



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

LETICIA FRANCISCA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR ESPÉCIES DE *Penicillium* E
Talaromyces ENDOFÍTICOS DE *Tillandsia catimbauensis***

Recife

2018

LETICIA FRANCISCA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR ESPÉCIES DE *Penicillium* E
Talaromyces ENDOFÍTICOS DE *Tillandsia catimbauensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Mesquita Paiva

Recife

2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Leticia Francisca da
Produção de L-Asparaginase por espécies de *Penicillium* e *Talaromyces* endofíticos de *Tillandsia catimbauensis* / Leticia Francisca da Silva. – 2018.

51 f. : il.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta.

Coorientadora: Laura Mesquita Paiva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Fungos. 2. Enzimas de Fungos. I. Motta, Cristina Maria de Souza (Orientadora). II. Paiva, Laura Mesquita (Coorientadora). III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 206

LETICIA FRANCISCA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR ESPÉCIES DE *Penicillium* E
Talaromyces ENDOFÍTICOS DE *Tillandsia catimbauensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Biociências, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 05/03/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra (Titular)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Minelli Albuquerque Sousa (Titular)

Universidade Federal de Pernambuco

*Dedico aos meus pais, Josefa e
Manoel e a meu esposo, Andryo,
por todo o companheirismo,
carinho e apoio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a graça de concluir mais uma importante etapa de vida.

A todos da minha família, em especial aos meus pais, Josefa Maria e Manoel Francisco, e ao meu irmão Emerson Francisco, pelo incentivo, paciência e amor a mim dedicados em todos os momentos da minha vida.

Ao meu esposo Andryo Santos, por sempre estar presente na minha jornada de vida, me incentivando e dando forças para nunca desistir dos meus objetivos e por todo o carinho, amor, paciência e dedicação.

A todos os meus amigos pelo companheirismo e estímulo, em especial a Diandra Ranielly, Franciane Vieira, Tereza Cristina, Ivania Pires, Aldenice Lacerda, Márcia Maria, Juliana Almeida, Sandra Cristina e Mônica Santos.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização deste projeto.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco e a Chefe do departamento Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta, pela disponibilização de materiais e das instalações da Micoteca URM, do Laboratório Micologia Ambiental e do Laboratório de Biotecnologia para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta e à minha co-orientadora Profa. Dra. Laura Mesquita Paiva, por confiarem em minha capacidade científica, estímulo e conhecimentos transmitidos durante esses anos acadêmicos.

Aos membros da banca examinadora, pelo empenho e por suas contribuições para o trabalho.

As contribuições científicas de Marília Maciel, Minelli Sousa, Tales Costa-Silva e Gualberto Agamez.

À todos os membros da grande equipe do Laboratório Micologia Ambiental, pela união, ajuda mútua, respeito e amizade. Em especial agradeço a Laura Mesquita, Gianne Rizzuto, Karla Torres, Jadson Bezerra, Ana Patrícia, Aline Barboza, Tamara Caldas e Dianny Lisboa.

RESUMO

Endófitos são micro-organismos que habitam o interior de tecidos vegetais saudáveis, sem lhes causar injúrias aparentes. Esses micro-organismos recebem proteção e nutrientes do vegetal, em contrapartida produzem compostos que protegem e auxiliam o hospedeiro. Dentre estes, os fungos apresentam grande potencial de produzir substâncias bioativas como, por exemplo, a L-asparaginase. A L-asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia. Esta enzima é utilizada como fármaco no tratamento de diversos cânceres. Além disso, é utilizada na indústria alimentícia para reduzir os níveis de acrilamida dos alimentos, uma substância potencialmente cancerígena. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de *Tillandsia catimbauensis*, otimizar a produção da biomassa e da L-asparaginase do melhor produtor enzimático. Foram selecionados vinte isolados de fungos endofíticos, dez do gênero *Penicillium* e dez de *Talaromyces*. A L-asparaginase foi produzida em meio Czapek Dox's modificado. Para determinação da atividade enzimática as amostras foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm. Para seleção das melhores condições de produção de biomassa e da L-asparaginase foi utilizado um planejamento experimental estatístico (2³), avaliando a influência das variáveis pH, concentração de inóculo e da L-prolina. Dentre os vinte isolados de endófitos testados, dez apresentaram potencial de produzir L-asparaginase (0,50-2,30 U/g). Baseado em análises estatísticas, os isolados foram agrupados em cinco grupos (A-E) de acordo com a atividade enzimática. Os melhores resultados foram classificados no grupo A, com *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826) e *Penicillium sp.* (URM 7827). *Talaromyces cf. cecidicola* destacou-se quanto à atividade enzimática (2,30 U/g), sendo selecionado para os processos de otimização da biomassa e da L-asparaginase. No planejamento experimental os valores de biomassa variaram entre 0,16g e 0,66g. O melhor resultado (0,66g) foi obtido com pH 6,0, concentração de inóculo de 1×10^8 (esporos/mL) e concentração de L-prolina de 1%, no entanto, a concentração de inóculo mostrou-se estatisticamente significativa, o pH marginalmente significativo e a concentração de L-prolina não foi estatisticamente significativa. A otimização da produção de L-asparaginase não foi obtida, necessitando de mais estudos para que seja alcançado um ponto ótimo para a atividade enzimática. Fungos endofíticos de *T. catimbauensis* possuem potencial de produzir a enzima L-asparaginase, sendo *T. cf. cecidicola* indicado para futuros estudos de produção desta enzima.

Palavras-chave: Atividade enzimática. Bromélia. Otimização. Endófitos. Enzima.

ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that inhabit the interior of healthy plant tissues without causing them any apparent injury. These microorganisms receive protection and nutrients from the vegetable, in return they produce compounds that protect and assist the host. Among these, fungi present great potential to produce bioactive substances, such as L-asparaginase. L-asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of the amino acid asparagine in aspartic acid and ammonia. This enzyme is used as a drug in the treatment of several cancers. In addition, it is used in the food industry to reduce the levels of acrylamide in foods, a potentially carcinogenic substance. The objective of this study was to evaluate the production of L-asparaginase by endophytic fungi of *Tillandsia catimbauensis*, to optimize the biomass and L-asparaginase production of the best enzymatic producer. Twenty isolates of endophytic fungi were selected, ten of the genus *Penicillium* and ten of *Talaromyces*. L-asparaginase was produced on modified Czapek Dox's medium. To determine the enzymatic activity the samples were read in a spectrophotometer at 500 nm. For the selection of the best biomass and L-asparaginase production conditions, a statistical experimental design (2³) was used, evaluating the influence of the variables pH, inoculum concentration and of L-proline. Among the twenty isolates tested endophytes ten showed potential for producing L-asparaginase (0.50 to 2.30 U / g). According to statistical analyzes, the isolates were grouped into five groups (A-E) according to the enzymatic activity. The best results were classified in group A, with *Talaromyces* cf. *cecidicola* (URM 7826) and *Penicillium* sp. (URM 7827). *Talaromyces* cf. *cecidicola* was highlighted for enzymatic activity (2.30 U/g), being selected for the optimization processes of biomass and L-asparaginase. In the experimental design the biomass values varied between 0.16 g and 0.66 g. The best result (0.66 g) was obtained at pH 6.0, inoculum concentration of 1 x 10⁸ (spores/ml) and concentration of L-proline of 1%, however, the inoculum concentration was statistically significant, pH marginally significant and L-proline concentration was not statistically significant. The optimization of L-asparaginase production was not obtained, requiring further studies in order to reach an optimal point for the enzymatic activity. Endophytic fungi of *T. catimbauensis* have the potential to produce the enzyme L-asparaginase, being *T. cf. cecidicola* indicated for future studies of this enzyme production.

Key words: Enzymatic activity. Bromelia. Optimization. Endophytes. Enzyme.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de ação da enzima L-asparaginase.....	17
Figura 2 - Localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil.....	23
Figura 3 - Extensão de ocorrência de <i>Tillandsia catimbauensis</i> no Parque Nacional do Catimbau.....	27
Figura 4 - Superfície de resposta para produção de biomassa de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826) em função do pH e concentração de L-prolina (a), concentração de inóculo e concentração L-prolina (b) e concentração do inóculo e pH (c).....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos endofíticos de <i>Tillandsia catimbauensis</i>	28
Tabela 2 - Planejamento experimental fatorial 2^3 para otimização da produção de biomassa de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826).....	30
Tabela 3 - Planejamento experimental fatorial 2^3 para otimização da produção de L-asparaginase de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826).....	31
Tabela 4 - Atividade enzimática de fungos endofíticos de <i>Tillandsia catimbauensis</i>	32
Tabela 5 - Produção de biomassa de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826) em um planejamento experimental fatorial 2^3	34
Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para produção de biomassa de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826).....	35
Tabela 7 - Produção de L-asparaginase de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826) em um planejamento experimental fatorial 2^3	37
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para produção enzimática de <i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i> (URM 7826).....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	13
2.1.1	Importância biotecnológica.....	15
2.2	ENZIMA L-ASPARAGINASE.....	16
2.2.1	Importância para a indústria farmacêutica.....	17
2.2.2	Importância para a indústria alimentícia.....	19
2.3	PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE POR FUNGOS.....	20
2.4	CAATINGA.....	21
2.4.1	Parque Nacional do Catimbau.....	23
2.5	FAMÍLIA BROMELIACEAE A. JUSS.....	24
2.5.1	<i>Tillandsia catimbauensis</i> Leme, W. Till & J.A. Siqueira.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	28
3.2	PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EM MEIO LÍQUIDO.....	28
3.3	ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE.....	29
3.4	SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DA L-ASPARAGINASE.....	29
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE.....	32
4.2	SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DA L-ASPARAGINASE.....	34
5	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Endofíticos são micro-organismos que habitam o interior dos órgãos e tecidos das plantas, como as raízes, ramos e folhas que ao contrário dos patógenos não causam danos ao hospedeiro (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Estudos demonstram que há uma relevante interação simbiótica com o hospedeiro, através da produção de compostos que conferem resistência a fitopatógenos, reduzem a herbivoria, além de haver a produção de fitorreguladores que podem melhorar o desenvolvimento dos vegetais. Em troca, os endófitos encontram no hospedeiro um habitat com menor competição e com nutrientes (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Diversos trabalhos vêm relatando o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos na promoção do crescimento das plantas (HWANG et al., 2011; LUZ et al., 2006; SILVA et al., 2006; TING et al., 2008), no controle de fitopatógenos (KUSARI et al., 2013; ROCHA et al., 2009; RUBINI et al., 2005), podem atuar contra patógenos (PIRES et al., 2015; SOUZA et al., 2004), na produção de enzimas de importância industrial (BEZERRA et al., 2012, 2015; BISCHOFF et al., 2009; CUZZI et al., 2011), assim como, têm sido relatados como produtores da enzima L-asparaginase (KALYANASUNDARAM et al., 2015; SANTOS, M. G. S. et al., 2015).

A L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é uma enzima que hidrolisa o aminoácido essencial L-asparagina em amônia e ácido aspártico (JAIN et al., 2012). Esta enzima é utilizada no tratamento do câncer. O mecanismo de ação da L-asparaginase leva a apoptose das células tumorais devido à depleção extracelular de asparagina (GUILLEME et al., 2013). As bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são as duas fontes de asparaginase utilizadas clinicamente (DUVAL et al., 2002). Entretanto, o uso em longo prazo dessa enzima de origem procariótica pode causar hipersensibilidade, levar a reações alérgicas e anafilaxia (SARQUIS et al., 2004). De acordo com Loureiro et al. (2012) os micro-organismos eucarióticos podem produzir uma enzima com menores efeitos colaterais.

Além da importância medicinal, a L-asparaginase vem sendo relatada com importância para a indústria alimentícia. Esta enzima tem também mostrado ser uma alternativa para redução de acrilamida (HENDRIKSEN et al., 2009) que é uma substância classificada como potencialmente cancerígena para humanos. A acrilamida é formada em alimentos ricos em carboidratos que são tratados termicamente (MOHAN KUMAR et al., 2014). Essa enzima pode reduzir o nível de asparagina livre, através da hidrólise, removendo

assim um dos precursores essenciais para formação de acrilamida, e o impacto para a qualidade final dos alimentos deve ser limitado (HENDRIKSEN et al., 2009).

No Brasil, a família Bromeliaceae se distribui em todas as regiões, ocorrendo nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Pampa e Amazônia (FORZZA et al., 2017a). *Tillandsia catimbauensis* é uma bromélia endêmica do Parque Nacional do Catimbau, e está em risco crítico de extinção da natureza devido às más condições de conservação do Parque e sua limitada distribuição (FABRICANTE et al., 2014). Esta espécie pode ser considerada um importante elemento biológico da região, formando densas populações nas serras, sendo encontradas predominantemente na forma rupícola, florescendo no mês de agosto (FERREIRA; FABRICANTE; SIQUEIRA FILHO, 2015).

