os fatores ambientais e infecciosos, além de possíveis alterações genéticas (GREAVES; WIEMELS, 2003; KEBRIAIEI et al., 2003).

A disponibilidade de L-asparaginase apenas de origem bacteriana limita o tratamento da LLA devido à dificuldade na produção intracelular, o que torna a extração e purificação da enzima extremamente difícil e onerosa, além de comumente ocorrerem reações adversas com a sua utilização (MAHAJAN et al., 2013).

A existência de vários microrganismos produtores de L-asparaginase é uma grande vantagem para a obtenção de enzimas que possam ser utilizadas clinicamente sem ser de origem bacteriana (ALMEIDA, 2015). Esses microrganismos representam alternativa atraente, uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades e em um período de tempo relativamente curto (SARQUIS et al., 2004).

Apesar desse potencial biotecnológico ainda são poucos os trabalhos que relacionam o uso de fungos como produtores de L-asparaginase e inexistentes estudos que utilizam microrganismos Amazônicos para esta finalidade. Assim, esse estudo tem como objetivo selecionar fungos de solos amazônicos com potencial para produção de L-asparaginase.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 L-asparaginase

A L-asparaginase é a enzima responsável pela catálise da reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina, resultando em ácido aspártico e amônio (Figura 1) (ALMEIDA, 2015).

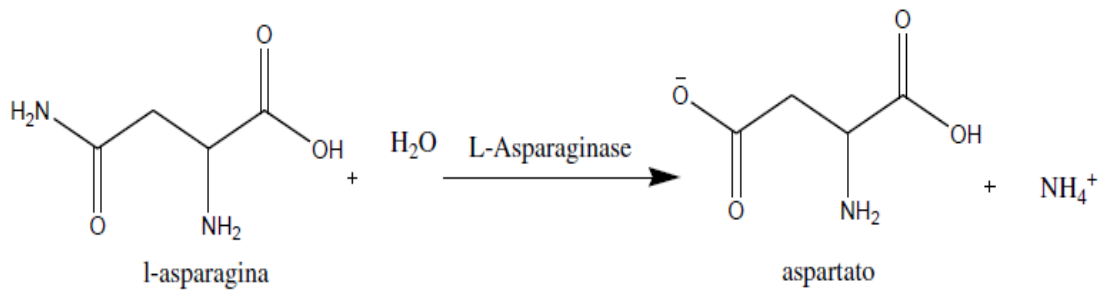


Figura 1. Reação catalisada pela L-asparaginase.

Fonte: NARTA et al. (2007)

Essa enzima está presente em aves, leveduras, mamíferos, plantas e em diversas bactérias, como a *Escherichia coli*, conforme representada na Figura 2. (WRISTON; YELLIN, 1973; EL-BESSOUMY et al., 2004).

10	20	30	40	50
MQKKSIIYVAY	TGGTIGMQRS	EQGYIPVSGH	LQRQLALMPE	FHRPEMPDFT
60	70	80	90	100
IHEYTPLMDS	S DMT PEDWQH	IAEDIKAHYD	DYDGFVILHG	TDTMAYTASA
110	120	130	140	150
LSFMLENLKG	PVIVTGSQIP	LAELRSDGQI	NLLNALYVAA	NYPINEVTLF
160	170	180	190	200
FNNRLYRGNR	T KAHADGFD	AFASPNLPPPL	LEAGIHIRRL	NTPPAPHGEG
210	220	230	240	250
ELIVHPITPQ	PIGVVTIYPG	ISADVVRNFL	RQPVKALIL	SYGVGNAPQN
260	270	280	290	300
KAFLELQEA	SDRGIVVNL	TQCMSGKVN	GGYATGNALA	HAGVIGGADM
310	320	330		
TVEATLTKLH	YLLSQELDTE	TIRKAMSQNL	RGELTPDD	

Figura 2 – Sequencia de resíduos de aminoácidos da enzima L-asparaginase de *Escherichia Coli*, a enzima conta com 338 resíduos de aminoácidos. Os resíduos destacados em amarelo indicam os aminoácidos que formam o sítio ativo enquanto que aqueles destacados em verde são sítios de ativação alostérica. A enzima cataliza a seguinte reação: L-asparagine + H₂O = L-aspartate + NH₄.

Fonte: (UniProtKB - P0A962 (ASPG1_ECOLI))

A descoberta sobre a L-asparaginase ocorreu em 1904 com a atividade da enzima em tecido bovino. Os resultados de Lang (1904) foram confirmados por Furth e Friedmann (1910), ao detectarem a hidrólise de L-asparagina em órgãos de cavalo e porco, uma vez que foi possível observar a mesma quantidade de atividade da enzima em ambos os animais. Além disso, Clementi (1922), relatou a atividade da L-asparaginase enquanto realizava experimentos utilizando soro de mamíferos e observou que o soro de porquinhos-da-índia apresentava essa atividade enzimática (NARTA et al., 2007). Alguns anos depois, Kidd (1953) relatou a regressão de linfomas transplantados em camundongos pela administração do soro dessas cobaias. Ele observou que a inibição do crescimento celular ocorreu apenas a partir da utilização do soro de porquinhos-da-índia e que soros obtidos a partir de outras espécies animais não apresentaram este efeito, além do fato de que apenas certos tipos de tumores se mostraram suscetíveis ao mesmo (EL-NAGAR et al., 2014). Mais tarde, Neuman e McCoy (1956), demonstraram que havia diferenças metabólicas entre células normais e malignas, na presença e ausência de L-asparagina. Broome (1961) após correlacionar os resultados de Clementi (1922) e Kidd (1953), percebeu que a regressão dos linfomas transplantados em camundongos ocorreu porque as células tumorais apresentavam uma dependência nutricional de asparagina exógena e assim, chegou à conclusão de que a atividade antitumoral era consequência da atividade enzimática da L-asparaginase (EL-NAGAR et al., 2014). Posteriormente, o mesmo autor realizou investigações que confirmaram o potencial terapêutico da enzima (BROMME, 1963a, 1963b). Yellin e Wriston (1966), em um estudo obtiveram a purificação parcial de duas isoformas da L-asparaginase a partir do soro de porquinhos-da-índia, entretanto, apenas uma isoforma exibiu atividade anti-tumoral *in vivo* (YELLIN; WRISTON JR, 1966).

A extração da L-asparaginase a partir do soro das cobaias era difícil e a quantidade extraída era insuficiente, por este motivo, as pesquisas se voltaram para novas fontes enzimáticas, especialmente as de origem microbiana (NARTA et al., 2007; LOUREIRO, 2010). Trabalhos publicados por Mashburn e Wriston (1964) investigaram uma fonte alternativa da enzima, L-asparaginase, derivada de *E. coli*, onde foram isolados, EC-1 (periplásmico) e EC-2 (citoplasmático). No entanto, apenas EC-2 exibiu atividade antitumoral. Oettgen et al. (1967), apresentaram de forma inicial a L-asparaginase como potencial fármaco anticancerígeno.

Em trabalho publicado por Campbell e Mashburn (1969), relataram a purificação da enzima L-asparaginase a partir de cepas da bactéria *Escherichia coli*, onde demonstraram sua atividade anti-tumoral, sendo semelhante àquela encontrada no soro dos porquinhos-da-índia.

Esses resultados foram de suma importância e proporcionaram um conhecimento sólido para que se iniciasse a produção enzimática em escalas maiores, o que contribuiu para a realização de estudos pré-clínicos e clínicos, estudos estes que não podiam ser realizados anteriormente haja vista que não se obtinha das cobaias quantidades satisfatórias da enzima para este tipo de estudo (ASSELIN et al., 1993; NARTA et al., 2007; ALI et al., 2016).

As L-asparaginases estão entre os principais grupos de proteínas terapêuticas, sendo responsáveis por cerca de 40% de todo o comércio global de agentes anti-leucêmicos e anti-linfoma (WARANGKAR et al., 2009).

Alguns tipos de células tumorais carecem de elevadas quantidades de L-asparagina para seu desenvolvimento, além do que a própria célula é capaz de sintetizar, utilizando as reservas do aminoácido que está presente no soro sanguíneo buscando satisfazer sua demanda (NARTA et al., 2007). Uma vez injetada na corrente sanguínea a enzima exauri as reservas de L-asparagina do plasma e as células tumorais não são capazes de completar a síntese protéica, induzindo a apoptose das células neoplásicas (FERNANDEZ et al., 2013; GUILLEME et al., 2013; TALLURI et al., 2014). As células normais não são afetadas, pois são capazes de sintetizar asparagina através da enzima asparagina sintetase, ao contrário das células tumorais, que não são capazes de fazê-lo devido a um silenciamento genético (Figura 3).

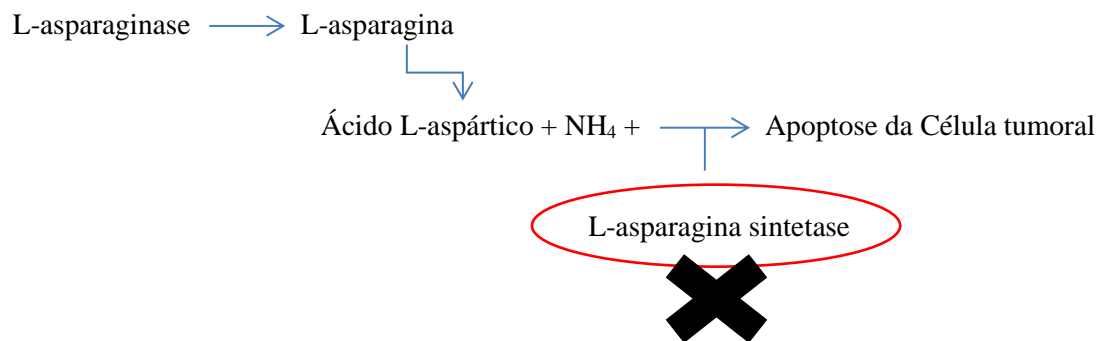


Figura 3. Ação da L-asparaginase em Célula Tumoral.

A L-asparaginase é um bioproduto antitumoral, utilizada no tratamento de várias doenças como: a Leucemia linfóide aguda, Leucemia mielóide aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, doença de Hodgkin's, linfossarcoma, melanossarcoma e reticulossarcoma (DUVAL et al., 2002; SCHRAPPE et al., 2000; WINK, 2009; KAVITHA; VIJAYALAKSHMI, 2012).

Atualmente seu principal uso ocorre nos casos de LLA em combinação com drogas de diferentes mecanismos de ação, divididas em três fases: I- remissão-indução, II- consolidação

e III- fase de manutenção (ANDRADE et al., 2014). A fase da indução busca o retorno à hematopoiese normal, levando os pacientes à remissão da doença, realizada com a utilização de uma combinação de quatro agentes antineoplásicos, como corticosteróides, outros agentes quimioterápicos, como metotrexato, vincristina, e mercaptopurina, que podem potencializar o efeito da L-asparaginase (ASSELIN et al., 1999; ABSHIRE et al., 2000; ALMEIDA, 2015). Essa fase tem duração de aproximadamente, quatro semanas, com percentuais de remissão chegando a 95% (PUI; EVANS, 2006; ANDRADE et al., 2014; QUINTANILLA-FLORES et al., 2014).

A consolidação tende a manter a remissão, prevenindo infiltrações no Sistema Nervoso Central (SNC), com duração variando de 2 a 8 meses, com a utilização de elevadas doses de metotrexato (ALMEIDA, 2015).

Na manutenção é realizada a terapia, com duração de pelo menos dois anos, a fim de se obter o controle da LLA, além da utilização de doses baixas de metotrexato combinado, geralmente com mercaptopurina (JEHA; PUI, 2009).

Há disponível comercialmente três formas de L-asparaginase, as obtidas da *Escherichia coli* que são a L-asparaginase nativa e a L-asparaginase peguilada (PEG-asparaginase), possuindo ligação covalente a um grupo de polietilenoglicol, e a L-asparaginase obtida de *Erwinia chrysanthemi* (Crisantaspase), que possuem a mesma ação, no entanto, com propriedades farmacológicas diferentes (WINK, 2009; CORTIJO-CASCAJARES et al., 2012; RIZZARI et al., 2013).

A utilização de terapia parenteral com L-asparaginase em seres humanos apresenta dois importantes padrões de toxicidade. O primeiro está relacionado à ocorrência de reações de hipersensibilidade, devido ao fato de se introduzir uma proteína estranha no organismo; já o segundo, apresenta sinais de toxicidade provocados pela atividade de glutaminase e devido à liberação de produtos a partir da hidrólise enzimática, gerando efeitos secundários tais como alterações de coagulação, diabetes, náuseas, pancreatite e reações alérgicas (DURVAL, 2002; GRAHAM, 2003; VERMA et al., 2007; LOUREIRO, 2010; RIZZARI et al., 2013).

Dentre os efeitos colaterais a hipersensibilidade é a mais frequente, sua incidência varia de 6 a 43%, além, dos casos de anafilaxia grave ocorrendo em 10% dos casos (CORTIJO-CASCAJARES et al., 2012).

No tratamento de pacientes utilizando a enzima derivada de *E. coli*, ocorre no início hipersensibilidade média de 4%, já durante a indução esse valor pode alcançar 80% em pacientes que são expostos a doses adicionais da L-asparaginase (KURTZBERG et al., 2011).

Levando a produção de anticorpos anti-L-asparaginase, sendo a principal resistência ao medicamento, se apresentando com sinais de hipersensibilidade clínica ou ser assintomática (PANOSYAN et al., 2004; PIETERS et al., 2011; TONG et al., 2014).

Recomenda-se a utilização da L-asparaginase peguilhada (conjugada com polietilenoglicol), em pacientes que apresentem hipersensibilidade grave quando da utilização da L-asparaginase nativa obtida de *E. coli*, pois a primeira apresenta baixa imunogenicidade e possui uma vida biológica maior (ASSELIN et al., 1993; AVRAMIS et al., 2002; NARTA et al. 2007; PIETERS et al., 2011).

Os problemas com a utilização da quimioterapia com L-asparaginase no tratamento da LLA, tem gerado uma busca por tratamentos mais específicos que acarretem menores consequências ao paciente (NARTA et al., 2007; ANDRADE et al., 2014; ALMEIDA, 2015).

3.2 Fungos produtores de L-asparaginase

Por serem organismos metabolicamente ativos, os fungos são explorados comercialmente como fonte celular para a produção de várias enzimas, devido a uma melhor compatibilidade com o sistema humano (ALMEIDA, 2015; DANGE; PESHWE, 2015). Há o conhecimento de diversas espécies de fungos produtores de enzimas, além de inúmeras pesquisas em todo o mundo que são realizadas buscando isolar esses produtos (SUN et al., 2011). Devido a diversidade de metabólitos produzidos pelos fungos, estes tem sido alvos de pesquisas para a produção de novos fármacos. Neste contexto, pode-se citar a enzima L-asparaginase que, ao longo das últimas décadas, tem surgido como um excelente agente anti-neoplásico, especialmente utilizado no tratamento da LLA (SINGH; SRIVASTAV, 2013).

A existência de vários microrganismos produtores de L-asparaginase é uma grande vantagem para a obtenção de enzimas que possam ser utilizadas clinicamente, entretanto nem todas as L-asparaginases apresentam atividade antileucêmica (VAN DEN BERG, 2011; ALMEIDA, 2015). Dentre estes microrganismos, estão os actinomicetos, algas, fungos e leveduras, entretanto, as bactérias ainda são as principais fontes utilizadas na produção desta enzima (MISHRA, 2006; NARTA et al., 2007; RAMYA et al., 2011).

Várias espécies de fungos filamentosos são conhecidas como produtoras da L-asparaginase, destacando-se as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Penicillium* (NAKAHAMA et al., 1973; SHRIVASTAVA et al., 2012; MOHANKUMAR; MANONMANI, 2013; PATRO et al., 2014).

Alguns exemplos de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Microrganismos produtores de L-Asparaginase, pH e temperatura ótima de cultivo de algumas L-asparaginases produzidas por fungos.

Microrganismo produtor	pH ótimo	Temperatura ótima	Referência
<i>Alternaria</i> sp.	-	-	Nagarajan et al., (2014)
<i>Aspergillus aceulatus</i>	9,0	30	Dange e Peshwe (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	6	37	Luhana et al. (2013)
<i>Aspergillus oryzae</i>	6,2	37	Gulati et al. (1997)
<i>Aspergillus terreus</i>	5-7	40-45	Ali et al. (2016)
<i>Cladosporium</i> spp.	6,3	30	Mohankumar e Manonmani (2013)
<i>Cylindrocarpo nobtusisporum</i>	7,4	37	Raha et al. (1990)
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	27	Tippani e Sivadevuni (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	27	Tippani e Sivadevuni (2012)
<i>Fusarium semitectum</i>	-	27	Tippani e Sivadevuni (2012)
<i>Fusarium tricinctum</i>	7,5-8,7	-	Scheetz et al. (1971)
<i>Mucor hiemalis</i>	7,0	37	Thakur et al. (2013)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	8,0	37	Elshafei et al. (2012)
<i>Penicillium digitatum</i>	7,0	30	Shrivastava et al. (2015)
<i>Penicillium</i> sp.	7,0	37	Patro et al. (2014)
<i>Rhizomucor miehei</i>	7,0	45	Huang et al. (2014)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6,8	-	Dunlop et al. (1978)
<i>Talaromyces pinophilus</i>	8,0	28	Krishnapura e Belur (2016)
<i>Trichoderma viride</i>	6,5	37	Lincoln et al. (2015)

VIANNA (2016) produziu L-asparaginase a partir de amostras de solos da Antártica utilizando o meio Czapek-Dox modificado (CDM) composto por glicose (2,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH_2PO_4 (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,52 g/L), $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,001 g/L), suplementado com vermelho de fenol (0,28 ml/100mL). Vipina e Chitra (2016) utilizando meio de cultura semelhante, isolaram fungos com atividade enzimática a partir de amostras de solo coletadas do manguezal de Kadalundi (Índia), os isolados foram identificados como *Aspergillus oryzae* e *Byssoschalymus niveus*.

Doriya e Kumar (2016) utilizando o meio Czapek-Dox modificado (CDM), porém suplementado com azul de bromotimol, selecionou os gêneros de fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichophyton* sp. e *Onychocola* sp., isolados de amostras de solo de 3 cidades indianas. Rani et al. (2012), avaliaram a produção de L-asparaginase a partir de cepas fúngicas isoladas de solos de diferentes regiões da Índia, indicando que os solos podem ser considerados ricas fontes de fungos produtores enzimáticos.

Foster e Said (2005a, 2005b) em estudo realizado em Sertãozinho-SP, selecionaram, três cepas de *Aspergillus terreus* produtoras de L-asparaginase quando cultivados em cultura

líquida. Um estudo realizado com amostras de solos da Paraíba também evidenciou produção de L-asparaginase, onde o fungo *Aspergillus terreus* foi considerado a melhor cepa produtora (ROCHA, 2017).

A Amazônia caracterizada como a maior floresta tropical do mundo, abrigando mais da metade da biodiversidade do planeta, com importante papel na a manutenção de serviços ecológicos tais como, à garantia da qualidade do solo, ainda não são relatados estudos relacionados à produção de L-asparaginase, o que tona necessária e oportuna à pesquisa nessa região, devido ao grande potencial para o desenvolvimento biotecnológico (AZEVEDO-RAMOS, 2001).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Analisar fungos de amostras de solos Amazônicos produtores de L-asparaginase.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1 Isolar e identificar fungos filamentosos produtores de L-asparaginase de amostras de solos Amazônicos;

4.2.2 Quantificar a produção extracelular da enzima L-asparaginase por fungos filamentosos isolados de amostras de solos Amazônicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Área de Estudo

Foram coletadas 20 amostras de solo (Tabela 1), sendo dez em área de Remanescente de Floresta Primária com área de 2.111 ha, localizada no município de Senador Guimard - AC, no entroncamento das rodovias BR-364 e 317. Este local, é caracterizado como floresta tropical de terra firme, incluindo a floresta aberta com bambus, palmeiras (forma predominante) e floresta densa (FUNTAC, 1990; IMAC, 2000), e dez amostras em Remanescente de Floresta Secundária, com área de 144 ha, apresentando espécies animais e vegetais constituindo a maior área verde dentro do perímetro urbano, localizada na Universidade Federal do Acre campus de Rio Branco – AC.

Tabela 1. Localização geográfica dos pontos de coleta de solos para isolamento de fungos.