A Caatinga ocupa 11% do território brasileiro e 54% da Região Nordeste (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). Apresenta vegetação caracterizada por arbustos e árvores baixas, muitos apresentando microfilia, espinhos e características xerofíticas (PRADO, 2003). Este bioma é rico em fauna e flora (GIULIETTI et al., 2004; MMA, 2017b), sendo considerado como um dos biomas brasileiros mais degradados por ações antrópicas (AGEITEC, 2017). No entanto, apenas 8,4% de seu domínio é protegido por unidades de conservação estaduais e federais (HAUFF, 2010).

O Parque Nacional do Catimbau é uma Unidade de Proteção Integral que é considerada de extrema importância biológica, ocupando parte dos municípios de Buíque, Ibimirim e Tupanatinga (Pernambuco) (IBAMA, 2017; MELO, 2012). No parque já foram catalogadas 11 espécies da família Bromeliaceae, as quais foram classificadas em oito gêneros (FERREIRA; FABRICANTE; SIQUEIRA FILHO, 2015).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a capacidade de produção da L-asparaginase por fungos endofíticos da bromélia *Tillandsia catimbauensis* e otimizar a produção da biomassa e da enzima fúngica pela espécie mais promissora quanto à produção enzimática.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

A palavra endófito deriva do grego, e significa dentro da planta, ‘endo’ significa dentro e ‘phyte’ planta (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). Esses micro-organismos foram descritos pela primeira vez em 1866 por De Bary, entretanto, por mais de um século foram praticamente ignorados, principalmente porque muito pouco se conhecia sobre suas funções no interior das plantas e também por não produzirem estruturas externas visíveis em seus hospedeiros (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). A ciência que estuda estes micro-organismos é denominada endofitologia (UNTERSEHER; PETZOLD; SCHNITTLER, 2012).

Micro-organismos endofíticos são aqueles que colonizam o interior de tecidos de plantas saudáveis em ao menos uma fase do ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes (CANUTO et al., 2012; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). Os micro-organismos endofíticos dependendo das estratégias de vida podem ser classificados como facultativos ou obrigatórios. Os facultativos têm uma fase do seu ciclo de vida fora do hospedeiro; já os obrigatórios são dependentes da planta para sua sobrevivência e crescimento (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).

Os endófitos mais comuns são as bactérias e os fungos, sendo os fungos os mais frequentemente isolados (STROBEL; DAISY, 2003). Os fungos endofíticos constituem um grupo polifilético altamente diversificado, formado principalmente por fungos do filo Ascomycota (ARNOLD, 2007). A observação da diversidade dos micro-organismos endofíticos sugere que estes também podem ser patógenos oportunistas ou saprófitas agressivos (STROBEL; DAISY, 2003). De acordo com o equilíbrio com outros endófitos ou das condições do ambiente um fungo endofítico pode se tornar um patógeno (AZEVEDO, 1999).

Todos os vegetais provavelmente possuem micro-organismos endofíticos, e estes podem ocupar milhões de nichos biológicos (AZEVEDO, 1998; STROBEL et al., 2004). Frequentemente podem ser isoladas de uma planta dezenas de espécies endófitas, entre estas, ao menos uma mostra especificidade ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001). De cerca de 300.000 espécies de plantas existentes, acredita-se que cada uma hospeda um ou mais endófitos (STROBEL; DAISY, 2003). No entanto, apenas algumas dessas foram estudadas completamente quanto a sua biologia endofítica, por isso há uma excelente chance de

encontrar novos e interessantes endófitos de plantas de diferentes ecossistemas e ambientes (STROBEL; DAISY, 2003). Estima-se que a diversidade global dos fungos endofíticos seja de um milhão de espécies, onde a maioria ainda não foi descrita (GANLEY; BRUNSFELD; NEWCOMBE, 2004).

De acordo com Chandra (2012), a diversidade endofítica é maior em áreas tropicais. Santos, I. P. et al. (2015) isolaram fungos endofíticos de *Indigofera suffruticosa* coletada na Caatinga e Floresta Atlântica, durante as estações chuvosa e seca, e encontraram um número maior de isolados nas duas estações estudadas na Floresta Atlântica. No entanto, estudos vêm relatando uma marcante e subestimada diversidade de fungos endofíticos associados a plantas da Caatinga (BEZERRA et al., 2012, 2013, 2017; CROUS et al., 2017, FREIRE et al., 2015; SANTOS, I. P. et al., 2015).

De acordo com Strobel e Daisy (2003), há uma lógica para coletar plantas para isolamento de micro-organismos endofíticos e a descoberta de novos produtos naturais. Plantas de ambientes com características únicas, com história etnobotânica relacionadas a aplicações de interesse ou uso específicos, endêmicas e de áreas de grande biodiversidade.

Esses micro-organismos podem ser encontrados em diferentes tecidos das plantas como caules, pecíolo, raízes, folhas, flores, sementes e frutas, principalmente em espaços intracelulares ou intercelulares (HALLMANN et al., 1997; PARK et al., 2012; QIN et al., 2011). A raiz é uma das principais portas de entrada usadas pelos micro-organismos endofíticos, o afloramento de raízes secundárias e o crescimento das raízes penetrando o solo são acompanhados por feridas que facilitam a entrada de endófitos. Outras formas de entrada são através de aberturas naturais como estômatos, aberturas causadas por apressórios de fungos patogênicos e por insetos, e ferimentos causados por instrumentos agrícolas (AZEVEDO, 1998; HALLMANN et al., 1997). O modo de colonização destes micro-organismos pode ser intercelular e localizada, intracelular e limitada a poucas células, sistêmica intra e intercelular (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Estes micro-organismos vivem em mutualismo, recebendo proteção e nutrientes da planta hospedeira e em troca produzem compostos químicos como alcalóides, antibióticos e enzimas, que em condições de estresse como presença de substâncias tóxicas, ataque de patógenos e insetos pragas, falta de água, alta salinidade e baixo pH, protegem e auxiliam a planta, e ainda produzem fitorreguladores que podem ampliar o desenvolvimento vegetal (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Já foi verificado que plantas com associação simbiótica ativam o sistema de defesa mais rápido do

que plantas sem associação após o desafio do patógeno (JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011).

2.1.1 Importância biotecnológica

A química de endófitos tem sido pouco estudada, se considerada a grande diversidade fúngica e a sua especificidade na colonização de seus hospedeiros. O estudo das interações entre micro-organismos e plantas, além de contribuir para o entendimento de processos químicos na ecologia e na natureza, pode resultar no estabelecimento de novas fontes de substâncias de interesse humano (SANTOS et al., 2008). Micro-organismos endofíticos são potenciais fontes de produtos naturais novos que podem ser explorados na agricultura, indústria e medicina (STROBEL; DAISY, 2003). Os fungos endofíticos apresentam enorme potencial de produzir substâncias novas e bioativas (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Diversas pesquisas vêm demonstrando o potencial de micro-organismos endofíticos na promoção do crescimento de plantas (SANTOS; VARAVALLO, 2011). Silva et al. (2006) evidenciaram o potencial de fungos endofíticos em promover o crescimento de mudas de pinha. Luz et al. (2006) verificaram que fungos endofíticos apresentaram potencial de promover o crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. O filtrado de cultura do endófito *Penicillium citrinum* influenciam positivamente no crescimento da planta *Carex kobomugi* (HWANG et al., 2011). O endófito *Fusarium oxysporum* também mostrou-se promissor para o crescimento de banana (TING et al., 2008). Os micro-organismos endofíticos apresentam potencial de estimular o crescimento vegetal devido a mecanismos como à produção de fitohormônios, fixação de nitrogênio, resistência a drogas e antagonismo de patógenos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Além disso, são relatados com potencial para o controle de patógenos em plantas. Rocha et al. (2009) constataram o potencial antagonista de fungos endofíticos isolados de *Symphytum officinale* L. contra *Sclerotinia sclerotiorum*, um fitopatógeno das culturas de feijão. Fungos endofíticos de *Cannabis sativa* L. foram testados contra dois fitopatógenos de *Cannabis*, *Botrytis cinerea* e *Tricotecium roseum*, e demonstraram ser recursos promissores de controle biológico (KUSARI et al., 2013). Rubini et al. (2005) isolaram fungos endofíticos de plantas de cacau e avaliaram seu potencial antagonista contra *Crinipellis perniciosa*, o agente causador da doença vassoura de bruxa, alguns desses micro-organismos foram considerados potenciais antagonistas destacando-se *Gliocladium catenulatum*.

Os produtos naturais de micro-organismos endofíticos podem atuar como antibióticos inibindo ou matando patógenos causadores de doenças, como protozoários, vírus, bactérias e fungos que acometem humanos e animais (STROBEL; DAISY, 2003). Pires et al. (2015) verificando o potencial antibacteriano de fungos endofíticos de plantas da Caatinga relataram que dos 60 endófitos testados 21 apresentaram atividade contra bactérias patogênicas ao homem. Souza et al. (2004) utilizando líquido metabólico extracelular de 79 isolados fúngicos isolados de plantas da Amazônia contra micro-organismos fitopatogênicos e patogênicos ao homem, constataram que 19 isolados apresentaram antagonismo contra um ou mais micro-organismos.

Ainda, os micro-organismos endofíticos são relatados como produtores de enzimas de ampla importância para a indústria. Cuzzi et al. (2011) em seus estudos de análise da capacidade de produção de enzimas extracelulares utilizando fungos endofíticos verificaram atividade proteolítica, lipolítica e aminolítica. Bezerra et al. (2012) estudando o potencial de produção de enzimas por isolados fúngicos de *Opuntia ficus-indica* relataram a capacidade de produzirem as enzimas protease, celulase, xilanase e pectinase. Outro estudo de Bezerra et al. (2015) também verificou a produção de protease, celulase xilanase e lipase por fungos endofíticos de *Bauhinia forficata*. Bischoff et al. (2009) também verificaram destacada atividade de xilanase pelo endófito *Acremonium zeae*. Além disso, fungos endofíticos têm sido relatados como produtores da enzima L-asparaginase (KALYANASUNDARAM et al., 2015; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2007, 2009).

2.2 ENZIMA L-ASPARAGINASE

As enzimas de origem microbiana são as fontes enzimáticas mais atraentes para as indústrias, já que em um curto intervalo de tempo podem ser produzidas em larga escala, por possuírem tempos de geração curtos e o processo de manipulação genética pode ser mais facilmente realizado. Estas enzimas podem ser utilizadas como substituição, na insuficiência ou ausência de enzimas humanas. As indústrias ainda estão em busca de novas fontes microbianas para produção de diferentes enzimas para atender os requisitos enzimáticos (ANBU et al., 2015).

A enzima L-asparaginase é sintetizada por animais, plantas e micro-organismos, no entanto os micro-organismos são considerados as melhores fontes, porque são facilmente cultivados, a extração e purificação da enzima é conveniente, o que facilita a produção em larga escala (ASTHANA; AZMI, 2003). A L-asparaginase é responsável por catalisar a

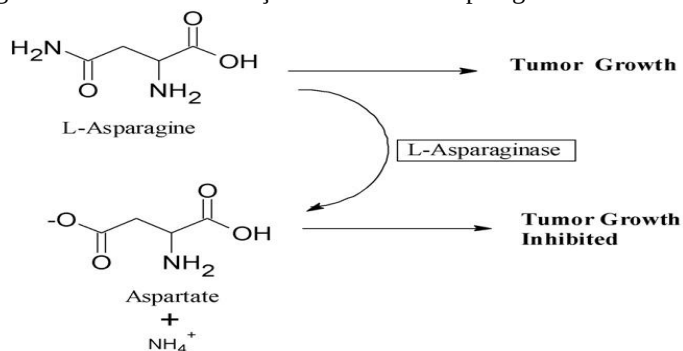
hidrólise do aminoácido asparagina em amônia e ácido aspártico (JHA et al., 2012; NOMME et al., 2012), possuindo grande importância para a indústria farmacêutica e alimentícia (DUVAL et al., 2002; HENDRIKSEN et al., 2009; MOHAN KUMAR et al., 2014; NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

2.2.1 Importância para a indústria farmacêutica

A L-asparaginase é um importante fármaco utilizado no tratamento da leucemia linfoblástica aguda e do linfoma de Hodgkin (GUILLEME et al., 2013). Além disso, são utilizadas no tratamento da leucemia linfocítica crônica, leucemia mielocítica aguda, melanossarcoma, linfossarcoma e reticulossarcoma (DEVI; AZMI, 2012). Essa enzima vem sendo utilizada clinicamente desde 1978, quando foi aprovada para utilização no tratamento da Leucemia linfoblástica aguda e linfossarcomas (SOLER, 2015).