Floresta Primária		Floresta Secundária	
Amostra	Coordenadas	Amostra	Coordenadas
1	10° 03.966'S 67° 36.358'O	1	9° 57.561'S 67° 52.300'O
2	10° 04.002'S 67° 36.306'O	2	9° 57.684'S 67° 52.260'O
3	10° 04.322'S 67° 36.899'O	3	9° 57.761'S 67°52.060'O
4	10° 04.388'S 67° 37.251'O	4	9° 57.565'S 67°52.121'O
5	10° 04.416'S 67° 37.359'O	5	9° 57.533'S 67°52.133'O
6	10° 04.504'S 67° 37.365'O	6	9° 57.489'S 67°51.675'O
7	10° 04.385'S 67° 37.433'O	7	9° 57.428'S 67°51.694'O
8	10° 04.380'S 67° 37.159'O	8	9° 56.855'S 67°52.193'O
9	10° 04.393'S 67° 37.007'O	9	9° 57.635'S 67°52.194'O
10	10° 04.192'S 67° 36.550'O	10	9° 56.897'S 67°52.208'O

5.2 Isolamento e Conservação de Fungos de Solos Amazônicos

As amostras foram coletadas a uma profundidade de 0-10 cm (SUBHAN et al., 2015), depositadas em sacos plásticos devidamente identificados e transportadas até o Laboratório de Microbiologia da UFAC. Em seguida, foram pesados 2g de cada amostra e suspensa em 18 ml de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada, agitada durante uma hora a 120 rpm a 28 °C. Posteriormente, foi preparada diluição seriada de 10⁻¹ e 10⁻² (BILLS et al., 2004; TADDEI et al., 2006), e uma alíquota de 0,1 ml da diluição 10⁻² foi semeada com alça de Drigalsk em placas de Petri contendo o meio ágar Czapek-Dox modificado (glicose 2g, L-asparagina 10g, KH₂PO₄ 1,52g, KCl 0,52g, MgSO₄.7H₂O 0,52g, Cu(NO₃)₂.3H₂O (0,0002g), ZnSO₄.7H₂O (0,0002g), FeSO₄.7H₂O (0,0002g), ágar 18g, antibiótico cloranfenicol 100 mg para 1000 ml de água destilada), com pH inicial ajustado para 5,6, suplementado com 0,009% (v/v) de

púrpura de bromocresol (SYNTH) como corante indicador conforme descrito na figura 4 (GULATI; SAXENA e GUPTA, 1997).

A asparagina foi utilizada como única fonte de nitrogênio para a seleção de fungos potencialmente produtores da enzima L-asparaginase. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C \pm 2 °C durante 72 horas. Foram preparadas e semeadas placas controle que não continham em sua formulação o aminoácido L-asparagina. Desta maneira, pode-se sugerir que o aparecimento do halo apenas na placa teste, é um forte indício de que o aumento do pH do meio é devido a quebra da L-asparagina pela enzima L-asparaginase (THEANTANA et al., 2007; MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015).

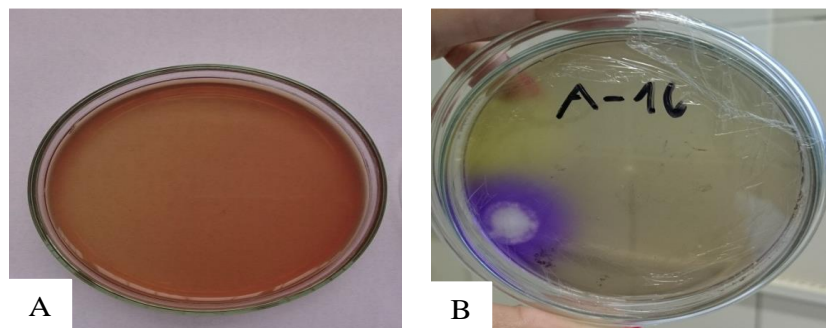


Figura 4. Isolamento de fungos produtores de L-asparaginase. **A.** placa controle negativo; **B.** Placa de isolamento após 24 horas de incubação, com formação de halo roxo ao redor da colônia indicando a possível produção de L-asparaginase pela espécie fúngica.

Fungos formando uma zona arroxeadada no meio ágar Czapek-Dox modificado indicando uma possível produção de L-asparaginase, foram purificados por meio da técnica de estrias por esgotamento e posteriormente transferidos para tubos contendo meio batata-dextrose-ágar – BDA (infusão de batata 200g, dextrose 20g e ágar 15g para 1000 ml de água destilada).

Decorrido o período de sete dias, os isolados foram avaliados quanto as características macroscópicas como: forma, tamanho, cor das colônias (SUBHAN et al., 2015), esporulação micélio aéreo e micélio substrato (TADDEI et al., 2006) e agrupados aqueles com características semelhantes em morfotipos.

Em seguida, os fungos foram armazenados na Coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre por meio das técnicas de preservação em água destilada esterilizada (CASTELLANI, 1939) e óleo mineral (BUELL; WESTON, 1947).

A conservação por meio do método em óleo mineral consiste em cultivar o fungo em meio de cultura BDA e logo após, cobrir essa colônia com óleo mineral esterilizado mantendo

a temperatura ambiente (BUELL; WESTON, 1947).

Para conservação em água destilada, os fungos foram inoculados em placas de Petri com meio BDA e após o período de 14 dias de crescimento, os fungos foram cortados em cubos medindo aproximadamente 5 mm² e transferidos para microtubo de 2 ml contendo água destilada esterilizada, sendo posteriormente armazenado em temperatura ambiente (BUENO, 2006).

5.3 Identificação Taxonômica

A identificação dos fungos isolados foi realizada utilizando métodos clássicos. Foram consideradas as características macromorfológicas como tamanho da colônia, textura e produção de pigmento, e as características micromorfológicas como formação de conídios, esporos e micélio (BARNETT; HUNTER, 1972; LACAZ et al., 1991; KO et al., 2011).

Para visualização das características micromorfológicas, foi realizado cultivo em lâmina (RIDDEL, 1950) que consiste em colocar sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar em cada lado da lâmina. Neste estudo foram utilizados os meios ágar aveia (30g de aveia, 15 g de ágar para 1000 ml de água destilada) e BDA. A lâmina estava sobre um suporte formado por outra lâmina, posteriormente o fungo foi semeado nos 4 lados do cubo de ágar e recoberto com uma lamínula esterilizada. Após este procedimento, fez-se uma câmara úmida, embebendo um pequeno chumaço de algodão estéril em água destilada estéril, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. A placa foi tampada e deixada à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observou o desenvolvimento de hifas. Posteriormente retirou-se a lamínula com auxílio de uma pinça, pingou-se uma gota de corante azul de lactofenol-algodão (“Cotton Blue”) e montou-se a lâmina (LACAZ et al., 1991; LARONE, 2000; ANVISA, 2004). Foram observadas as estruturas vegetativas e reprodutivas (Figura 5) podendo estas serem comparadas com a literatura específica para identificação (BARNETT; HUNTER, 1972).

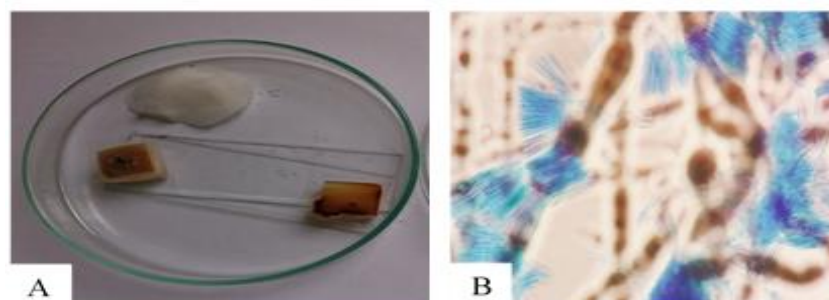


Figura 5. Identificação dos fungos isolados utilizando métodos clássicos. **A.** Técnica de Microcultivo; **B.** Observação de estrutura reprodutiva.

5.4 Análise quantitativa de produção de L-asparaginase

Os isolados fúngicos foram cultivados em 3ml de meio líquido Czapek-Dox modificado, sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 96h (Figura 6). Ao final do processo fermentativo, as culturas foram colhidas e os micélios foram separados do caldo de fermentação por filtração em papel de filtro e o filtrado de cultura utilizados para posterior análise quantitativa da enzima bruta L-asparaginase (LOUREIRO, 2010).

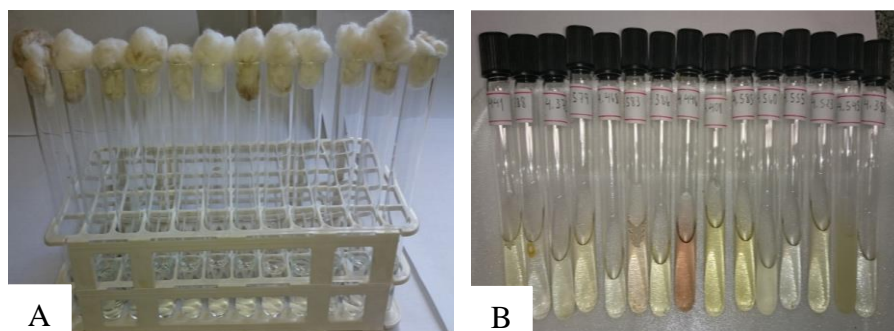


Figura 6. Fermentação de fungos produtores de L-asparaginase para análise quantitativa da enzima. **A.** Meio líquido de Czapek-Dox Modificado; **B.** Obtenção do extrato bruto enzimático.

O nível de enzima L-asparaginase na cultura dos filtrados foi determinado utilizando o método de Imada et al. (1973). Desta forma, determinou-se a taxa de hidrólise de L-asparagina medindo o amoníaco libertado utilizando o reagente de Nessler (KI 5g, HgCl₂ 2,5g, KOH 15g – ALPHA QUÍMICA), para 1000 ml de água destilada, preparados segundo Morita e Assumpção (2001). Uma mistura de 0,5 ml de extrato enzimático, 0,5 ml de 0,04 M de L-asparagina (SIGMA-ALDRICH), 0,5 ml de 0,05 M de tampão Tris-HCl (SIGMA-ALDRICH) (pH 7,2) e 0,5 ml de água destilada foi incubado a 37°C em Banho-Maria (QUIMIS) durante 30 min.

A reação foi parada pela adição de 0,5 ml de 1,5 M de ácido tricloroacético- TCA (ALPHA QUÍMICA). O amoníaco libertado no sobrenadante foi determinado por espectrofotômetro (QUIMIS), através da adição de 0,2 ml de reagente de Nessler em tubos contendo 0,1 ml de sobrenadante e 3,7 ml de água destilada e incubadas a temperatura ambiente durante 20 min. Foram preparados tubos para o branco da amostra, onde utilizou-se 0,5 ml de extrato enzimático, 0,5 ml de 0,04 M de L-asparagina, 0,5 ml de 0,05 M de tampão Tris-HCl (pH 7,2), 0,5 ml de água destilada e 0,5 ml de 1,5 M de ácido tricloroacético (TCA).

A absorvância foi medida a 450 nm em Espectrofotômetro. A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (UI) ml⁻¹, sendo definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de um μmol de NH₃ min⁻¹.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, obtendo-se o resultado através das médias. O teor de amoníaco foi estimado através de curva analítica preparada a partir de várias diluições de uma solução de sulfato de amônio (4mM) (SIGMA-ALDRICH). Em cada dia de análise foi preparada uma nova curva padrão, todos os dados foram valores médios de três medições repetidas (SHRIVASTAVA et al., 2012).

5.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Action Stat 3, GraphPad Prism versão 5.01 e, quando necessário, os valores encontrados foram comparados a partir do teste *one-way* ANOVA, seguido pelo teste de análise de Tukey.