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) catalisa a hidrólise do aminoácido L-asparagina em ácido L-aspártico e amônia (JAIN et al., 2012; VERMA et al., 2007). A L-asparagina é um aminoácido importante para a síntese de proteínas pelas células, que pode ser produzido intracelularmente através da enzima asparagina sintetase ou pode ser absorvido externamente (corpo disponibiliza as suas células). As células tumorais necessitam de grandes quantidades de asparagina para atender o seu rápido crescimento (VERMA et al., 2007). Muitas células tumorais são deficientes na síntese de aminoácidos, por isso necessitam de associação extracelular para sintetizar proteínas. O mecanismo de ação da enzima L-asparaginase leva a depleção extracelular de asparagina, o que inibe a síntese de proteínas, tendo como consequência a apoptose das células neoplásicas (GUILLEME et al., 2013) (figura 1). As células saudáveis não são afetadas, pois sintetizam asparagina através da enzima L-asparagina sintetase presente em quantidades suficientes (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

Figura 1 - Mecanismo de ação da enzima L-asparaginase



Fonte: Narta; Kanwar e Azmi (2007)

As duas fontes de asparaginase utilizadas clinicamente são derivadas das bactérias *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* (DUVAL et al., 2002; MALONEY, 2010). Destas bactérias são derivados três tipos de asparaginases, de *E. coli* a asparaginase peguilada (PEG-asparaginase) e asparaginase nativa, e de *E. chrysanthemi* a crisantaspase (RIZZARI et al., 2013). Comercialmente as principais formulações são Elspar® (*E. coli*), Oncaspar® (forma ligada covalentemente a monometoxipolietilenoglicol (mPEG)) e Erwinase® (*E. chrysanthemi*) (DIVINO, 2015). O fármaco proveniente de ambas as fontes enzimáticas possui mecanismo de ação e toxicidade idênticos, mas propriedades farmacocinéticas diferentes. Os pacientes que apresentam hipersensibilidade a uma preparação podem ser tratados com outra L-asparaginase e não desenvolver alergias (NARTA; KANWAR; AZMI, 2007).

A utilização deste fármaco ainda é marcada pelos efeitos secundários visto que a eliminação de asparagina também está associada a uma redução da síntese de outras proteínas, como insulina e albumina, entre outras, causando toxicidades como pancreatite, hiperglicemia e trombose (GUILLEME et al., 2013). A enzima L-asparaginase pode também realizar a hidrólise da L-glutamina, além da L-asparagina (AVRAMIS, 2012). Os produtos da hidrólise da asparagina e glutamina, o aspartato e glutamato, estão relacionados com a neurotoxicidade que ocorrem em pacientes, cujos sintomas são sonolência, letargia, fadiga, tontura, irritabilidade, agitação e depressão (LOUREIRO, 2010). Além disso, a amônia liberada no sangue, resultado da hidrólise de asparagina, quando em altas concentrações pode relacionar-se aos casos de hepatotoxicidade e encefalopatia (LOUREIRO, 2010). Outras reações de hipersensibilidades são: dor abdominal, broncoespasmo, erupção cutânea e urticária (CORTIJO-CASCAJARES; JIMÉNEZ-CEREZO; TEJADA, 2012). Além disso, o uso prolongado dessas proteínas leva a produção de anticorpos, tendo como consequência choque anafilático, podendo causar também neutralização do efeito do fármaco (JAIN et al., 2012).

Em virtude da importância da L-asparaginase no tratamento de diversos cânceres, em especial a leucemia, é fundamental a busca por novas fontes dessa enzima para reduzir os efeitos colaterais e aumentar a sua disponibilidade como fármaco (LOPES et al., 2015). De acordo com Hosamani e Kaliwal (2011b), a busca de fontes eucarióticas para a L-asparaginase pode levar a produção de enzimas com menos efeitos colaterais. A L-asparaginase fúngica por ser de origem eucariótica apresenta menor imunogenicidade devido às modificações pós-traducionais sofridas, assemelhando-se mais com as proteínas humanas (SOLER, 2015). A L-asparaginase produzida por fungos é mais vantajosa que a bacteriana por não ser alérgica (JHA et al., 2012; PATIL; PATIL; MAHESHWARI, 2012).

2.2.2 Importância para a indústria alimentícia

De acordo com Mohan Kumar; Ramasamy e Manonmani (2013) há uma crescente demanda da enzima L-asparaginase na indústria alimentícia com a finalidade de diminuir os níveis de acrilamida dos alimentos fritos. A acrilamida é uma substância classificada como potencialmente cancerígena para humanos (MOHAN KUMAR et al., 2014). Esta substância pode ser formada em alimentos cozidos e fritos, principalmente nos ricos em carboidratos (ZUO et al., 2015). Zyzak et al. (2003), avaliaram a eficiência da enzima L-asparaginase quanto a diminuição da formação de acrilamida para um produto de batata, e verificaram que o pré-tratamento com a enzima reduziu em 88% a asparagina e reduziu mais que 99% a formação de acrilamida. E ainda provaram que a principal via para formação de acrilamida envolve o aminoácido asparagina. A formação de acrilamida é atribuída a temperaturas mais altas, resultado das reações de Maillard, que são necessárias para produção de sabor, cor e aroma desejável. Os elementos essenciais para a reação de Mailard são os aminoácidos, asparagina no caso da batata, e açúcares redutores como glicose e frutose (PEDRESCHI; KAACK; GRANBY, 2008).

A utilização da enzima L-asparaginase (L-asparagine amidohydrolase, EC 3.5.1.1) propicia uma alternativa para redução de acrilamida (HENDRIKSEN et al., 2009). Há uma diversidade de produtos no qual a formação de acrilamida pode ser reduzida por uso de asparaginase, como pão, cereais, biscoitos, batatas fritas e café (KORNBRUST et al., 2010). Essa enzima pode reduzir por hidrólise o nível de asparagina livre, sem afetar a maioria dos aminoácidos, e assim remover um dos precursores essenciais para formação de acrilamida, e o impacto para a qualidade final dos alimentos deve ser limitado (HENDRIKSEN et al., 2009). A taxa de hidrólise da asparagina depende de parâmetros físicos, como pH, temperatura, tempo e atividade da água, assim como a interação entre eles. Como também a quantidade dos precursores, açúcares redutores e asparagina livre variam entre os produtos alimentares, o que influencia na formação de acrilamida (KORNBRUST et al., 2010). Mohan Kumar et al. (2014) verificaram que a L-asparaginase produzida por *Cladosporium* sp. reduziu a formação de acrilamida durante a fabricação de pão, não afetando suas propriedades físico-sensoriais. Hendriksen et al. (2009) verificaram uma redução de 34 a 92% do teor de acrilamida em massas após o tratamento com asparaginase a partir de *Aspergillus oryzae*.

Existe dois produtos de asparaginase no comércio para redução de acrilamida dos alimentos, o Acrylaway® da Novozymes A/S e o PreventASe™ da DSM, produzidos a partir de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger*, respectivamente (KRISHNAKUMAR;

VISVANATHAN, 2014; XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016). A PreventASe™ atua convertendo a asparagina, reduzindo em até 90% a formação de acrilamida em pães, sem afetar a sua textura e sabor (DSM, 2018). O Acrylaway® também atua reduzindo a formação de acrilamida em diversos alimentos como batata-frita, café, biscoito e cereais (NOVOZYMES, 2013). Essas enzimas são produzidas por fungos amplamente utilizados por décadas em produtos comerciais e demonstraram ser seguros (XU; ORUNA-CONCHA; ELMORE, 2016).

2.3 PRODUÇÃO DE L-ASPAGAGINASE POR FUNGOS

Os fungos são utilizados para produção de antibióticos, vitaminas, pigmentos, pesticidas biológicos, além de produzirem enzimas que são utilizadas na indústria alimentícia, em processos biotecnológicos e na indústria papelreira (ADRIO; DEMAINE, 2003; MORAES; PAES; HOLANDA, 2010; SILVA; COELHO, 2006).

Além disso, os fungos filamentosos vêm sendo frequentemente relatados na produção da enzima L-asparaginase. Como por exemplo, *Aspergillus* sp., *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. sydowii*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. versicolor*, *Acremonium* sp., *Alternaria alternata*, *A. brassicicola*, *Botrytis* sp., *Corynespora* sp., *Cladosporium* sp., *C. cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Chaetomium* sp., *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *C. lunata*, *Dreschlera* sp., *Fusarium* sp., *F. Oxysporum*, *F. solani*, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi*, *Mucor hiemalis*, *Nigrospora* sp., *Penicillium* sp., *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. commune*, *P. minioluteum*, *Purpureocillium lilacinum*, *Pestalotiopsis* sp., *Phyllosticta* sp., *Talaromyces* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. viride* (BEDAIWY et al., 2016; BASKAR; RENGANATHAN, 2011; DANGE; PESHWE, 2015; DIDWANIA; SOLANKI; KAUR, 2016; MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; LOUREIRO et al., 2012; NAGARAJAN et al., 2014; NIHARIKA; SUPRIYA, 2014; RANI; SUNDARAM; VASANTHA, 2012; SARQUIS et al., 2004; SANTOS, M. G. S. et al., 2015; THAKUR et al., 2013; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2009; THIRUNAVUKKARASU et al., 2011; UZMA; NARASIMHA MURTHY; SRINIVAS, 2016).

Dentre os fungos filamentosos, isolados dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* vêm sendo relatados em estudos como fontes promissoras na produção de L-asparaginase (CHOW; TING, 2015; ELSHAFFI et al., 2012a, b; GULATI; SAXENA; GUPTA, 1997; GUPTA; DASH; BASAK, 2009; KRISHNAPURA; BELUR, 2016; PATRO; GUPTA, 2012;

SANTOS, M. G. S. et al., 2015; SHRIVASTAVA et al., 2012; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2009). Além disso, fungos endofíticos filamentosos são frequentemente relatados em estudos como produtores desta enzima (CHOW; TING, 2015; NAGARAJAN et al., 2014; PATIL; PATIL; MAHESHWARI, 2012; SANTOS, M. G. S. et al., 2015; THEANTANA; HYDE; LUMYONG, 2007).

A fermentação submersa é a técnica mais utilizada para a produção de enzimas (ORLANDELLI et al., 2012), sendo muito utilizada na produção de L-asparaginase (BEDAIWY et al., 2016; DIAS; SATO, 2016; KRISHNAPURA; BELUR, 2016; PATRO; GUPTA, 2012; RANI; SUNDARAM; VASANTHA, 2012; SARQUIS et al., 2004; THAKUR et al., 2013), no entanto, alguns trabalhos também utilizam a técnica de fermentação em estado sólido para a produção desta enzima (HOSAMANI; KALIWAL, 2011a; MOHAN KUMAR; MANONMANI, 2013; MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013; VARALAKSHMI; RAJU, 2013).

Devido à importância dos usos da enzima L-asparaginase mais estudos e mais esforços da indústria alimentícia e farmacológica são necessários para suprir a demanda desta enzima (JHA et al., 2012). Fontes de produção alternativa de L-asparaginase, como os micro-organismos eucarióticos, podem direcionar a descoberta de uma enzima com menores efeitos colaterais (LOUREIRO et al., 2012; SARQUIS et al., 2004).

2.4 CAATINGA

A Caatinga ocupa aproximadamente 844.453 km² estendendo-se pelos estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia, Ceará, Sergipe, Alagoas, Piauí, Rio Grande do Norte e Minas Gerais, sendo limitada a leste pela floresta Atlântica, a oeste pela floresta Amazônica e ao sul pelo Cerrado (LEAL et al., 2005; MMA, 2017b). Sua área corresponde a 11% do território brasileiro e a 54% da Região Nordeste constituindo o chamado Polígono das Secas (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). O nome Caatinga tem origem Tupi-Guarani e quer dizer floresta branca, o que caracteriza o aspecto da vegetação durante a estação seca, quando perdem suas folhas, permanecendo na paisagem seca apenas os troncos brancos dos arbustos e árvores (PRADO, 2003).

A região é caracterizada por apresentar terrenos sedimentares que apresentam boa reserva de água subterrânea e terrenos cristalinos praticamente impermeáveis. Os solos, geralmente, são pouco desenvolvidos, pedregosos e pouco espessos, mineralmente ricos e com pouca capacidade de retenção de água (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). As

bacias hidrográficas da Caatinga apresentam peculiaridades, como regime sazonal e intermitente dos rios, reflexo das precipitações escassas e irregulares e da alta taxa de evaporação hídrica, mas estas características não são comuns a todos os rios, já que os rios Parnaíba e São Francisco são perenes (ROSA et al., 2003).

O bioma quando comparado a outras formações brasileiras apresenta características extremas como: a mais alta radiação solar e temperatura média anual, baixa nebulosidade, mais baixas taxas de umidade relativa, mais elevada evapotranspiração potencial e principalmente precipitações mais baixas e irregulares (PRADO, 2003). A Caatinga apresenta um clima do tipo Bsh (semiárido), quente e anualmente a precipitação média varia de 240 a 1500 mm, aproximadamente 50% da região recebe menos de 750 mm de chuva, e outras áreas menos de 500 mm. Na Caatinga cerca de 50 a 70% das chuvas se concentram em três meses consecutivos, sendo o período de estação seca muito variável entre as diversas áreas do bioma (PRADO, 2003; VELLOSO; SAMPAIO; PAREYN, 2002). O total de chuva varia muito entre os anos, em intervalos de 10-20 anos chegam a menos da metade da média (VELLOSO; SAMPAIO; PAREYN, 2002). A temperatura média anual varia de 20 a 28°C, diminuindo em altitudes acima de 500m das chapadas e serras (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009; MARACAJÁ; BENEVIDES, 2006).

Na paisagem há uma diversidade de comunidades vegetais que são formadas por uma série de combinações entre variações microclimáticas e tipos edáficos, com predomínio de uma vegetação arbustiva, espinhosa e ramificada, com muitas euforbiáceas, cactáceas e bromeliáceas (BARROS, 2003; LEAL et al., 2005). Apresenta espécies que possuem adaptações à deficiência hídrica, como: herbáceas anuais, caducifolia, suculência, espinhos e acúleos, predominância de árvores e arbustos de pequeno porte e cobertura descontínua de copas (GIULIETTI et al., 2004).

É um bioma rico em diversidade de flora e fauna, com presença de muitas espécies endêmicas (ALVES; ARAÚJO; NASCIMENTO, 2009). Apesar de estar bastante alterada, a Caatinga abriga grande variedade de tipos vegetacionais, com número expressivo de táxons endêmicos e raros (GIULIETTI et al., 2004), e ainda 178 espécies de mamíferos, 177 de répteis, 591 de aves, 79 de anfíbios, 221 de abelhas e 241 de peixes (MMA, 2017a).

A região da Caatinga é ocupada por cerca de 27 milhões de habitantes, sendo considerada a região semiárida mais povoada do mundo, onde a maioria dos habitantes é carente e necessita dos recursos naturais para a sobrevivência (HAUFF, 2010). Com as espécies da Caatinga são realizadas várias atividades econômicas, como as voltadas para fins agrosilvopastoris e industriais, em especial nos ramos farmacêutico, químico, cosméticos e

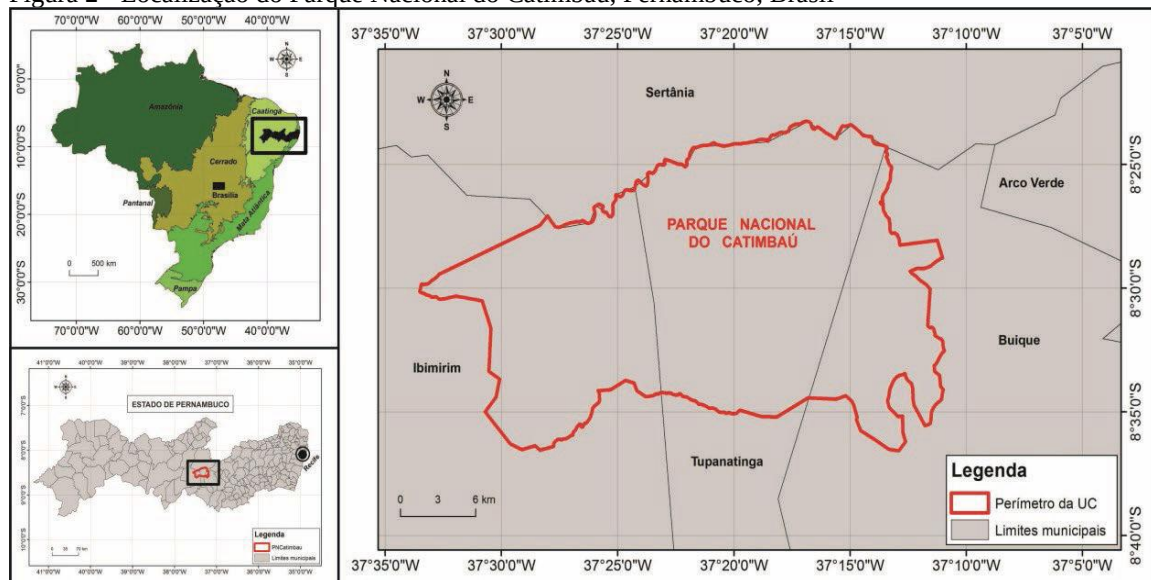
alimentos (MMA, 2017a). Atividades antrópicas não sustentáveis, como agricultura de corte e queima, caça de animais, corte de madeira para lenha e a remoção contínua da vegetação para criação de caprinos e bovinos tem levado, em larga escala, ao empobrecimento ambiental da Caatinga (LEAL et al., 2005).

No país, 62% das áreas que são susceptíveis à desertificação estão localizadas na Caatinga (MMA, 2017b). Este bioma brasileiro é considerado como um dos mais degradados, estima-se que 45,3% de sua área total esteja alterada, colocando-o como o terceiro bioma mais modificado do Brasil, sendo superado apenas pela Mata Atlântica e Cerrado (AGEITEC, 2017). Apenas 8,4% de sua região é protegida por unidades de conservação estaduais e federais, deste percentual 3,9%, distribuídos em 23 unidades, correspondem as unidades de conservação federal (HAUFF, 2010; ICMBIO, 2017).

2.4.1 Parque Nacional do Catimbau

O Parque Nacional do Catimbau tem extensão de 62.300 km², ocupa parte dos municípios de Ibimirim, Tupanatinga e Buíque, posicionando-se na região denominada Sertão do Moxotó no estado de Pernambuco (MELO, 2012) (figura 2).

Figura 2 - Localização do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil



Fonte: Melo (2012)

É uma Unidade de Proteção Integral, considerada de extrema importância biológica, que tem como objetivo preservar ecossistemas naturais existentes, possibilitando o desenvolvimento de turismo ecológico, atividades de educação ambiental e a realização de pesquisas científicas (IBAMA, 2017; MMA, 2002). O nome Catimbau deriva da serra do

Catimbau, a qual está localizada no distrito do Catimbau, em Buíque (VASCONCELOS; MELO, 2016).

O clima da região é o tropical semi-árido, tendo temperatura média anual de 23°C. As médias das chuvas anuais variam de 650 a 1100 mm, com irregularidade elevada no regime interanual, devido a sua posição geográfica é submetido aos regimes de outono-inverno (s') e verão-outono (w') e por volta de 60 a 75% das chuvas ocorrem entre março e junho (IBAMA, 2017; RODRIGUES; MOTA FILHO; PEREIRA, 2010). Os solos são predominantemente podzólicos e planossolos nas encostas dos paredões e nas regiões planas são litólicos. O terreno apresenta grande número de afloramentos rochosos e variação de levemente a fortemente ondulado (FABRICANTE et al., 2014).

O Parque apresenta altitudes que variam entre 370m e 1068m, fauna e flora peculiares, com espécies endêmicas. Possui diversos microhabitats, o que atribui à região uma vegetação típica da Caatinga e ainda formações vegetais específicas nos solos arenosos pobres e nas rochas (CARVALHO; SANTOS-ANDRADE; SCHLINDWEIN, 2007; CAVALCANTI; CORRÊA, 2014; MELO, 2012). Segundo Rodal et al. (1998) no Parque há quatro tipos de vegetação distintas, a caatinga arbustiva, o campo rupestre, a vegetação florestal perenifólia e a vegetação arbustiva perenifólia. Devido as variações de relevo e microclima existentes, o mesmo apresenta espécies que não ocorrem só na Caatinga mas também em Cerrado, Campo rupestre, Mata atlântica e Restinga, destacando-se a grande abundância de cactos e bromélias (IBAMA, 2017; RODAL et al., 1998).

2.5 FAMÍLIA BROMELIACEAE A. JUSS.

A família Bromeliaceae é composta por 58 gêneros, distribuídos em oito subfamílias, a Bromelioideae, Puyoideae, Pitcairnioideae, Navioideae, Hechtioideae, Tillandsioideae, Lindmanioideae e Brocchinioideae (GIVNISH et al., 2007, 2011; LUTHER, 2008). De acordo com a reconstrução biogeográfica realizada por Givnish et al. (2011), as bromélias surgiram há cerca de 100 milhões de anos no Escudo das Guianas. As espécies são predominantemente neotropicais, exceto *Pitcairnia feliciana* que ocorre na África Ocidental, e apresentam maior diversidade na floresta atlântica brasileira (CRUZ et al., 2017; MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009). As bromélias ocupam todas as regiões do Brasil, ocorrendo nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica, Pampa, Pantanal, Amazônia, Cerrado e Caatinga, sendo catalogadas 1343 espécies distribuídas em 44 gêneros, dos quais 17 são endêmicos (FORZZA et al., 2017a). Ferreira; Fabricante e Siqueira Filho

(2015) realizaram um inventário florístico da família Bromeliaceae no Parque Nacional do Catimbau e verificaram que a família está representada por 11 espécies, distribuindo-se em três subfamílias e oito gêneros, sendo Bromelioidae a subfamília mais representativa.

As bromélias exibem uma combinação de qualidades que proporcionam a sobrevivência em ecossistemas amplamente disponíveis, subutilizados, sendo muitas vezes fisicamente exigentes, como por exemplo, hábito rizomatoso, corpo herbáceo pequeno, fitotelmo dispar, suculência e outras características xeromórficas, tricoma foliar com capacidade de substituir raízes absorventes e prover serviços adicionais como a refletância de luz. Esses atributos explicam como um grupo de espécies pode ser tão versátil e tolerante a estresses (BENZING, 2000).

A família é composta basicamente por plantas herbáceas, que podem ser epífita, rupícola e terrícola, apresentam folhas lanceoladas largas com bordas com ou sem espinhos. Geralmente as espécies desenvolvem as folhas em forma de roseta, seu centro forma um tanque natural para armazenar água, a qual é utilizada em seu metabolismo. A nutrição vegetal é complementada por esse líquido que contém detritos orgânicos e inorgânicos (FORZZA et al., 2017a; NOGUEIRA; CÔRTEZ; VERÇOZA, 2011). Devido a sua morfologia propícia ao desenvolvimento, alimentação e abrigo as bromélias possuem uma capacidade peculiar de abrigar várias espécies de animais como aracnídeos, formigas, vespas, abelhas, anuros, beija-flores e morcegos (DIAS et al., 2014).

Além da importância biológica a família possui importância para produção de fibras, ornamentação, consumo e para a medicina (MOREIRA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 2006). A espécie *Neoglaziovia variegata* (caroá-verdadeiro) apresenta grande valor econômico por ser utilizada como produtora de fibras. Outra importância econômica da família é o emprego das espécies para fins ornamentais, sendo muito utilizadas em projetos paisagísticos e decorações de interior, seu uso se deve a beleza de suas cores e formas, fácil adaptação a pequenos jardins, baixa demanda de cuidados e a durabilidade das inflorescências (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009; MOREIRA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 2006).

A importância das bromélias se destaca pelo fruto do abacaxi, *Ananas comosus*, muito utilizado na alimentação, sendo empregado na produção de bebidas, doces e sobremesas. Além disso, seu fruto contém a bromelina, que é uma enzima que apresenta grande valor comercial (MANETTI; DELAPORTE; LAVERDE, 2009; MOREIRA; WANDERLEY; CRUZ-BARROS, 2006). A importância econômica da bromelina relaciona-se com a sua utilização na indústria alimentícia (no amaciamento de carnes, na clarificação de cervejas, no

preparo de alimentos dietéticos e infantis) e com a produção de fármacos, no tratamento de distúrbios digestivos, na produção de detergentes e em indústrias têxteis para amaciamento de fibras (FRANÇA-SANTOS et al., 2009).