5.5.1 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, aonde a quantidade de amônio disponível no meio é proporcional à atividade da enzima (ABDELFAH; 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 a seguir (1):

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

A diferença de absorvância é utilizada contra uma curva analítica para determinação da concentração de amônio liberado na reação.

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 a seguir (2):

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

Após a obtenção da curva analítica, construída a partir de soluções de concentração conhecida de amônio $[NH_3^+]$, obtém-se a equação da reta. O coeficiente angular da reta gerada (a) informa a velocidade em que o aumento de absorbância corresponde a um aumento de amônio, dado pela equação da reta a seguir (3):

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

Onde:

Y , absorbância

a , coeficiente angular da reta

x , concentração de amônio

A partir da equação da reta é possível obter a concentração de amônio $[NH_3^+]$ 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.

$$A = [(\Delta \text{ABS a PM } [NH_4^+]) \times d / t / \text{incubação}] / \text{vol amostra.} \quad (5)$$

Onde:

$\Delta \text{ ABS} = (\text{ABS } T=30 - \text{ABS } T=0)$;

a = inclinação da curva analítica padrão;

$\text{PM } [NH_4^+] =$ 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.

5.5.2 Determinação da concentração de amônio

A dosagem de amônio presente no meio foi realizada a partir de amostra de 0,1 ml do sobrenadante coletado das culturas fúngicas. Esse volume de amostra foi pipetado sobre 0,2 ml de Reagente de Nessler e 3,7 ml de água destilada. A mistura foi incubada em banho-maria por 20 minutos a 28 ± 2 °C, sendo obtidos os valores de absorbância por espectrofotometria a 450 nm (IMADA et al., 1973). Estes valores foram substituídos na curva analítica para a obtenção dos valores de concentração correspondentes.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Fungos de amostras de solos amazônicos produtores de L-asparaginase

Foram obtidos 126 fungos filamentosos utilizando isolamento direcionado, a partir de 10 amostras de solos coletados em remanescente de Floresta Primária e remanescente de Floresta Secundária. Estes fungos produziram halos indicativos de degradação enzimática no meio ágar CDM, o que sugeriu a produção da enzima L-asparaginase.

Tabela 2. Análise quantitativa dos fungos isolados em amostras de solo em Remanescente de Floresta Primária (RFP) e Remanescente Floresta Secundária (RFS).

Gênero	RFP	RFS	TOTAL	FR %
<i>Mucor</i>	14	21	35	24,59
<i>Paecilomyces</i>	17	12	29	22,97
<i>Penicillium</i>	7	16	23	18,24
<i>Acremonium</i>	4	4	8	6,32
<i>Curvularia</i>	1	4	5	3,97
<i>Fusarium</i>	3	3	6	4,74
<i>Trichoderma</i>	3	3	6	4,75
<i>Aspergillus</i>	0	1	1	0,79
<i>Cylindrocladium</i>	1	0	1	0,79
<i>Epicoccum</i>	0	1	1	0,79
<i>Geotrichum</i>	0	1	1	0,79
<i>Mycelia sterilia</i>	2	2	4	3,16
N.I	2	4	6	4,74
TOTAL	54	72	126	100
FR (%)	42,86	57,14	100	

FR=Freqüência, N.I= Não identificado

Em Remanescente de Floresta Primária foram obtidos 54 isolados, estes foram classificados em 9 gêneros, sendo a maioria pertencente ao gênero *Paecilomyces*, seguido por *Mucor*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Mycelia sterilia* e Não Identificados (Tabela 2).

Entre os isolados identificados nesse estudo, *Mucor* foi o gênero mais frequente. Sabe-se que os mucoráceos desempenham um importante papel quando se trata dos processos iniciais de reciclagem e são responsáveis pela colonização primária do substrato a partir da utilização de açúcares mais simples, como a glicose (HESSELTINE; ELLIS, 1973). *Mucor hiemalis* é uma espécie que apresenta produção de L-asparaginase já descrita na literatura

científica (PERRAUD; LABORET, 1995; THAKUR et al., 2013). No exterior existem diversos estudos relacionados à diversidade de Mucorales, já no Brasil poucos são os trabalhos nessa área, existindo apenas referências para o estado de São Paulo (TRUFEM 1981a, b, c, 1984; TRUFEM; VIRIATO, 1985; SCHOENLEIN-CRUSIUS et al., 1996) e outros na região Nordeste (LIRA, 1971), este tipo de estudo é de grande importância e visa a descoberta de novos organismos com fins biotecnológicos (ALVES et al., 2002).

O gênero *Paecilomyces* está amplamente distribuído no solo, podendo ser encontrado no ar e em substratos lignocelulíticos, bem como em resíduos de madeira e outros produtos florestais (OLIVEIRA et al., 2016). Apresenta potencial biotecnológico, agroindustrial e medicinal (RHEEA et al., 2016). Em estudo recente descobriu-se que *Paecilomyces lilacinum* é uma espécie que apresenta produção de L-asparaginase (VIMAL; KUMAR, 2017).

O gênero *Penicillium* também apresenta produção de L-asparaginase já descrita na literatura científica, em um screening de cepas de fungos filamentosos produtores de L-asparaginase realizado, uma de suas espécies, o *Penicillium brevicompactum* apresentou melhor produção dessa enzima (ELSHAFEI et al., 2012; RANI et al., 2012).

Em Remanescente de Floresta Secundária foram obtidos 72 isolados, classificados em 11 gêneros, sendo a maioria pertencente ao gênero *Mucor*, seguido por *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Epiccocum*, *Geotrichum*, *Mycelia sterilia* e não Identificados (Tabela 2).

Os dados revelaram que nessa área onze gêneros identificados e no Remanescente de Floresta Primária houve dez, a ocorrência de gêneros de forma ocasional também foi observada, sendo *Aspergillus*, *Epiccocum* e *Geotrichum* isolados somente no PZ e o gênero *Cylindrocladium*, isolado somente em Remanescente de Floresta Primária. Os gêneros *Cylindrocladium*, *Epiccocum* e *Geotrichum*, não são comumente isolados em meio padrão BDA, sabe-se que para um fungo produzir L-asparaginase o meio de cultivo deve estimular que o microrganismo se utilize de diferentes fontes de nitrogênio como a glutamina 1%, prolina 2% e uréia 0,2% (SARQUIS et al., 2004).

Quantidades similares de isolados foram registrados em estudo realizado com amostras de cinco áreas de diferentes locais de solo Indiano, não sendo citada a quantidade de amostras coletadas. Essas amostras permitiram a obtenção de 135 isolados fúngicos apresentando reação positiva para a produção de L-asparaginase indicado pela mudança de cor dos meios suplementados com os corantes púrpura de bromocresol e vermelho de fenol entre 48-72 horas de incubação a 28 °C (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015).

Em uma pesquisa realizada em solos provenientes da caatinga, com amostras de cinco locais escolhidos aleatoriamente, foram isolados 85 fungos, o que indica que a região e a metodologia de coletas empregadas podem influenciar na quantidade de fungos isolados (OLIVEIRA et al., 2013).

Os isolados obtidos neste estudo foram classificados morfológicamente de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas em 62 morfoespécies, das quais 47 foram identificadas, a morfologia das hifas e as estruturas reprodutivas dos gêneros de fungos identificados pela técnica de microcultivo podem ser observadas na Figura 7.

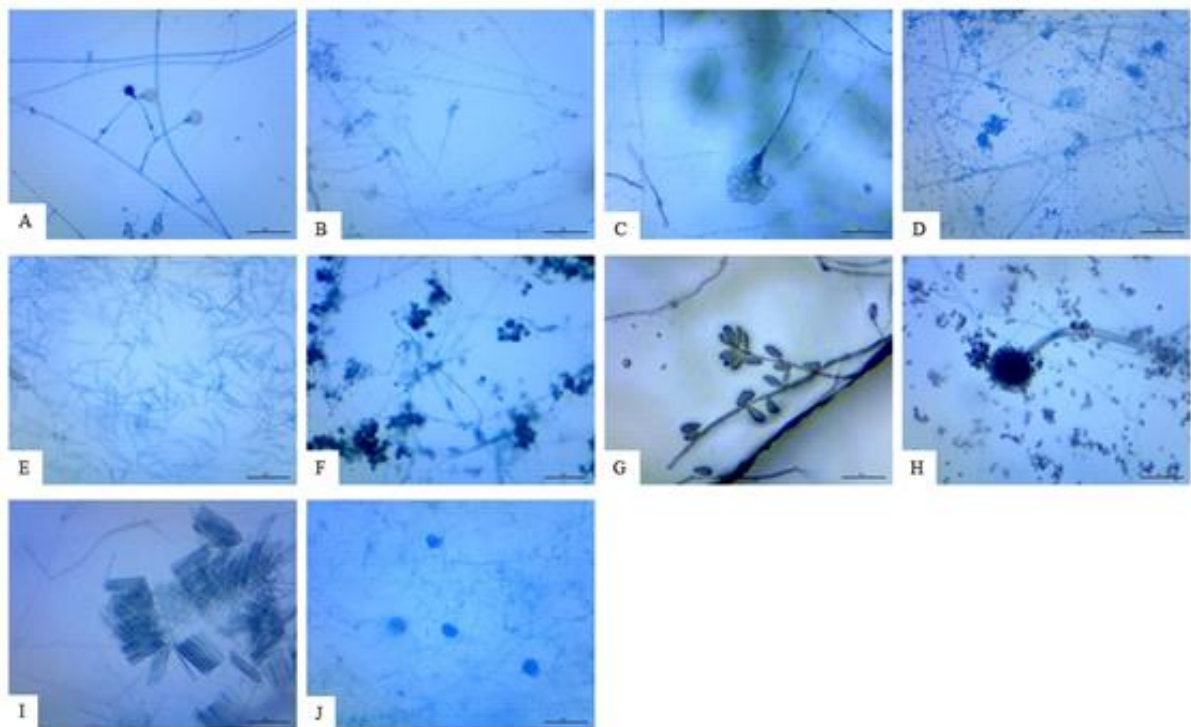


Figura 7. Análise das características micromorfológicas de fungos produtores de L-asparaginases isolados de solos amazônicos. Visualização das estruturas microscópicas pela técnica de microcultivo. **A.** *Mucor* sp.; **B.** *Paecilomyces* sp.; **C.** *Penicillium* sp.; **D.** *Acremonium* sp.; **E.** *Fusarium* sp.; **F.** *Trichoderma* sp; **G.** *Curvularia* sp.; **H.** *Aspergillus* sp.; **I.** *Cylindrocladium* sp.; **J.** *Epicoccum* sp. Barra = 100 μ m.