Albuquerque et al. (2007) analisaram informações publicadas sobre plantas medicinais utilizadas por comunidades tradicionais da Caatinga e citaram várias espécies de bromélias com indicação terapêutica, como por exemplo, espécies do gênero *Tillandsia* apresentam importância terapêutica para hemorragia uterina, úlceras, reumatismo, hemorróidas, hemostáticos, problemas cardíacos, laxantes e impotência sexual. Outras espécies como *Aechmea lingulata*, *Ananas sativus*, *Bromelia laciniosa*, *Bromelia plumier* também foram indicadas para utilização contra caspa, perda de cabelo, dor nas costas, problemas respiratórios, gripe, cólicas infantis, diarreia, hepatite, febre, icterícia, helmintíase, hipertensão arterial e hipercolesterolemia.

2.5.1 *Tillandsia catimbauensis* Leme, W. Till & J.A. Siqueira

Pertence a família Bromeliaceae, subfamília Tillandsioideae, sendo o gênero *Tillandsia* um dos mais representados na Caatinga (FERREIRA; FABRICANTE; SIQUEIRA FILHO, 2015; PONTES; AGRA, 2006). O gênero *Tillandsia* L. não é endêmico do Brasil, apresenta distribuição em todas as regiões do país, ocorrendo nos domínios fitogeográficos do Pampa, Pantanal, Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Cerrado (FORZZA et al., 2017b). Ferreira; Fabricante e Siqueira Filho (2015) realizaram um inventário florístico da família Bromeliaceae no PARNA do Catimbau e constataram que o gênero *Tillandsia* apresentou maior número de espécies, sendo representado pelas espécies *Tillandsia loliacea*, *Tillandsia streptocarpa*, *Tillandsia recurvata* e *Tillandsia catimbauensis*.

Tillandsia catimbauensis é uma espécie de planta rupícola sendo às vezes epífita, com altura de 27 a 30 centímetros, não possui caule, apresenta folhas sub-eretas recurvadas, coriáceas, com lâminas triangulares com comprimento de 18 a 25 centímetros. Sua inflorescência é simples, subereta, oblongo-elipsoide, densamente florida, com raque ocultada parcialmente pelas brácteas. Apresenta de 9 a 11 flores, polisticamente dispostas, com 26 a 27 mm de comprimento (FABRICANTE et al., 2014).

É uma bromélia endêmica do estado de Pernambuco que ocorre no domínio fitogeográfico da Caatinga (FORZZA et al. 2017c). Segundo Fabricante et al. (2014), esta espécie é endêmica do Parque Nacional do Catimbau, e é encontrada na forma rupícola predominantemente, mas a forma epífita também é observada. Sempre ocorre em altitudes

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram selecionados 20 isolados de fungos endofíticos previamente isolados da bromélia *Tillandsia catimbauensis* coletada no Parque Nacional do Catimbau-PE. Sendo dez pertencentes ao gênero *Penicillium* e dez pertencentes ao gênero *Talaromyces*, como mostra a tabela a seguir (tabela 1).

Tabela 1 - Fungos endofíticos de *Tillandsia catimbauensis*

Fungo endofítico	Número do URM ou do isolado
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	URM 7826
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7827
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7828
<i>Talaromyces diversus</i>	URM 7829
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7830
<i>Penicillium decaturense</i>	URM 7831
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7667
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7832
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7833
<i>Penicillium</i> sp. 1	URM 7665
<i>Talaromyces pinophilus</i>	T106
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T114
<i>Penicillium</i> sp. 4	T12
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T82
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T20
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T63
<i>Talaromyces</i> sp.	T95B
<i>Talaromyces</i> sp.	T95A
<i>Talaromyces diversus</i>	T10A
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T124

Fonte: Silva (2017)

3.2 PRODUÇÃO DE L-ASPARAGINASE EM MEIO LÍQUIDO

A L-asparaginase foi produzida em meio Czapek Dox's modificado (CDM) (Saxena e Sinha, 1981 modificado por Gulati, Saxena e Gupta, 1997), composto por glicose (2,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH₂PO₄ (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,52 g/L), CuNO₃.3H₂O (0,01 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,01 g/L), FeSO₄.7H₂O (0,01 g/L), pH 6,2. Na etapa de pré-fermentação, foram utilizados 50 mL do meio CDM contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), porém alterando a quantidade de glicose (14 g/L) e adicionando (NH₄)₂SO₄ (2,0 g/L). Estes frascos foram inoculados com 1 mL de suspensão de esporos e incubados a 30°C, a 120 rpm por 96 horas. Após a incubação, todas as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e o micélio foi utilizado na etapa de fermentação.

Para fermentação, o micélio coletado na etapa anterior foi inoculado em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio CDM. Em seguida incubados a 30°C, a 120 rpm por 96 horas. Após esse período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1. O micélio obtido foi utilizado para quantificar a atividade enzimática (LOUREIRO et al., 2012 modificado).

3.3 ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

A atividade enzimática foi determinada de acordo com Drainas; Kinghorn e Pateman (1977) modificado. A solução para determinação da atividade foi composta de 1,5 mL Tris-HCl (20 mM, pH 8,6), 0,2 mL solução de L-asparagina (100 mM), 0,2 mL solução de hidroxilamina pH 7,0 (1 M) e 0,1 g de biomassa fúngica. Na biomassa de cada cultura (0,1 g) foi adicionado o tampão Tris-HCl, a mesma foi macerada e agitada em vórtex. Nas amostras foram adicionadas as soluções de L-asparagina e hidroxilamina. Tanto as amostras quanto as amostras em branco (biomassa e Tris-HCl) foram incubados a 37°C, 150 rpm, por 30 minutos. Em seguida foi adicionado à mistura, 0,5 mL de solução de cloreto férrico/TCA/HCl [10% (w/v) de FeCl₃ mais ácido tricloroacético a 5% (w/v) em 0.66 mol·L⁻¹ HCl] em todas as amostras. Às amostras em branco foram acrescentadas as soluções de asparagina e hidroxilamina. Posteriormente ambas as amostras foram centrifugados a 6.000 rpm por 15 minutos. Após centrifugação, os sobrenadantes de todas as amostras foram lidos em espectrofotômetro a 500 nm. Uma unidade de L-asparaginase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de β-hidroxâmico aspártico por minuto a 37°C. Todas as análises foram comparadas ao branco da amostra.

3.4 SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DA L-ASPARAGINASE

Inicialmente foi realizada uma comparação da influência dos substratos L-prolina e L-asparagina no meio CDM para a produção de biomassa. Observou-se que a L-prolina foi o substrato que favoreceu a produção de biomassa, sendo então utilizado nos planejamentos estatísticos. Para seleção das melhores condições de produção de biomassa foi utilizado um planejamento experimental estatístico (2³) (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; MYERS; MONTGOMERY, 1995) com o objetivo verificar a influência das variáveis para a produção de biomassa fúngica do melhor produtor de L-asparaginase. Este planejamento foi composto

por doze ensaios, com quatro repetições no ponto central, três variáveis, com dois níveis para cada um (23). As variáveis utilizadas foram: pH, concentração de L-prolina e concentração de inóculo (tabela 2).

Nesta etapa foram utilizados 100 mL do meio CDM modificado contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), onde as variáveis utilizadas foram ajustadas em cada frasco de acordo com o planejamento seguido. Estes frascos foram incubados por 96 horas a 30°C e 120 rpm. Após a incubação, a biomassa foi filtrada, seca a 60°C e pesada. O tratamento que proporcionou maior produção de biomassa foi utilizado na etapa seguinte de fermentação.

Tabela 2 - Planejamento experimental fatorial 2³ para otimização da produção de biomassa de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826)

Ensaio	Concentração de L-prolina %	pH	Concentração de Inóculo (esporos/mL)
1	1	6,0	1x10 ⁶
2	2	6,0	1x10 ⁶
3	1	8,0	1x10 ⁶
4	2	8,0	1x10 ⁶
5	1	6,0	1x10 ⁸
6	2	6,0	1x10 ⁸
7	1	8,0	1x10 ⁸
8	2	8,0	1x10 ⁸
9	1,5	7,0	5,05x10 ⁷
10	1,5	7,0	5,05x10 ⁷
11	1,5	7,0	5,05x10 ⁷
12	1,5	7,0	5,05x10 ⁷

Fonte: Silva (2017)

Para seleção das melhores condições de produção da L-asparaginase também foi utilizado um planejamento experimental estatístico (2³) (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; MYERS; MONTGOMERY, 1995) com o objetivo verificar a influência das variáveis para a produção de L-asparaginase do melhor produtor enzimático. Para isso foram avaliadas as influências das variáveis pH, concentração de L-prolina e concentração de inóculo (tabela 3).

Nesta etapa foram utilizados 100 mL do meio CDM modificado contidos em frascos de Erlenmeyer (250 mL), onde as variáveis utilizadas foram ajustadas em cada frasco de acordo com o planejamento seguido. Estes frascos foram incubados por 120 horas a 30°C e 120 rpm. Após a incubação, a biomassa foi filtrada e utilizada para quantificar a atividade L-asparaginásica (DRAINAS; KINGHORN; PATEMAN, 1977).

Tabela 3- Planejamento experimental fatorial 2^3 para otimização da produção de L-asparaginase de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826)

Ensaio	Concentração de L-prolina%	pH	Concentração de Inóculo (g)
1	0,5	5,0	1,5
2	1,5	5,0	1,5
3	0,5	7,0	1,5
4	1,5	7,0	1,5
5	0,5	5,0	3,5
6	1,5	5,0	3,5
7	0,5	7,0	3,5
8	1,5	7,0	3,5
9	1	6,0	2,5
10	1	6,0	2,5
11	1	6,0	2,5
12	1	6,0	2,5

Fonte: Silva (2017)

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos da atividade enzimática dos fungos endofíticos de *T. catimbauensis* foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis. Este teste foi utilizado para verificar a existência de diferença de significância estatística ($p < 0,05$) entre a atividade enzimática produzida pelos endófitos.

Para os resultados obtidos na otimização da produção de biomassa e otimização da produção de L-asparaginase, utilizou-se o teste F (ANOVA) para verificar e avaliar a relação entre as variáveis independentes selecionadas e a biomassa ou atividade enzimática. A teoria da superfície de resposta foi utilizada para visualizar tendências entre as variáveis. E o software R (R Core Team 2015) foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE DA L-ASPARAGINASE

Dos 20 isolados de fungos endofíticos testados, dez apresentaram a capacidade de produzir a enzima L-asparaginase (0,50-2,30 U/g) (tabela 4).

Segundo os resultados do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis ($p = 0,00483$), os isolados foram agrupados em cinco grupos (A-E) de acordo com a atividade enzimática exibida. Existe diferença estatística significativa entre os isolados de grupos diferentes, no entanto não existe diferença estatística significativa entre os isolados do mesmo grupo. Os melhores resultados foram classificados no grupo A, *T. cf. cecidicola* (URM 7826) e *Penicillium* sp. (URM 7827), exibindo uma atividade de 2,30 U/g e 1,28 U/g, respectivamente. Entre todos os isolados, *T. cf. cecidicola* apresentou a maior atividade enzimática, sendo então selecionado para processos posteriores de otimização da produção de biomassa e da L-asparaginase.