A identificação taxonômica dos isolados seguiu os métodos tradicionais, sabe-se que os mesmos apresentam limitações, principalmente quando se trata da identificação de espécies, devido às dificuldades quanto à correlação de estruturas que não estão explícitas nos manuais de identificação (LI et al., 2016), porém embora sejam falhos, são ainda muito utilizados para o estudo de fungos (PASSARINI et al., 2013; DING et al., 2013), no entanto, mesmo se configurando como um grande desafio, em apenas 10 (16,12%) isolados este método foi insuficiente para a identificação de gênero. É de extrema importância levar em

consideração os fatores que influenciam diretamente, tais como: meio de cultivo e habilidade do fungo em esporular no meio de cultura (KO et al., 2011). Assim, para a identificação de espécie, seria necessária uma análise por meio de caracterização molecular (BARKA et al., 2016).

Os isolados foram classificados morfológicamente de acordo com suas características macroscópicas em 62 táxons, sendo 28 (45,16%) de Remanescente de Floresta Primária e 41 (66,12%) referentes às amostras de solo do remanescente de Floresta Secundária e 11 táxons que estavam presentes em ambos os locais (11,29%), conforme a tabela 3. Para todos os testes subsequentes, utilizaram-se estes táxons.

Nas amostras de solo de Remanescente de Floresta Primária foi observada predominância de fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* (28,57%), seguido pelo gênero *Acremonium* (14,28%), *Penicillium* (10,71%), *Fusarium* (10,71%) e *Mucor* (10,71%). Entre os isolados, 7,14% não apresentaram estruturas reprodutivas e 7,14% permaneceram sem identificação taxonômica pela literatura utilizada para identificação (Tabela 3).

Tabela 3. Relação das morfoespécies de fungos isolados em amostras de solo em Remanescente de Floresta Primária (RFP) e Remanescente de Floresta Secundária (RFS).

Táxons	RFP	RFS	TOTAL	FR %
<i>Paecilomyces</i> spp.	8	10	15	24,19
<i>Penicillium</i> spp.	3	8	11	17,74
<i>Acremonium</i> spp.	4	4	8	12,90
<i>Fusarium</i> spp.	3	3	6	9,68
<i>Mucor</i> spp.	3	3	4	6,45
<i>Trichoderma</i> spp.	1	3	3	4,86
<i>Aspergillus</i> spp.	0	1	1	1,61
<i>Curvularia</i> spp.	1	1	1	1,61
<i>Cylindrocladium</i> spp.	1	0	1	1,61
<i>Epicoccum</i> spp.	0	1	1	1,61
<i>Geotrichum</i> spp.	0	1	1	1,61
<i>Mycelia sterilia</i> spp.	2	2	4	6,45
N.I	2	4	6	9,68
TOTAL	28	41	62	100
FR (%)	45,15	66,12	100	

FR=Freqüência, N.I= não identificado

Com relação à identificação dos isolados de amostras de Remanescente de Floresta Secundária foi registrada predominância de fungos pertencentes ao gênero *Paecilomyces* (24,39%), seguidos pelos fungos do gênero *Penicillium* (19,51%), *Acremonium* (9,75%)

Fusarium (7,31%), *Mucor* (7,31%), e *Trichoderma* (7,31%). Dos fungos isolados, 4,87% não apresentaram estruturas reprodutivas e não foi possível a identificação de 9,75% (Tabela 3).

Entre os isolados identificados nesse estudo, *Paecilomyces* foi o gênero predominante. De forma semelhante estudo realizado por Vimal e Kumar (2017), foi possível observar o predomínio da espécie *Paecilomyces lilacinum*. Em contraste com esse resultado, estudo realizado com amostras de solo indiano isolados em meio padrão BDA descreve a predominância de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cladosporium* nessas amostras (MEGHAVARNAM; JANAKIRAMAN, 2015).

Além disso, foram identificados fungos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Curvularia*, *Cylindrocladium*, *Trichoderma*. Em contraste com esse resultado, estudo realizado com amostras de solos da Paraíba descreve a predominância de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium* nessas amostras (ROCHA, 2017).

Em Remanescente de Floresta Secundária, ainda foram identificados fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Acremonium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*. De forma semelhante, amostras de solo da Mata Atlântica permitiram a obtenção dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (SARQUIS et al., 2004; VERMA et al., 2007).

6.2 Seleção de fungos produtores de L-asparaginase em cultivo submerso

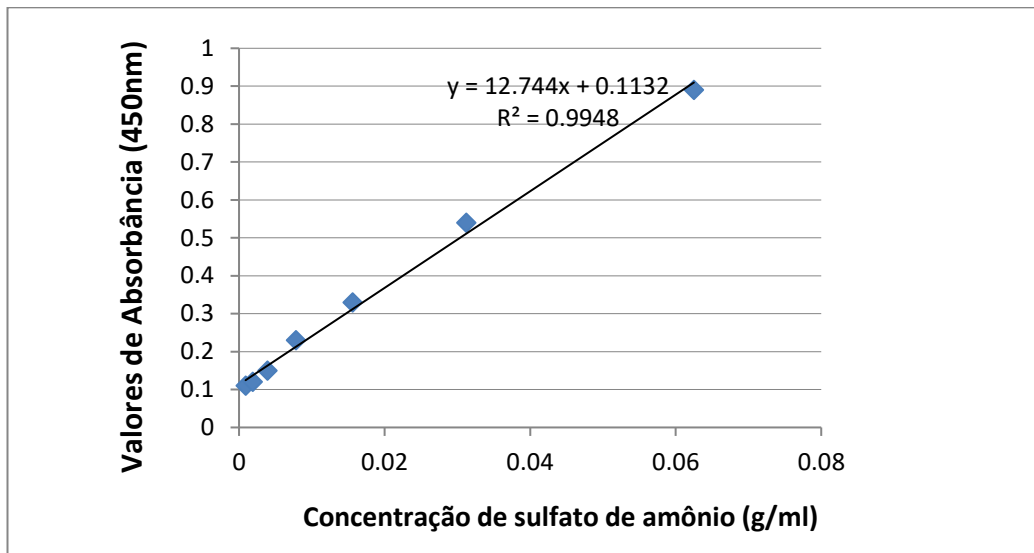
A seleção de fungos potencialmente produtores de L-asparaginase ocorreu em meio sólido Ágar Czapek-Dox modificado suplementado com púrpura de bromocresol. A zona arroxeadada que surgiu ao redor das colônias fúngicas indicou alteração do pH, que pode ser ocasionada a partir do acúmulo de amônia no meio devido a degradação do substrato L-asparagina (GULATI et al., 1997).

No entanto, não é possível afirmar que este aumento do pH do meio tenha ocorrido devido a produção de L-asparaginase pelos fungos inoculados, pois outros metabólitos fúngicos podem ser responsáveis pela elevação do pH e conseqüentemente, pelo aparecimento do halo roxo ao redor da colônia (CALVO et al., 2002; THEANTANA et al., 2007; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). A produção de L-asparaginase em meio sólido funcionou como uma triagem inicial de fungos produtores da referida enzima, mas para confirmação da atividade enzimática se fez necessário o cultivo dos fungos selecionados nesta etapa em cultivo submerso (ALMEIDA, 2015).

A determinação da atividade enzimática foi precedida pela elaboração de curva padrão, utilizando-se o coeficiente de regressão linear preparada a partir de 4mM de sulfato de amônio. O valor do coeficiente de regressão linear foi considerado o indicador de linearidade do método, visto que, as concentrações analisadas deveriam corresponder, proporcionalmente, às absorbâncias encontradas (FARINELLI, 2008).

Como resultado, o coeficiente de regressão linear obtido na curva padrão (Figura 8) apresentou o valor de 0,9948, o que garantiu a linearidade do método. Uma nova curva padrão foi elaborada para cada dia de experimento.

Figura 8. Curva padrão de Sulfato de Amônio (SIGMA-ALDRICH).



A determinação da atividade enzimática foi realizada com os 62 isolados obtidos após o agrupamento taxonômico, onde 56 destes isolados apresentaram atividade enzimática em meio líquido Czapek-Dox modificado. Pode-se verificar que houve concordância entre o ensaio em meio sólido e o método espectrofotométrico. Os resultados obtidos na quantificação enzimática estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Gêneros dos fungos isolados e valores médios (U/ml) da atividade enzimática produzida em meio líquido Czapek dox modificado.

Gênero do fungo	N° de registro	Atividade enzimática	
		(U/ml)	Grupos
<i>Fusarium</i>	4455	0,13	a
<i>Fusarium</i>	4579	0,12	ab
<i>Fusarium</i>	4403	0,12	ab
N.I	4511	0,12	ab
<i>Paecylomices</i>	4435	0,11	ab
<i>Mucor</i>	4510	0,10	ab
<i>Penicillium</i>	4413	0,10	ab
<i>Mucor</i>	4373	0,10	ab
<i>Acremonium</i>	4376	0,09	ab
<i>Penicillium</i>	4382	0,09	ab
<i>Paecilomyces</i>	4583	0,09	ab
<i>Mycelia sterilia</i>	4581	0,09	ab
<i>Paecilomyces</i>	4409	0,09	ab
<i>Paecilomyces</i>	4543	0,09	ab
<i>Paecilomyces</i>	4469	0,08	ab
<i>Trichoderma</i>	4388	0,08	ab
<i>Trichoderma</i>	4375	0,08	ab
N.I	4463	0,08	ab
<i>Paecilomyces</i>	4386	0,08	ab
<i>Fusarium</i>	4377	0,08	ab
N.I	4521	0,07	ab
<i>Acremonium</i>	4370	0,07	ab
<i>Penicillium</i>	4372	0,07	ab
<i>Fusarium</i>	4545	0,07	ab
<i>Fusarium</i>	4575	0,07	ab
<i>Paecilomyces</i>	4462	0,06	ab
N.I	4468	0,06	ab
<i>Paecilomyces</i>	4378	0,05	ab
<i>Aspergillus</i>	4451	0,05	ab
N.I	4441	0,05	ab
<i>Penicillium</i>	4371	0,05	ab
<i>Paecylomices</i>	4355	0,05	ab
<i>Acremonium</i>	4560	0,04	ab
<i>Paecilomyces</i>	4366	0,04	ab
<i>Trichoderma</i>	4389	0,04	ab
<i>Penicillium</i>	4448	0,04	ab
<i>Penicillium</i>	4452	0,04	ab
<i>Paecilomyces</i>	4470	0,04	ab
<i>Paecilomyces</i>	4464	0,03	ab

Continua na próxima página

Tabela 4. Gêneros dos fungos isolados e valores médios (U/ml) da atividade enzimática produzida em meio líquido Czapek dox modificado.