Tabela 4 - Atividade enzimática de fungos endofíticos de *Tillandsia catimbauensis*

Fungo endofítico	Número do URM ou do isolado	Atividade da absorbância 1	Atividade da absorbância 2	Média
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	URM 7826	2,46	2,14	2,30 ^a
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7827	1,08	1,47	1,28 ^a
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7828	0,81	0,77	0,79 ^b
<i>Talaromyces diversus</i>	URM 7829	0,82	0,69	0,76 ^b
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7830	0,79	0,72	0,75 ^b
<i>Penicillium decaturense</i>	URM 7831	0,60	0,60	0,60 ^c
<i>Penicillium</i> sp. 4	URM 7667	0,60	0,71	0,65 ^c
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7832	0,52	0,54	0,53 ^d
<i>Penicillium</i> sp.	URM 7833	0,50	0,55	0,52 ^d
<i>Penicillium</i> sp. 1	URM 7665	0,50	0,50	0,50 ^d
<i>Talaromyces pinophilus</i>	T106	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T114	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Penicillium</i> sp. 4	T12	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T82	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T20	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T63	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> sp.	T95B	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> sp.	T95A	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces diversus</i>	T10A	0,00	0,00	0,00 ^e
<i>Talaromyces</i> cf. <i>cecidicola</i>	T124	0,00	0,00	0,00 ^e

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,00483$). A média seguida pela mesma letra não difere estatisticamente entre si

Fonte: Silva (2017)

Diversos trabalhos vêm demonstrando que fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Talaromyces* são fontes promissoras de L-asparaginase. Santos, M. G. S. et al. (2015) avaliaram o potencial de fungos endofíticos de *Cereus jamacaru*, e verificaram que de nove

isolados de *Penicillium*, quatro apresentaram a capacidade de produzir L-asparaginase, destacando-se *P. brevicompactum* (2,54 U/ml) como um dos maiores produtores entre todos os organismos testados. Chow e Ting (2015) estudando fungos endofíticos de plantas com propriedades anticancerígenas destacaram *P. simplicissimum* como o terceiro maior produtor entre os 25 isolados que apresentaram atividade enzimática. Theantana; Hyde e Lumyong (2009) evidenciaram potencial enzimático em 53 isolados (0,014 - 1,530 U/mL) de plantas medicinais, destacando elevada atividade em isolados de *Penicillium* e *Talaromyces*. Krishnapura e Belur (2016) após purificação parcial e caracterização da enzima produzida por *Talaromyces pinophilus*, endófito de *Curcuma amada*, consideraram a enzima uma potencial candidata para ensaios industriais e clínicos, devido a suas propriedades bioquímicas e eficiência. Entretanto, todos os estudos citados anteriormente utilizaram metodologias distintas para quantificação da produção enzimática, como a utilização do filtrado de cultura e da técnica de nesslerização para tal finalidade.

Semelhante a metodologia empregada neste estudo, Drainas; Kinghorn e Pateman (1977) utilizaram biomassa fúngica para determinar a atividade da L-asparaginase pela formação do β -hidroxâmico aspártico. Baseados no estudo de Drainas; Kinghorn e Pateman (1977), os trabalhos realizados por Mohan Kumar; Ramasamy e Manonmani (2013) e Mohan Kumar e Manonmani (2013) também verificaram a atividade enzimática pela quantificação do β -hidroxâmico aspártico, no entanto, para isso os autores utilizaram enzima extracelular fúngica.

Assim como no presente estudo, outras pesquisas utilizaram a biomassa fúngica para determinar a atividade enzimática em isolados do gênero *Penicillium*. Como por exemplo, Patro e Gupta (2012) relataram potencial enzimático em *Penicillium* sp. utilizando o micélio como fonte de L-asparaginase. Gupta; Dash e Basak (2009) avaliaram a produção intracelular e extracelular fúngica e verificaram que 85 isolados apresentaram atividade intracelular, enquanto 20 apresentaram produção extracelular, destacando-se quanto a máxima produção enzimática intracelular *Penicillium* sp. PF 52 (16,71 U/g) e *Penicillium* sp. RF2 (5,41 U/g). Assim como o trabalho anterior, Elshafei et al. (2012a) analisaram a atividade enzimática extracelular e intracelular dos fungos, e observaram que as mais altas atividades foram obtidas a nível intracelular, destacando *P. brevicompactum* (1,7 U/mg) e *P. purpurescens* (1,24 U/mg) como os melhores produtores de L-asparaginase. E ainda, Elshafei et al. (2012b), obtiveram uma atividade de 574,24 U/mg após purificação da enzima intracelular de *Penicillium brevicompactum*.

4.2 SELEÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DE BIOMASSA E DA L-ASPARAGINASE

No planejamento experimental fatorial os valores de biomassa variaram entre 0,16g e 0,66 g, o que demonstrou a importância das variáveis utilizadas para otimização da produção de biomassa. O melhor resultado para a produção de biomassa (0,66 g) foi obtido no pH 6,0, concentração de inóculo de 1×10^8 (esporos/mL) e concentração de L-prolina de 1%. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o pH foi marginalmente significativo ($p= 0.088682$), a concentração de inóculo foi estatisticamente significativo ($p= 0.001347$) e a concentração de L-prolina não foi estatisticamente significativa ($p= 0.835629$). As variáveis pH e concentração de inóculo apresentaram $p < 0,1$, o que indica que exerceram influência sobre a produção de biomassa. O modelo ajusta adequadamente os dados, uma vez que as variáveis independentes explicam 92,74% da variação da produção de biomassa, a falta de ajuste não é estatisticamente significativa e os valores previstos são próximos dos observados (Tabelas 5 e 6). De acordo com os resultados do planejamento, pode-se concluir que o ponto máximo não foi alcançado, mas existem tendências claramente marcadas (figura 4 a, b e c).

Tabela 5 - Produção de biomassa de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826) em um planejamento experimental fatorial 2^3

Ensaio	Concentração de L-prolina %	Ph	Concentração de Inóculo	Biomassa (g)	
				Experimental	Previsto
1	1	6,0	1×10^6	0,21	0,2538
2	2	6,0	1×10^6	0,21	0,2463
3	1	8,0	1×10^6	0,16	0,1713
4	2	8,0	1×10^6	0,16	0,1638
5	1	6,0	1×10^8	0,66	0,6413
6	2	6,0	1×10^8	0,60	0,6338
7	1	8,0	1×10^8	0,50	0,5588
8	2	8,0	1×10^8	0,53	0,5513
9	1,5	7,0	$5,05 \times 10^7$	0,40	0,4025
10	1,5	7,0	$5,05 \times 10^7$	0,49	0,4025
11	1,5	7,0	$5,05 \times 10^7$	0,49	0,4025
12	1,5	7,0	$5,05 \times 10^7$	0,42	0,4025

Fonte: Silva (2017)

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para produção de biomassa de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826)

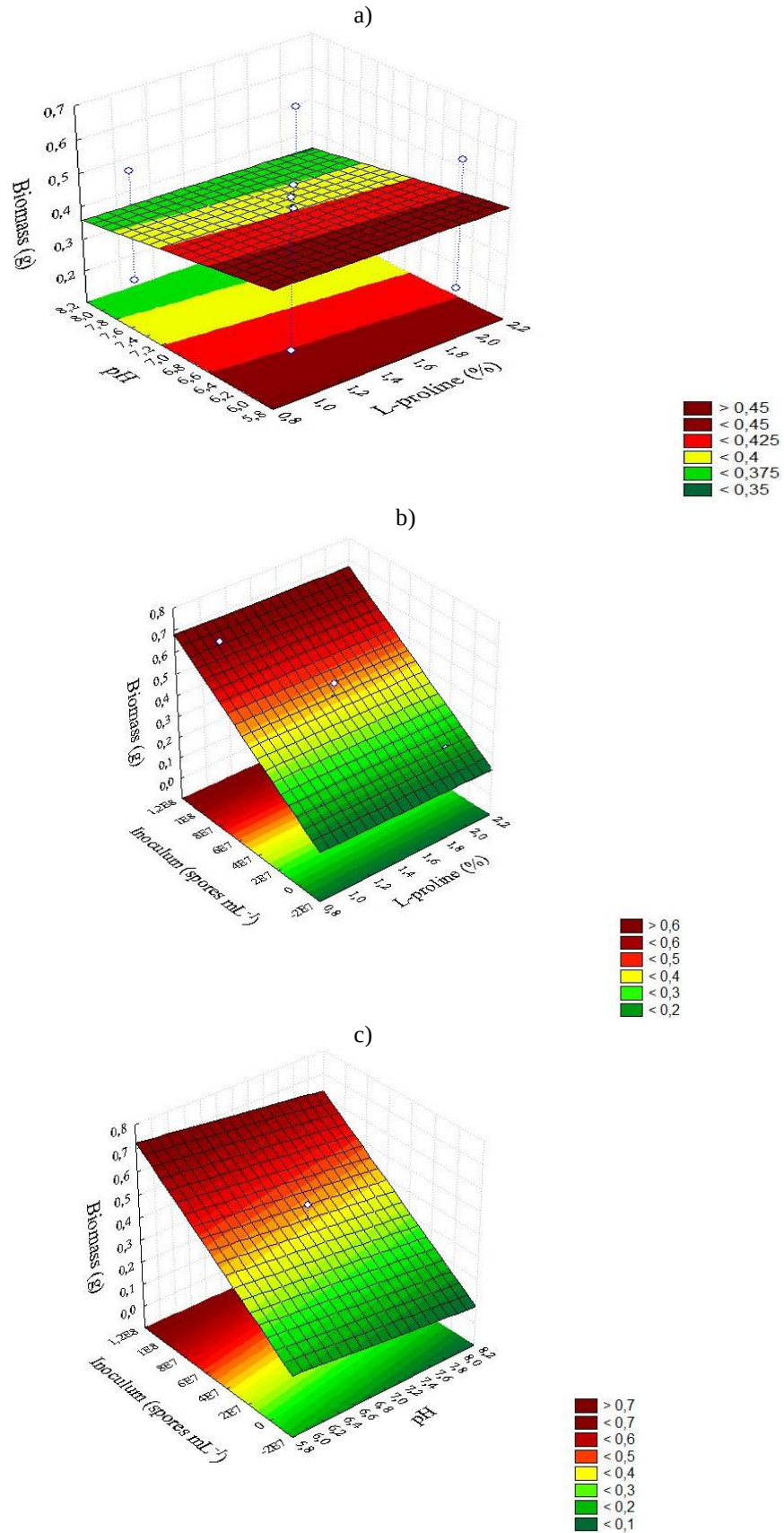
Fonte	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor-F	Valor-p
L-prolina (%)	0,0001	1	0,0001	0,0511	0,8356
Ph	0,0136	1	0,0136	6,1875	0,0887
Inóculo (esporos mL ⁻¹)	0,3003	1	0,3003	136,5057	0,0013
Falta de ajuste	0,0178	5	0,0036	1,6170	0,3674
Erro puro	0,0066	3	0,0022		
Total SS	0,3384	11			

Fonte: Silva (2017)

Segundo Amena et al. (2010), a otimização da concentração de inóculo é fundamental, já que poucos esporos podem levar a uma produção insuficiente de biomassa e muitos esporos podem levar a um aumento da produção de biomassa e consequentemente um rápido esgotamento dos nutrientes. Niharika e Supriya (2014) relata que o crescimento dos micro-organismos pode ser extremamente afetado pelo pH. De acordo com Kumar, Dasu e Pakshirajan (2010), muitos micro-organismos acumulam a enzima L-asparaginase intracelularmente. O favorecimento da produção de biomassa na etapa de pré-fermentação possibilita que durante a etapa de fermentação haja uma maior produção de L-asparaginase.

De maneira semelhante a este estudo, Gbolagade; Sobowale e Adejoye (2006) otimizando a produção da biomassa de *Pleurotus florida* sob condições submersas, encontraram máxima produção micelial em pH 6,5 e temperatura de 30°C. Assim como Niharika e Supriya (2014), que avaliando a influência de fontes de nitrogênio para a produção de biomassa de *Fusarium oxysporum* verificaram que a prolina (1%) destacou-se entre as fontes. No entanto, Sarquis et al. (2004) ao estudar a influência de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de biomassa de *Aspergillus tamarii*, relataram a prolina (2%) como a segunda maior fonte de nitrogênio. Bedaiwy et al. (2016) encontraram em pH 7,0 e temperatura de 30°C as melhores condições para produção da biomassa e atividade da enzima L-asparaginase de *Aspergillus tamarii*.

Figura 4 - Superfície de resposta para produção de biomassa de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826) em função do pH e concentração de L-prolina (a), concentração de inóculo e concentração L-prolina (b) e concentração do inóculo e pH (c)



Fonte: Silva (2017)

No estudo das melhores condições de produção da L-asparaginase, entre todos os planejamentos realizados, os melhores resultados de atividade da enzima são demonstrados na tabela a seguir (tabela 7). No entanto, nenhum ensaio de atividade enzimática atingiu ou foi semelhante aos resultados obtidos durante seleção dos isolados quanto à produção enzimática. O planejamento utilizado não está bem ajustado para explicar a atividade da enzima, uma vez que o valor de p para a falta de ajuste foi estatisticamente significativo ($p= 0,001128$) (tabela 8). Mesmo não sendo encontradas as melhores condições para a produção enzimática, a análise dos resultados deste planejamento dá diretrizes para alcançarmos o ponto ótimo para a produção enzimática, como por exemplo, fixarmos uma das variáveis (pH ou inóculo) e variar as outras duas, já que em alguns ensaios as quantidades mínimas e máximas de inóculo e L-prolina demonstram influências divergentes para a produção da enzima. Por isso é necessário mais estudos e análises detalhadas sobre a influência das variáveis, para encontrarmos o ponto ótimo para a produção da L-asparaginase.

Tabela 7 - Produção de L-asparaginase de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826) em um planejamento experimental fatorial 2^3

Ensaio	Concentração de L-prolina%	Ph	Concentração de Inóculo (g)	Ativ. Asp (U/g)
1	0,5	5,0	1,5	0,68
2	1,5	5,0	1,5	0,00
3	0,5	7,0	1,5	0,00
4	1,5	7,0	1,5	0,98
5	0,5	5,0	3,5	0,63
6	1,5	5,0	3,5	1,01
7	0,5	7,0	3,5	1,02
8	1,5	7,0	3,5	0,58
9	1	6,0	2,5	0,92
10	1	6,0	2,5	0,89
11	1	6,0	2,5	0,87
12	1	6,0	2,5	0,96

Fonte: Silva (2017)

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para produção enzimática de *Talaromyces cf. cecidicola* (URM 7826)

Fonte	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor-F	Valor-p
L-Prolina %	0,007200	1	0,007200	4,6957	0,118797
pH	0,008450	1	0,008450	5,5109	0,100532
Inóculo (g)	0,312050	1	0,312050	203,5109	0,000746
Falta de ajuste	0,236017	1	0,236017	153,9239	0,001128
Erro puro	0,004600	3	0,001533		
Total SS	1,455967	11			

Fonte: Silva (2017)

A produção da enzima L-asparaginase pode ser influenciada por diferentes compostos do meio de cultura, assim como, outros fatores das condições de fermentação como, por exemplo, temperatura de incubação, concentração de inóculo, pH do meio de cultura, tempo

de incubação e taxa de agitação (DIAS; SATO, 2016; GURUNATHAN; SAHADEVAN, 2011; HYMAVATHI et al., 2009; MOHAN KUMAR; RAMASAMY; MANONMANI, 2013). O pH inicial do meio de cultura é uma importante variável que pode afetar a produção de enzimas, já que pode atuar sobre o crescimento fúngico e afetar a disponibilidade de nutrientes no meio (THAKUR et al., 2013). A alta produção de enzimas podem ser favorecidas por diferentes fontes de nitrogênio, já que sugere-se que a produção da enzima L-asparaginase é regulada pelo nitrogênio (SARQUIS et al., 2004). E a otimização do inóculo é necessário, porque níveis elevados de inóculo são inibitórios para produção de enzimas, já que uma grande quantidade de biomassa pode levar ao esgotamento de nutrientes do substrato ou acúmulo de substâncias auto-inibidoras que inibem a formação do produto (HOSAMANI; KALIWAL, 2011a).

Diferentemente deste estudo, outros trabalhos otimizando a produção da L-asparaginase por fungos filamentosos, verificaram a influência das variáveis para a produção enzimática. Tais como, Elshafei et al. (2012a) otimizaram a produção de L-asparaginase produzida por *Penicillium brevicompactum*, obtendo uma atividade 2,92 U/mg em pH 6,0 e temperatura de 28°C. Uzma, Narasimha Murthy e Srinivas (2016) obtiveram a maior produção enzimática do endófito *Fusarium solani* em pH 7,0 e temperatura de 30°C. Assim como, Dias e Sato (2016) estudando a otimização da produção de L-asparaginase por *Aspergillus oryzae* verificaram que 2% prolina, pH 8,0 e 3×10^7 esporos mL⁻¹, foram ideais para a produção enzimática, esses autores ainda afirmaram que entre todas as variáveis analisadas em um planejamento estatístico o pH inicial do meio de cultura e concentração de inóculo foram os fatores altamente significativos. Baskar e Renganathan (2012) identificaram a L-prolina como um componente significativo do meio de fermentação, e verificaram que 1,7% foi a concentração ótima para a produção de L-asparaginase de *Aspergillus terreus*. Ainda, Thakur et al. (2013) relataram que a temperatura de 30°C, pH inicial 7,0 e o período de incubação de quatro dias, foram ótimos para a produção de L-asparaginase extracelular de *Mucor hiemalis*. Mohan Kumar, Ramasamy e Manonmani (2013) otimizaram a produção de L-asparaginase de *Cladosporium* sp. sob fermentação em estado sólido, e verificaram que a temperatura de incubação de 30°C, o pH 5,8 e uma fermentação de 120 horas foram ideais para a produção de L-asparaginase.

5 CONCLUSÃO

- Fungos endofíticos de *Tillandsia catimbauensis* apresentaram potencial de produzir L-asparaginase em meio líquido.
- As melhores condições para a produção de biomassa de *T. cf. cecidicola* URM 7826 foram obtidas a 1% de L-prolina, pH 6,0 e 1×10^8 esporos/mL.
- As melhores condições para a produção de L-asparaginase não foram obtidas, necessitando de mais estudos para que seja alcançado um ponto ótimo.
- O fungo endofítico *T. cf. cecidicola* URM 7826 é indicado para futuros estudos de produção da enzima L-asparaginase.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAİN, A. L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 191-199, set. 2003.
- AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA – AGEITEC. Bioma Caatinga. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/bioma_caatinga/arvore/CONT000glz1ehqv02wx5ok0f7mv200nvg0xn.html>. Acesso em: 7 jul. 2017.
- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, dez. 2007.
- ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.22, n. 3, p. 126-135, jul/set. 2009.
- AMENA, S. et al. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 173-178, jan/mar. 2010.
- ANBU, P. et al. **Microbial enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2014**. BioMed research international, v. 2015, Article ID 816419, 3 pag. 2015.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal biology reviews**, v. 21, n. 2-3, p. 51-66, mai/ago. 2007.
- ASTHANA, S. N.; AZMI, W. Microbial L-asparaginase: A potent antitumour enzyme. **Indian Journal of Biotechnology**, v.2, p. 184-194, abr. 2003.
- AVRAMIS, V. I. Asparaginases: biochemical pharmacology and modes of drug resistance. **Anticancer research**, v. 32, n. 7, p. 2423-2437, 2012.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.22, n. 2, p. 225-229, out.1999.
- BARROS, M. L. B. Prefácio. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003, p. 9-11.
- BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of media components and operating conditions for exogenous production of fungal L-asparaginase. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, n. 2, p. 270-279, 2011.
- BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural

network-linked genetic algorithm. **Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 212-220, mar/abr. 2012.

BEDAIWY, M. Y. et al. Optimal conditions for production of L -asparaginase from *Aspergillus tamarii*. **The Egyptian Journal of Experimental Biololgy (Botany)**, v.12, n. 2, p. 229–237, 2016.

BENZING, D. H. **Bromeliaceae**: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, 2000.

BEZERRA, J. D. P. et al. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill.(Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1989-1995, mai. 2012.

BEZERRA, J. D. P. et al. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, n. 2, p. 53-63, jun. 2013.

BEZERRA, J. D. P. et al. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 49-57, 2015.

BEZERRA, J. D. P. et al. Bezerromycetales and Wiesneriomycetales ord. nov.(class Dothideomycetes), with two novel genera to accommodate endophytic fungi from Brazilian cactus. **Mycological Progress**, v. 16, n. 4, p. 297-309, abr. 2017.

BISCHOFF, K. M. et al. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Current microbiology**, v. 58, n. 5, p. 499-503, 2009.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery. John Wiley & Sons, New Jersey, 2005.

CANUTO, K. M. et al. Fungos endofíticos: perspectiva de descoberta e aplicação de compostos bioativos na agricultura. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Embrapa**, 2012.

CARVALHO, A. T.; SANTOS-ANDRADE, F.; SCHLINDWEIN, C. Baixo sucesso reprodutivo em *Anemopaegma laeve* (Bignoniaceae) no Parque nacional do Catimbau, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. S1, p. 102-104, jul. 2007.

CAVALCANTI, L. C. S.; CORRÊA, A. C. B. Pluviosidade no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco): seus Condicionantes e seus Efeitos sobre a Paisagem. **Geografia**, v. 23, n. 2, p. 133-156, jul/dez. 2014.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421-437. 2013.

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

CHOW, Y. Y.; TING, A. S. Y. INFLUENCE OF GLUCOSE AND L-ASPARAGINE CONCENTRATIONS ON L-ASPARAGINASE PRODUCTION BY ENDOPHYTIC FUNGI. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 7, n. 2, p. 186- 189, out/nov. 2017.

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

CROUS, P. W. et al. Fungal Planet description sheets: 625-715. **Persoonia**, v. 39, n. 1, p. 270–467, 2017.

CRUZ, G. A. S. et al. Molecular phylogeny, character evolution and historical biogeography of *Cryptanthus* Otto & A. Dietr.(Bromeliaceae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 107, p. 152-165, fev. 2017.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* D.C. (ASTERAECEAE). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 2, p. 47-57, maio/ago. 2011.

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, fev. 2015.

DEVI, S.; AZMI, W. One step purification of glutaminase free l-asparaginase from *Erwinia carotovora* with anticancerous activity. **International Journal of Life science & Pharma Research**, v. 2, n. 3, p. 36-45, jul/set. 2012.

DIAS, M. L. et al. Bromélias e suas principais interações com a fauna. **CES Revista**, v. 28, n. 1, p. 3-16, jan/dez. 2014.

DIAS, F. F. G.; SATO, H. H. Sequential optimization strategy for maximum L-asparaginase production from *Aspergillus oryzae* CCT 3940. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 6, p. 33-39, 2016.

DIDWANIA, N.; SOLANKI, M.; KAUR, C. Selection of Strain and Optimization of Asparaginase Production in *Trichoderma harzianum*, v. 4, n. 12, p. 31-36, dez. 2016.

DIVINO, B. S. **Produção biotecnológica de L-asparaginase (ASP1) de Saccharomyces cerevisiae em sistema de expressão heterólogo Pichia pastoris**. São Paulo: 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia bioquímico-farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

DRAINAS, C., KINGHORN, J. R., PATEMAN, J. A. Aspartic hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 493–501, 1977.

DSM. PreventASe®. Disponível em: <https://www.dsm.com/markets/foodandbeverages/pt_BR/products/enzymes/baking/preventase.html>. Acesso em: 2 jan. 2018.

DUVAL, M. et al. Comparison of *Escherichia coli*-asparaginase with *Erwinia*-asparaginase in the treatment of childhood lymphoid malignancies: results of a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer—Children's Leukemia Group phase 3 trial. **Blood**, v. 99, n. 8, p. 2734-2739, 2002.

ELSHAFEI, A. M. et al. Screening and optimization of L-asparaginase and L-glutaminase production by some filamentous fungi. **Advances in Food Sciences**, v. 34, n.3, p. 150-158. 2012a.

ELSHAFEI, A. M. et al. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 3, p. 158-174, 2012b.

FABRICANTE, J. R. et al. Categorização do risco de extinção de *Dyckia limae* LB Sm. e *Tillandsia catimbauensis* Leme, W. T. & JA S. por meio de critérios de distribuição geográfica. **Biotemas**, v. 27, n. 2, p. 203-207, jun. 2014.

FERREIRA, J. V. A.; FABRICANTE, J. R.; SIQUEIRA FILHO, J. A. Checklist preliminar de Bromeliaceae do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil. **Natureza on line**, v. 13, n. 2, p. 92-97, 2015.

FORZZA, R.C. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 10 jul. 2017a.

FORZZA, R. C. et al. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6361>>. Acesso em: 2 ago 2017b.

FORZZA, R. C. et al. Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB34462>>. Acesso em: 3 ago. 2017c.

FRANÇA-SANTOS, A. et al. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.

FREIRE, K. T. L. S. et al. Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896)(Hemiptera: Dactylopiidae). **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 104-110. 2015.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A. community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 27, p. 10107-10112, jul. 2004.

GBOLAGADE, J.; SOBOWALE, A.; ADEJOYE, D. Optimization of sub-merged culture conditions for biomass production in *Pleurotus florida* (mont.) Singer, a Nigerian edible fungus. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 16, p. 1464-1469, ago. 2006.

- GIULIETTI, A. M., et al. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J. M. C. et al. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004, p. 48-90.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from *ndhF* sequence data. **Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n. 1, p. 3-26, 2007.
- GIVNISH, T. J. et al. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 872-895, mai. 2011.
- GUILLEME, C. M. et al. Actualización del tratamiento con L-asparaginasa en Pediatría. **Anales de Pediatría**, v. 79, n. 5, p. 329. e1-329. e11, nov. 2013.
- GUPTA, N.; DASH, S. J.; BASAK, U. C. L-asparaginases from fungi of Bhitarkanika mangrove ecosystem. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 27-30, 2009.
- GURUNATHAN, B.; SAHADEVAN, R. Design of experiments and artificial neural network linked genetic algorithm for modeling and optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 1, p. 50-58, fev. 2011.
- HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, out. 1997.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, out. 2008.
- HAUFF, S. N. Representatividade do sistema nacional de unidades de conservação na Caatinga. **Programa das Nações Unidas Para o Desenvolvimento**. Brasília, 2010. 54 p
- HENDRIKSEN, H. V. et al. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4168-4176, 2009.
- HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. L-asparaginase-an anti tumor agent production by *Fusarium equiseti* using solid state fermentation. **International Journal of Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 88-99, 2011a.
- HOSAMANI, R.; KALIWAL, B. B. Isolation, molecular identification and optimization of fermentation parameters for the production of L-asparaginase, an anticancer agent by *Fusarium equiseti*. **International Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 2, p. 108-119, 2011b.
- HWANG, J.-S. et al. Effects of endophytic fungal secondary metabolites on the growth and physiological response of *Carex kobomugi* Ohwi. **Journal of Coastal Research**, v. 27, n. 3, p. 544-548, 2011.