<i>Mycelia sterilia</i>	4538	0,03	ab
<i>Curvularia</i>	4354	0,03	ab
<i>Mucor</i>	4415	0,03	ab
<i>Mucor</i>	4401	0,03	ab
<i>Cylindrocladium</i>	4549	0,02	ab
<i>Geotrichum</i>	4381	0,02	ab
<i>Paecilomyces</i>	4517	0,02	ab
N.I	4466	0,02	ab
<i>Penicillium</i>	4454	0,02	ab
<i>Mycelia sterilia</i>	4356	0,02	b
<i>Epicoccum</i>	4447	0,01	b
<i>Mycelia sterilia</i>	4379	0,01	b

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (5%). **

Final da tabela 4

Um fungo foi considerado como tendo a maior atividade de L-asparaginase (0,13 U/ml), cinquenta e dois desses fungos foram considerados como tendo uma atividade de L-asparaginase relativamente alta (0,02-0,12 U/ml) enquanto que três fungos apresentam baixa atividade de L-asparaginase (0,01 U/ml).

De forma similar trabalho realizado com fungos de solo do Cerrado as atividades enzimáticas encontradas variaram entre 0,019 e 0,610 U/ml, entretanto vale ressaltar que o maior valor obtido de 0,610 (U/ml) tratava-se de um fungo endofítico (ALMEIDA, 2015). Assim como, Theantana et al. (2007), quando analisaram diferentes cepas fúngicas endofíticas e os níveis de produção da enzima variaram entre 0,014 e 1,530 U/ml, estes resultados também foram relatados com fungos isolados de solo por Loureiro (2010), com resultados próximos a 0,254 U/ml, ou seja, com níveis muito semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Em contraste com estes resultados, estudo realizado por Igarasi et al. (1974) relatam atividade da L-asparaginase obtida a partir da espécie *Fusarium oxysporum*, com valores de 2,5 U/ml. Em trabalho realizado por Zia et al. (2013), foi reportada produção da enzima a partir de *Aspergillus niger*, com valores máximos de 5,40 U/ml. Outros estudos recentes também revelaram produção enzimática acima das encontradas neste trabalho, a partir da espécie *Aspergillus terreus* para a produção de L-asparaginase com valor de 40,97 U/ml como atividade máxima da enzima e valores entre 54,17 e 155,93 U/ml, porém utilizando fungos endofíticos e não fungos de solo (GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2012; KRISHNAPURA;

BELUR, 2016).

Diferenças na produção de metabólitos a partir de fungos de uma mesma espécie podem estar relacionadas às adaptações que ocorrem entre o microrganismo e seu habitat (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Ao estudar o habitat dos fungos, é importante considerar que diferentes fatores ambientais como a temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio podem afetar diretamente o seu metabolismo (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Em estudo realizado por Vimal e Kumar (2017), foi possível verificar que *Paecilomyces lilacinum* apresentou alta atividade enzimática entre as estirpes de fungos testadas quando comparado a este trabalho. Rocha (2017), identificou diferentes cepas fúngicas produtoras de L-asparaginase como os gêneros *Aspergillus* e *Paecilomyces*, semelhante ao resultado obtido neste estudo.

De forma semelhante a esse resultado, fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* sp. também são descritos como produtores de L-asparaginase (DHALE; MOHAN-KUMARI, 2014). Vários gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, também são descritos como potenciais produtores desta enzima (SARQUIS, et al., 2004; DANGE; PESHWE, 2015; VIJAY; JAYA RAJU, 2015).

Dentre os isolados obtidos neste estudo, o fungo 4.455, identificado como *Fusarium* sp, obteve o melhor resultado na quantificação enzimática com valor de (0,13 U/ml), condizente com os valores encontrados em outros trabalhos que utilizaram amostras de solo, como o estudo realizado por Chow e Ting (2015), onde o mesmo gênero apresentou valor de atividade enzimática de 0,08 U/ml, resultado próximo ao encontrado neste trabalho.

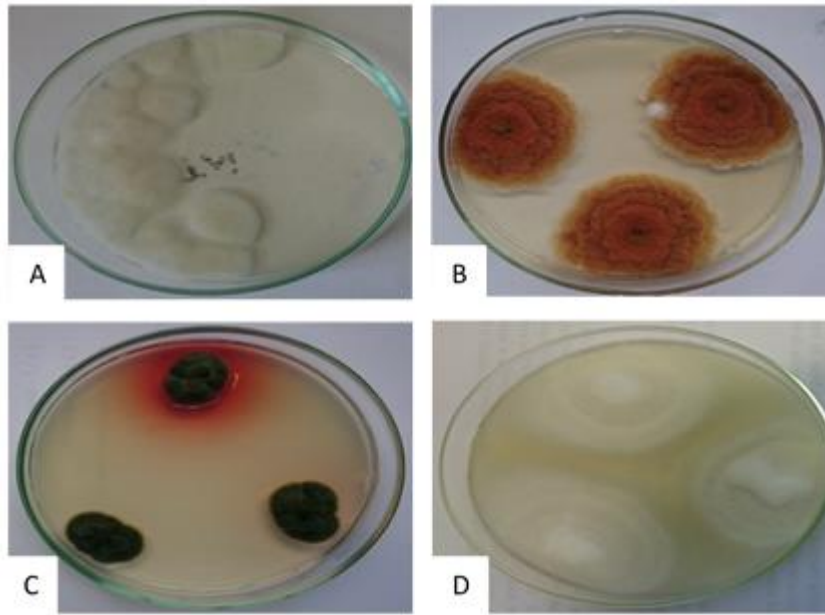


Figura 9. Fungos de amostras de solos amazônicos, primeiro relato como produtores de L-asparaginase. **A.** *Acremonium* sp.; **B.** *Cylindrocladium* sp.; **C.** *Epiccocum* sp.; **D.** *Geotrichum* sp.

Dentre os onze gêneros de fungos de amostras de solo isolados neste trabalho, vale ressaltar que é o primeiro relato dos gêneros *Acremonium* sp, *Cylindrocladium* sp., *Epiccocum* sp., e *Geotrichum* sp., como produtores da enzima L-asparaginase.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, observa-se uma grande diversidade de fungos produtores de L-asparaginase. A partir do isolamento direcionado foi possível obter 126 fungos das amostras de solos Amazônicos.

Das 62 morfoespécies que já haviam indicado produção enzimática em meio sólido, 56 destas, também apresentaram-se com atividade enzimática em meio líquido, estes resultados indicam que essa região representa uma fonte rica de microrganismos que fornecem oportunidade de bioprospecção, como a produção de L-asparaginase de origem fúngica, o que atualmente apresenta extrema importância para a comunidade médica e a indústria farmacêutica.

Pela primeira vez foram relatados como produtores de L-asparaginase os seguintes gêneros de fungos: *Acremonium* sp., com atividade enzimática de 0,07 U/mL, *Cylindrocladium* sp., 0,02 U/mL, *Epicoccum* sp., 0,01 U/mL e *Geotrichum* sp., 0,02 U/mL.

8. 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.
- ABSHIRE, T. C.; POLLOCK, B. H, BILLET, A. L.; BRADLEY, P.; BUCHANAN, G. R. Weekly conjugated to polyethylene glycol L-asparaginase compared to dosing every two weeks produces superior induction remission rates in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia: a Study Group Pediatric Oncology. **Blood**, v. 96, p. 1709-15, 2000.
- ADELMAN, A.; GROVES, F.; O'ROURKE, K.; SINHA, D.; HULSEY, T.; LAWSON, A.; WARTENBERG, D.; HOEL, D. Residential mobility and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: an ecological study. **British Journal of Cancer**, v. 97, n. 1, p. 140 – 144, 2007.
- ALI, U.; NAVEED, M.; ULLAH, A.; ALI, K.; SHAH, S. A.; FAHAD, S.; MUMTAZ, A. S. L-asparaginase as a critical component to combat Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL): A novel approach to target ALL. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 199–210, 2016.
- ALMEIDA, R. P. C. **Avaliação da produção de L- asparaginase por fungos isolados do bioma cerrado**. 104f. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.
- ALVES, M. H.; TRUFEM, S. F. B.; MILANEZ, A. I. Táxons de *Mucor* Fresen. (Zygomycota) em fezes de herbívoros, Recife, PE, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.2, p.147-160, 2002.
- ANDRADE, A.; BORGES, K.; SILVEIRA, V. Update on the Use of l-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 8, n., p. 95-100, 2014.
- ANVISA, 2004. Microbiologia, ICB/UFMG. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf. Acesso em 25 de novembro de 2017.
- ASSELIN, B.; WHITIN, J.; COPPOLA, D.; RUPP, I.; SALLAN, S.; COHEN, H. Comparative Pharmacokinetic Studies of Three Asparaginase Preparations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 11, n. 9, p. 1780-1786, 1993.
- ASSELIN, B. L.; KREISSMAN, S.; COPPOLA, D. J.; RUPP, I.; SALLAN, S. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology Oncology**, v.21, p. 6-12, 1999.
- AVRAMIS, V. I. et al. A randomized comparison of native *Escherichia coli* asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 1986-1994, 2002.

AZEVEDO-RAMOS, C. A Importância das Florestas em Pé na Amazônia. **IPAM**, 2001.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; KLENK, HANS-PETER.; CLÉMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZELE, G. P. V. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.**, 3. ed., 1972.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 1, p. 138-145, 2007.

BILLS, G. F.; CHRISTENSEN, M.; POWELL, M.; THORN, G. Saprobic soil fungi. In: **Biodiversity of Fungi**. Burlington: Academic Press, p. 271-302, 2004.

BROOME, J. D. Evidence that the L-Asparaginase activity of Guinea Pig serum is responsible for its antilymphoma effects. **Nature**. v. 191, p. 1114-1115, 1961.

BROMME, 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. **Journal of Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 99-120, 1963a.

BROMME, 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. **Journal of Experimental Medicine**, v. 118, n. 1, p. 121–148, 1963b

BUELL, C. B.; WESTON, W. H. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungous cultures. **American Journal of Botany**, v.34, p.555-561, 1947.

BUENO, C. J. Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 3, n.2, 2006.

CALVO, A.; WILSON, R.; BOK, J.; KELLER, N. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.

CAMARGO, B.; SANTOS, M.; REBELO, M.; REIS, R.; FERMAN, S.; NORONHA, C.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: first report of 14 population-based cancer registries. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 3, p. 715-720, 2010.

CAMPBELL, H.; MASHBURN, L. L-Asparaginase EC-2 from Escherichia coli some substrate specificity characteristics. **Biochemistry**, v. 9, p.3768–3775, 1969.

CARVALHO, I. F **Produção, purificação e caracterização da enzima L-asparaginase de Aspergillus nidulans: programa de pós-graduação em Biotecnologia.** 2003. 81f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2003.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, p. 225-226, 1939.

CHEN, S. H . Asparaginase Therapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: A Focus on the Mode of Drug Resistance. **Pediatrics & Neonatology**, v. 56, n. 5, p. 287–293, 2015.

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

CLEMENTI, A. La desemidation enzymatique de L-asparaginase chez les diferentes especes animales et la signification physiologique de sa presence dans l organiasma. **Archives Internationales de Physiologie**, v. 19, p. 369–376, 1922.

CORTIJO-CASCAJARES, S.; JIMÉNEZ-CEREZO, M.; TEJADA, A. Revisión de las reacciones de hipersensibilidad a antineoplásicos. **Farmacia Hospitalaria**, v. 36, n. 3, p. 148-158, 2012.

DANGE, V.; PESHWE, S. Purification and Biochemical Characterization of L-Asparaginase from *Aspergillus niger* and Evaluation of Its Antineoplastic Activity. **International Journal of Science and Research (IJSR)**, v.4, n.2, p. 564-569, 2015.

DESHPANDE, N.; CHOUBEY, P.; AGASHE, M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by streptomyces ginsengisoli. **Science World Journal**, p. 1-6, 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, n., p. 66-68, 2014.

DING, X.; LIU, K.; DENG, B.; CHEN, W.; LI, W.; LIU, F. Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n. 10, p. 1831-1838, 2013.

DORIYAE, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **Biotechnology**, v. 6, n.2, p. 239, 2016.

DUNLOP, P. C.; MEYER, G. M.; BAN, D.; ROON, R. J. Characterization of two forms of asparaginase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, p. 1297–1304, 1978.

DUVAL, M.; SUCIU, S.; FERSTER, A.; RIALLAND, X.; NELKEN, B.; LUTZ, P.; BENOIT, Y.; ROBERT, A.; MANEL, A. M.; VILMER, E.; OTTEN, J.; PHILIPPE, N. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734-2739, 2002.

EL-BESSOUMY, A. A.; SARHAN, M.; MANSOUR, J. Production, isolation, and purification of L-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* 50071 using solid-state fermentation. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 387-393, 2004.

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

ELSHAFEI, A. M.; HASSAN, M. M.; ABOUZEID, MA-E.; MAHMOUD, D. A.; ELGHONEMY, D. H. Purification, characterization and antitumoractivity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158-174, 2012.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul-EDUCS. 2010. 638 p.

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*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 4, p. 295-302, 2015.

FARINELLI, J. **Avaliação, modificação e validação de metodologia para estudo de estabilidade de hidroquinona em creme**. 98 p. (Dissertação de mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO", Araraquara, 2008.

FERNANDEZ, C.; CAI, X.; ELOZORY, A.; LIU, C.; PANETTA, J.; JEHA, S.; MOLINELLI, A.; RELLING, M. High-throughput asparaginase activity assay in serum of children with leukemia. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 7, p. 478-487, 2013.

FOSTER, V. C.; SAID, S. Seleção de fungos filamentosos produtores de Lasparaginase, In: **13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, CD de resumos, 2005a.

FOSTER, V. C.; SAID, S. Seleção de fungos de solo e endofíticos produtores da enzima antineoplásica L-asparaginase, In: **15º Simpósio Nacional de Bioprocessos**, CD de anais, 2005b.

FUNTAC. **Monitoramento da cobertura florestal do estado do Acre: desmatamento e uso atual da terra**. Rio Branco: Secretária de Indústria e Comércio; Fundação de Tecnologia do Estado do Acre, 1990. 214p.

FURTH, O.; FRIEDMANN, M. Uber die Verbreitung asparagins paltender Organfermente. **Biochemistry**, v. 26, p. 435-440, 1910.

GRAHAM, M. Pegaspargase: a review of clinical studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 10, p. 1293-1302, 2003.

- GREAVES, M.; WIEMELS, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 639-649, 2003.
- GUILLEME, C.; DELGADO, R.; NAVARRO, J.; AGUIRRE, I.; SOLA, S.; CODINA, J.; SOLER, J.; RAMIREZ, L.; GARICANO, J.; MARTINEZ, B.; LOPES, L. **Actualización del tratamiento con L-asparraginasa en Pediatría**, v. 79, n. 5, p. 329e321-329e311, 2013.
- 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, 1997.
- GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Optimization of culture conditions and bench-scale production of L-asparaginase by submerged fermentation of *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 923-929, 2012.
- HESELTIME, C.W.; ELLIS, J. J. Mucorales. In *The fungi: an advanced treatise*. (G.C. Ainsworth, F.K. Sparrow & A.S. Sussman, eds.). **Academic Press New York**, v. 4 B, p. 187-217, 1973.
- HUNGER, S. P.; LU, X.; DEVIDAS, M.; CAMITTA, B. M.; GAYNON, P. S.; WINICK, N. J.; REAMAN, G. H.; CARROLL, W. L. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, p. 1663–1669, 2012.
- HUANG, L.; LIU, Y.; SUN, Y.; YAN, Q.; JIANG, Z. Biochemical characterization of a novel L-Asparaginase with low glutaminase activity from *Rhizomucor miehei* and its application in food safety and Leukemia treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 1561–1569, 2014.
- IGARASI, S.; IMADA, A.; NAKAHAMA, K.; MATSUMOTO, T.; OOTSU, K. New antilymphoma L-asparaginase from *fusarium* species. **Experientia**, v. 30, n. 7, p. 814-819, 1974.
- IMAC, Instituto do Meio Ambiente do Acre. **Zoneamento ecológico econômico- ZEE**. Rio Branco:SEPLAN/SECTMA, 2000.
- IMADA, A.; IGARASI, S.; NAKAHAMA, K.; ISONO, M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 85-89, 1973.
- JEHA, S.; PUI, C. Risk-adapted Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic **Leukemia**. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 5, p. 973-990, 2009.
- KAVITHA, A.; VIJAYALAKSHMI, M. A study on L-asparaginase of *Nocardia levis* MK-VL_113. **Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- KEBRIAEI, P.; ANASTAS, J.; LARSON, R. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 15, n. 4, p. 597-621, 2003.
- KIDD, J. G. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. **Journal of Experimental Medicine**. v. 98, n. 6, p. 565- 582, 1953.

KO, T. W. K.; STEPHENSON, S. L.; BAHKALI, A. H.; HYDE, K. D. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? **Fungal Diversity**, v. 50, p. 113–120, 2011.

KRISHNAPURA, P. R.; BELUR, P. D. Partial purification and characterization of L-asparaginase from an endophytic *Talaromyces pinophilus* isolated from the rhizomes of *Curcuma amada*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.124, p. 83-91, 2016.

KURTZBERG, J.; ASSELIN, B.; BERNSTEIN, M.; BUCHANAN, G. R.; POLLOCK, B. H.; CAMITTA, B. M. Polyethylene Glycol-conjugated L-asparaginase versus native L-asparaginase in combination with standard agents for children with acute lymphoblastic leukemia in second bone marrow relapse: a Children's Oncology Group Study (POG 8866). **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 33, n. 8, p. 610-616, 2011.

KWAN, J. M.; FIALHO, M.; KUNDU, J.; THOMAS, C. S.; HONG, T. K. Das Gupta and A.M. Chakrabarty. Bacterial proteins as potential drugs in the treatment of leukemia. **Leukemia Research.**, v. 33, p.1392-1399, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8. ed. São Paulo, Sarvier, 1991. 695 p.

LANG, S.; UBER. Desamidierung im Tierkörper. **Beitraege zur Chemischen Physiologie und Pathologie**, v. 190, p. 5321–345, 1904.

LARONE, D.H. **Medically Important Fungi: A guide to Identification**, 3^o ed., Washington, DC., 2000.

LEE, S.; NAKAJIMA, S.; IHARA, F.; KINOSHITA, H.; NIHIRA, T. Cultivation of Entomopathogenic Fungi for the Search of Antibacterial Compounds. **Mycopathologia**, v. 160, n., p. 321-325, 2005.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, C. Morphological Indention of Actinobacteria. In: Dhanasekaran, D and Jiang, Y. **Biochemistry, genetic and Molecular Biology “Actinobacteria – Basic and Biotechnological Applications**, p. 59-86, 2016.

LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and properties of a fungal L-asparaginase from trichoderma viride pers: sf grey. **Journal Microbiology Biotechnology Food Science**, v.4, n.4 p. 310-316, 2015.

LIRA, N.P. Espécies de *Absidia* do solo do Maranhão - Aspectos ecológicos. **Boletim do Instituto de Micologia da Universidade de Recife**, v. 657, p.1-6, 1971.

LOPES, A. M.; OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; DE RIBEIRO, A.; JR, C. A. T.; BREYER, A, OLIVEIRA, M. A.; MONTEIRO, G.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MAGALHÃES, P. O.; AVENDAÑO, J. G. F.; CAVACO-PAULO, A. M.; MAZZOLA, P. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; SETTE, L. D.; CONVERTI, A.; PESSOA, A. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 8551, p. 1-18, 2015

LOUREIRO, C. B. **Purificação, conjugação e avaliação “in vitro” da atividade antineoplásica da L-asparaginase produzida por *Aspergillus terreus* (cepa PC-1.7.A).** 67f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.

LUHANA, K.; DAVE, A.; PATEL, K. Production, purification and characterization of extracellular L-asparaginase (Anti Cancerous Enzyme) from *Aspergillus niger*. **International Journal of Chemistry and Applications**, v.2, p. 3, 2013.

MAHAJAN, R. V.; SARAN, S.; SAXENA, R. K.; SRIVASTAVA, A. K. 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.

MASHBURN, L.; WRISTON, J. C. Tumor inhibitory effect of L-asparaginase from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 105, n. 2, p. 450- 453, 1964.

MEGHAVARNAM, A. K; JANAKIRAMAN, S. A simple and efficient dye-based technique for quick selection of fungi for the production of L-asparaginase. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 3, n. 2, p. 123-130, 2015.

MISHRA, A. Production of L-Asparaginase, an Anticancer Agent, From *Aspergillus niger* Using Agricultural Waste in Solid State Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 33-42, 2006.

MOHANKUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1573-0972, p. 577-587, 2013.

MORAIS, E. F.; DE LIRA, J.A.D.S.; MACEDO, R.A.D.P.; SANTOS, K. S.; ELIAS, C.T.V.; MORAIS, M.D.L.S.D.A. Oral manifestations resulting from chemotherapy in children with acute lymphoblastic leukemia. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 80, n.1, p. 78–85, 2014.

MORAIS, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candidarugosa* and *Geotrichumcandidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein expression and purification**, v. 123, p. 26-34, 2016.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções Reagentes e Solventes**. Edgard Blucher Editio, v.2, p, 630, 2001.

NAGARAJAN, A.; THIRUNAVUKKARASU, N.; SURYANARAYANAN, T. S.; GUMMADI, S. N. Screening and Isolation of Novel Glutaminase Free L-asparaginase from Fungal Endophytes. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, p. 163-176, 2014.