HYMAVATHI, M. et al. Enhancement of L-asparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 191-198, out. 2009.

IBAMA. 2017. Ambiente Unidades de Conservação: Parque Nacional de Catimbau. Disponível em: <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/unidades_de_conservacao/parques_nacionais/parque_nacional_de_catimbau.html?query=catimbau>. Acesso em: 17 jul. 2017.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE - ICMBio. 2017. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/servicos/geoprocessamento/DCOL/dados_tabulares/UC_bioma_junho_2017.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2017.

JAIN, R. et al. L-asparaginase: A promising enzyme for treatment of acute lymphoblastic leukemia. **People's Journal of Scientific Research**, v. 5, n. 1, p. 29-35, jan. 2012.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of microbiology and biotechnology research**, v. 1, n. 2, p. 21-32. 2011.

JHA, S. K. et al. Microbial L-asparaginase: a review on current scenario and future prospects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 9, p. 3076 -3090, 2012.

KALYANASUNDARAM et al. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from salt marsh fungal endophytes. **World Journal Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 3, p. 663-677, 2015.

KORNBRUST, B. A. et al. 2010. Asparaginase-an enzyme for acrylamide reduction in food products. In: WHITEHURST, R. J., OORT M. V. (eds). **Enzymes in food technology**, 2. ed. Wiley-Blackwell, 2010, cap. 4, p. 59–87.

KRISHNAKUMAR, T.; VISVANATHAN, R. Acrylamide in food products: A review. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 5, n. 7, p. 1- 9, 2014.

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, fev. 2016.

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

KUSARI, P. et al. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 60, n. 1, p. 137-151, mai. 2013.

LEAL, I. R. et al. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, jul. 2005.

LOPES, A. M. et al. Therapeutic L-asparaginase: upstream, downstream and beyond. **Critical reviews in biotechnology**, v. 37, n. 1, 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).** Ribeirão Preto: 2010. 24 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

LOUREIRO, C. B. et al. Purification and Biochemical Characterization of Native and Pegylated Form of L-Asparaginase from *Aspergillus terreus* and Evaluation of Its Antiproliferative Activity. **Advances in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 138-145, 2012.

LUTHER, H. E. **An alphabetical list of bromeliad binomials.** 11 ed. Florida: Bromeliad Society International, 2008.

LUZ, J. S. et al. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, p. 128-134, abr/jun. 2006.

MALONEY, K. W. *Erwinia* asparaginase: coming closer to an understanding of its use in pediatric acute lymphoblastic leukemia? **Pediatric blood cancer**, v. 54, n. 2, p. 189-190, fev. 2010.

MANASA C.; NALINI M. S. L-Asparaginase activity of fungal endophytes from *Tabernaemontana heyneana* wall. (Apocynaceae), endemic to the Western Ghats (India). **International scholarly research notices**, v. 2014, n. 2014, p. 1-7, 2014.

MANETTI, L. M.; DELAPORTE, R. H.; LAVERDE, A. J. Metabólitos secundários da família Bromeliaceae. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1885-1897, 2009.

MARACAJÁ, P. B.; BENEVIDES, D. S. Estudo da flora herbácea da Caatinga no município de Caraúbas no Estado do Rio Grande do Norte. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 165-175, 2006.

MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brasil: Boraginaceae sensu lato. **Biotemas**, v. 25, n. 4, p. 109-120, dez. 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. Decreto de 13 de dezembro de 2002. Criação do Parque Nacional do Catimbau. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/dnn/2002/Dnn9771.htm>. Acesso em: 1 set. 2017.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. 2017. Caatinga. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga>>. Acesso em: 5 jul. 2017a.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. 2017. Contexto, Características e Estratégias de Conservação. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/caatinga/item/191>>. Acesso em: 6 jul. 2017b.

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

MOHAN KUMAR, N. S.; MANONMANI, H. K. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular l-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 577-587, abr. 2013.

MOHAN KUMAR, N. S. et al. Reduction of Acrylamide Formation in Sweet Bread with L-Asparaginase Treatment. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 3, p. 741-748, mar. 2014.

MORAES, A. M. L.; PAES, R. A., HOLANDA, V. L. Micologia. In: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010, v. 4, p. 399-496.

MOREIRA, B. A., WANDERLEY, M. D. G. L.; CRUZ-BARROS, M. A. V. Bromélias: Importância ecológica e diversidade. Taxonomia e morfologia. **Instituto de botânica – IBt**, São Paulo, p. 12, out. 2006.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Canada, 1995.

NAGARAJAN, A. et al. Screening and Isolation of Novel Glutaminase Free L-asparaginase from Fungal Endophytes. **Research Journal of Microbiology**, v. 9, n. 4, p.163-176, 2014.

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, mar. 2007.

NIHARIKA, Y. C.; SUPRIYA, S. Production of L-asparaginase by *Fusarium oxysporum* using submerged fermentation. **International journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 6, p. 32-39, 2014.

NOGUEIRA, A. C.; CÔRTEZ, I. MR.; VERÇOZA, F. C. A Família Bromeliaceae na Área de Proteção Ambiental de Grumari. **Natureza on line**, Rio de Janeiro, v. 9, n.2, p. 91-95, 2011.

NOMME, J. et al. Structures of apo and product-bound human L-asparaginase: insights into the mechanism of autoproteolysis and substrate hydrolysis. **Biochemistry**, v. 51, n. 34, p. 6816-6826. 2012.

NOVOZYMES. Award-winning Novozymes' solution enables acrylamide mitigation in even more product categories. 2013. Disponível em:
<<https://www.novozymes.com/en/news/news-archive/2013/11/new-novozymes-solution-enables-acrylamide-mitigation-in-even-more-product-categories-->>. Acesso em: 3 jan. 2018.

ORLANDELLI, R, C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

PALEM, P. P. C.; KURIAKOSE, G. C.; JAYABASKARAN, C. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. **PloS one**, v. 10, n. 12, 2015.

PARK, Y.-H. et al. Diversity of fungal endophytes in various tissues of *Panax ginseng* Meyer cultivated in Korea. **Journal of ginseng research**, v. 36, n. 2, p. 211–217, abr. 2012.

PATIL, M. P.; PATIL, R. H.; MAHESHWARI, V. L. A novel and sensitive agar plug assay for screening of asparaginase-producing endophytic fungi from *Aegle marmelos*. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, n. 2, p. 175-177, 2012.

PATRO, K. R.; GUPTA, N. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 3, n. 3, p. 30-34, jun. 2012.

PEDRESCHI, F.; KAACK, K.; GRANBY, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. **Food chemistry**, v. 109, n. 2, p. 386-392, jul. 2008.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, jul. 2004.

PIRES, I. M. O. et al. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma Floresta Tropical Seca no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p.155-161, 2015.

PONTES, R. A. S.; AGRA, M. F. Flora da Paraíba, Brasil: *Tillandsia* L.(Bromeliaceae).**Rodriguésia**, v. 57, n. 1, p. 47-61, 2006.

PRADO, D. E. 2003. As caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003, cap. 1, p. 3-73.

PRETSCH, A. et al. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of endophytic fungi *Talaromyces wortmannii* extracts against acne-inducing bacteria. **PloS one**, v. 9, n. 6, 2014.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, fev. 2011.

RANI, S. A.; SUNDARAM, L.; VASANTHA, P. B. Isolation and screening of L-asparaginase producing fungi from soil samples. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 279-82, 2012.

RIZZARI, C. et al. Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. **Current opinion in oncology**, v. 25, p. S1-S9, mar. 2013.

ROCHA, R. et al. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-78, jan/mar. 2009.

RODAL, M. J. N. et al. Fitossociologia do componente lenhoso de um refúgio vegetacional no município de Buíque, Pernambuco. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 517-526, 1998.

RODRIGUES, N. M.; MOTA FILHO, F. O.; PEREIRA, E. C. Impactos Ambientais Na Zona De Amortecimento Do Parque Nacional Do Catimbau, Pernambuco, Brasil. In: VI Seminário Latino-Americano de Geografia Física. Universidade de Coimbra, p. 1-13, 2010.

ROSA, R. S. et al. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da Caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (eds.). **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, 2003, cap. 3, p. 135-180.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

SANTOS, I. P. et al. Endophytic mycobiota from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae): The relationship between seasonal change in Atlantic Coastal Forest and tropical dry forest (Caatinga), Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 18, p. 1227-1235, mai. 2015.

SANTOS, L. S. et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 3, p. 539-548, 2008.

SANTOS, M. G. S. et al. Screening of endophytic fungi from cactus of the Brazilian tropical dry forest according to their L-asparaginase activity. **Sydowia**, v. 67, p. 147-156, 2015.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212. 2011.

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

SAXENA, R. K.; SINHA, U. L-asparaginase and glutaminase activities in the cultures filtrates of *Aspergillus nidulans*. **Current Science**, v. 50, p. 218-219, 1981.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, jun. 2005.

SHRIVASTAVA, A. et al. Kinetic studies of L-asparaginase from *Penicillium digitatum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2012.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas. **Instituto de Botânica– IBt**. São Paulo, 2006.

SILVA, R. L. O. et al. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta botânica brasílica**, v. 20, n. 3, p. 649-655, 2006.

SOLER, M. F. C. R. **Aspectos da produção de L-asparaginase por leveduras**. Lorena: 2015. 119 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na área de conservação de biomassa)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogensbentham*. **Acta amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, dez. 2003.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, v. 67, n. 2, p. 257-268. 2004

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural product reports**, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

THAKUR, M. et al. Isolation, Purification and Characterization of Fungal Extracellular L-Asparaginase from *Mucor Hiemalis*. **Journal of Biocatalysis & Biotransformation**, v. 2, n. 2, p. 1-9, 2013.

THEANTANA, T.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. **KMITL Science and Technology Journal**, v. 7, n. 1, p. 13-18, 2007.

THEANTANA, T.; HYDE, K. D.; LUMYONG, S. Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: citotoxicity properties. **International Journal of Integrative Biology**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2009.

THIRUNAVUKKARASU, N. et al. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. **Mycosphere**, v. 2, n. 2, p. 147-155, 2011.

TING, A. S. Y. et al. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. **BioControl**, v. 53, n. 3, p. 541-553, jun. 2008.

UNTERSEHER, M.; PETZOLD, A.; SCHNITTLER, M. Xerotolerant foliar endophytic fungi of *Populus euphratica* from the Tarim River basin, Central China are conspecific to endophytic ITS phylotypes of *Populus tremula* from temperate Europe. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 133-142, mai. 2012.

UZMA, F.; NARASIMHA MURTHY, K.; SRINIVAS, C. Optimization of physiological conditions for L-asparaginase production by endophytic fungi (*Fusarium solani*) isolated

from *Tinospora cordifolia* (Willd.) Hook. F & Thomson. **European Journal of Experimental Biology**, v. 6, n. 3, p. 37-45, 2016.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. J. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* mtcc 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation. **International Journal of Research in Engineering and Technology**, v. 2, n. 09, p. 121-129, set. 2013.

VASCONCELOS, G. C. L., MELO, J. I. M. Flora do Parque Nacional do Catimbau, PE, Brasil: Loranthaceae. **Hoehnea**, v. 43, n. 2, p. 317-323, 2016.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. Ecorregiões propostas para o Bioma caatinga. Associação Plantas do Nordeste, Instituto de Conservação Ambiental, e The Nature Conservancy do Brasil, Recife, 2002.

VERMA, N. et al. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. **Critical reviews in biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 45-62, 2007.

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

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZYZAK, David V. et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4782-4787, 2003.

ZUO, S. et al. Reduction of acrylamide level through blanching with treatment by an extremely thermostable l-asparaginase during French fries processing. **Extremophiles**, v. 19, n. 4, p. 841-851, jul. 2015.