NAKAHAMA, K.; IMADA, A.; IGARASI, S.; TUBAKI, K. Formation of L-Asparaginase by *Fusarium* Species. **Journal of General Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 269-273, 1973.

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

NEUMAN, R. E.; MCCOY, T. A. Dual requirement of Walker carcinosarcoma 256 *in vitro* for asparagine and glutamine. **Science**, v. 124, n. 3212, p. 124-125, 1956.

OETTGEN, H. F.; OLD, L. J.; BOYSE, E. A.; CAMPBELL, H. A.; PHILIPS, F. S.; CLARKSON, B. D.; TALLAL, L.; LEEPER, R. D.; SCHWARTZ, M. K.; KIM, J. H. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. **Cancer Research**, v. 12, p. 2619-2631, 1967.

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.

OLIVEIRA, L.A.; FERNANDES, O.C.; JESUS, M.A.; BENTES, J.L.S.; ANDRADE, S.L.; SOUZA, A.Q.L.; SANTOS, C. Diversidade Microbiana da Amazônia, 2016, **Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**. Ed. INPA, 2016. 436 p.

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 4, p. 655-674, 2009.

PANOSYAN, E.; SEIBEL, N.; MARTIN-ARAGON, S.; GAYNON, P.; AVRAMIS, I.; SATHER, H.; FRANKLIN, J.; NACHMAN, J.; ETTINGER, L.; LA, M.; STEINHERZ, P.; COHEN, L.; SIEGEL, S.; AVRAMIS, V. Asparaginase Antibody and Asparaginase Activity in Children With Higher-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/ Oncology**, v. 26, n. 4, p. 217-226, 2004.

PASSARINI, M. R.; SANTOS, C.; LIMA, N.; BERLINCK, R. G.; SETTE, L. D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. **Arquivos of Microbiology**, v.195, n.2, p. 99-111, 2013.

PATRO, K.; BASAK, U.; MOHAPATRA, A.; GUPTA, N. Development of new medium composition for enhanced production of L-Asparaginase by *Aspergillus flavus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 35, n. 1, p. 295-300, 2014.

PERRAUD, R.; LABORET, F. Optimization of methylpropionate production catalysed by *Mucor miehei* lipase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 321-326, 1995.

PIETERS, R.; HUNGER, S. P.; BOOS, J.; RIZZARI, C.; SILVERMAN, L.; BARUCHEL, A.; GOEKBUGET, N.; SCHRAPPE, M.; PUI, C. H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on Erwinia asparaginase. **Cancer**, v. 117, n. 2, p. 238-249, 2011.

PUI, C. H.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 2, p. 166-178, 2006.

QUINTANILLA-FLORES, D.; FLORES-CABALLERO, M.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, R.; TAMEZ-PÉREZ, H.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, J. Acute Pancreatitis and Diabetic

Ketoacidosis following L-Asparaginase/Prednisone Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Case Reports in Oncological Medicine**, v. 2014, n., p. 1-3, 2014.

RAHA, S. K.; ROY, S.K.; DEY, S.K.; CHAKRABARTY, S.L. Purification and properties of an L-asparaginase from *Cylindrocarpon obtusisporum* MB-10. **Biochemistry International**, v. 21, p. 987–1000, 1990.

RAMYA, L. N.; DOBLE, M.; REKHA, V. P. B.; PULICHERLA, K. In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for the effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v.33, p. 617– 621, 2011.

RANI, S.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279-282, 2012.

RHEEA, Y. J.; HILLIERBC, S.; GADDAD, G. M. A new lead hydroxycarbonate produced during transformation of lead metal by the soil fungus *Paecilomyces javanicus*. **Geomicrobiology Journal**, v. 33, p. 3-4, 2016.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**, v. 42, p. 265-270, 1950.

RIZZARI, C.; CONTER, V.; STARY, J.; COLOMBINI, A.; MOERICKE, A.; SCHRAPPE, M. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current Opinion in Oncology**, v. 25, n. 1, p. S1–S9, 2013.

ROCHA, W. R. V. **Produção de L-Asparaginase por Fungos Filamentosos Isolados do Bioma Caatinga**. 111f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Paraíba, 2017.

SARQUIS, M. I.; OLIVEIRA, E. M.; SANTOS, A. S.; COSTA, G. L. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 489-492, 2004.

SCHEETZ, R.; WHELAN, H.; WRISTON, J. Purification and properties of an L-asparaginase from *Fusarium tricinctum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 142, n. 1, p. 184-189, 1971.

SCHOENLEIN-CRUSIUS, I.H., TRUFEM, S.F.B., MALATINSKY, S.M.M., NINOMIYA, A.; ANTUNES, M.F.R. Mucorales (Zygomycotina) from soil affected by excrement of birds in the “Parque Estadual das Fontes do Ipiranga”, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 19, p. 7-10, 1996.

SCHRAPPE, M.; REITER, A.; LUDWIG, W. D.; HARBOTT, J.; ZIMMERMANN, M.; HIDDEMANN, W.; NIEMEYER, C.; HENZE, G.; FELDGES, A.; ZINTL, F.; KORNUBER, B.; RITTER, J.; WELTE, K.; GADNER, H.; RIEHM, H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. **Blood**, v. 95, n. 11, p. 3310-3322, 2000.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A.; SHRIVASTAV, A.; JAIN, S.; SINGHAL, P. Kinetic Studies of L-Asparaginase From *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SHRIVASTAVA, A.; KHAN, A.; KHURSHID, M.; KALAM, M.; JAIN, S.; SINGHAL, P. Recent developments in L-asparaginase discovery and its potential as anticancer agent. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 1-10, 2015.

SILVA, F. F.; ZANDONADE, E.; ZOUAIN-FIGUEIREDO, G. P. Analysis of childhood leukemia mortality trends in Brazil, from 1980 to 2010. **Journal of Pediatrics**, v.90, n.6, p.587--592, 2014.

SINGH, Y.; SRIVASTAV, S. Statistical and evolutionary optimization for enhanced production of an antileukemic enzyme, L-asparaginase, in a protease-deficient *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 isolated from the soil contaminated with hospital waste. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 4, p. 322-335, 2013.

SUBHAN, S. A.; WAHAB, A.; MUJAHID, T. Y.; ABBAS, T.; KHAN, I.; IDREES, S.; Screening of Actinomycetes from Indigenous Soil For Production Of Extracellular Metabolites. **International Journal of Current Research**, v. 7, n.1, p.12078-12083, 2015.

SUN, R.; GAO, Y.; SHEN, K.; XU, Y.; WANG, C.; LIU, H.; DONG, J. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2011.

TADDEI, A.; RODRÍGUES, M. J.; MÁRQUEZ-VILCHEZ, E.; CASTELLI, C. Isolation and identification of *Streptomyces spp.* from Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. **Microbiological Research**. v.161, n. 3, p. 222-231, 2006.

TALLURI, V.; BHAVANA, M.; MAHESH KUMAR, M.; RAJAGOPAL, S. L-asparaginase: An ultimate anti-neoplastic enzyme. **International Letters of Natural Sciences**, v. 10, p. 23-25, 2014.

THAKUR, M.; LINCOLN, L.; NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Isolation, purification and characterization of fungal extracellular L-asparaginase from *Mucor Hiemalis*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 9, p. 12–14, 2013.

THEANTANA, T.; HYDE, K.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from thai medicinal plants. **KMITL Science and Technology Journal** , v. 7, n. S1, p. 13-18, 2007.

TIPPANI, R.; SIVADEVUNI, G. Nutritional factors effecting the production of L-asparaginase by the Fusarium sp. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 15, p. 3692-3696, 2012.

TONG, W.; PIETERS, R.; TISSING, W.; VAN DER SLUIS, I. Should we use a desensitization protocol in acute lymphoblastic leukemia patients with silent inactivation of PEGasparaginase? **Haematologica**, v. 99, n. 1, p. 1-32, 2014.

- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo 1- Gênero *Mucor* Micheli. **Rickia**, v. 9, p. 81-91, 1981a.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo 2. Gêneros *Absidia* van Tieghem, *Gongronella* Ribaldi e *Rhizopus* Ehrenberg. **Rickia**, v. 9, p. 99-106, 1981b.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem e Le Monnier e *Cunninghamella* Matruchot. **Rickia**, v. 9, p. 113-120, 1981c.
- TRUFEM, S.F.B. Mucorales do Estado de São Paulo. 4. Espécies coprófilas. **Rickia**, v. 11, p. 53-64, 1984.
- TRUFEM, S.F.B.; VIRIATO, A. Mucorales do Estado de São Paulo. 6. Mucoraceae coprófilas. **Rickia**, v. 12, p. 113-123, 1985.
- VAN DEN BERG, H. Asparaginase revisited. **Leukemia & Lymphoma**, v.52, n.2, p.168-178, 2011.
- VERMA, N.; KUMAR, K.; KAUR, G.; ANAND, S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.27, n.1, p.45-62, 2007.
- VIANNA, M. V. **Fungos de solos da Antártica: prospecção de L-asparaginase e protease e caracterização taxonômica. 86f. 2016. Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2016.
- VIJAY, B.; JAYA RAJU, K. Production of L-asparaginase by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 under solid state fermentation using pearl millet and finger millet as mixed substrate. **Journal of Chemical Biological and Physical Sciences**, v.5, n. 1, p. 366-377, 2015.
- VIPINA, R. A.; CHITRA, S. Isolation and Screening of L-Asparaginase Producing Fungi from Kadalundi Mangrove Forest Soil. **Internacional Journal of Scientific Research**, v. 5, n. 11, p. 217-218, 2016.
- VIMAL, A.; KUMAR, A. In vitro screening and in silico validation revealed key microbes for higher production of significant therapeutic enzyme L-asparaginase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 9-17, 2017.
- WARANGKAR, S. C.; WARANGKAR, C. N. KHOBRADE, B. S. DAWANE, R. B. BHOSALE. Effect of dihydropyrimidine derivatives on kinetic parameters of *Erwinia carotovora* l-asparaginase. **International Journal of Biotechnology Applications**, v.1, p. 5-13, 2009.
- WINK, P. L. **Produção da enzima antileucêmica L-Asparaginase II a partir da clonagem do gene ErA de *Erwinia carotovora* supsp. *atroseptica* em *Escherichia coli*. 53f. 2009. Dissertação** (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.
- WRISTON, J. C.; YELLIN, T. O. L-asparaginase: a review. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.39, p. 185-248, 1973.

YELLIN, T.; WRISTON JR, J. Antagonism of Purified Asparaginase from Guinea Pig Serum toward Lymphoma. **Science**, v. 151, n. 3713, p. 998-1004, 1966.

ZIA, M.; BASHIR, R.; AHMED, I.; IFTIKHAR, T. Production of L-Asparaginase from *Aspergillus Niger* using Agro Wastes By-Products in Submerged Fermentation. **Process. Technology**, v. 62, n. 2, p. 47-51, 2013.