



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

MARÍLIA GOMES DA SILVA SANTOS

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACTACEAE QUANTO À
CAPACIDADE DE PRODUZIR L-ASPARAGINASE**

RECIFE

2014

MARÍLIA GOMES DA SILVA SANTOS

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACTACEAE QUANTO À
CAPACIDADE DE PRODUZIR L-ASPARAGINASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientador: Prof^a. Dra. Cristina Maria de Souza Motta

RECIFE

2014

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Santos, Marília Gomes da Silva
Seleção de fungos endofíticos de cactaceae quanto à capacidade de produzir L-asparaginase. / Recife: O Autor, 2017.

59 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Cristina Maria de Souza Motta

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2017.

Inclui referências

- 1. Fungos 2. Cactos 3. Agentes antineoplásicos I. Motta, Cristina Maria de Souza (orient.) II. Título**

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 470

MARÍLIA GOMES DA SILVA SANTOS

**SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE CACTACEAE QUANTO À
CAPACIDADE DE PRODUZIR L-ASPARAGINASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Cristina Maria de Souza-Motta – (Orientador)
(UFPE – Universidade Federal de Pernambuco)

Dr^a. Laura Mesquita Paiva
(UFPE – Universidade Federal de Pernambuco)

Dr^o. Cledir Rodrigues Santos
(UMINHO – Universidade do Minho)

Dedico a Ti Senhor Deus autor da minha vida a quem tanto amo toda honra e glória seja dada a Ti, aos meus pais *Marceli Gomes* e *Jeosafá Santos*, aos meus queridos tios *Vicente Souza* e *Etiene Gomes* e ao meu irmão *João Vitor*, amo vocês.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por ser autor da minha vida, dono do meu viver, por todas as bênçãos derramadas sobre mim, inclusive a conclusão deste trabalho por que sem Ele não conseguiria chegar onde estou e ser o que sou. “Assim, ao Rei eterno, imortal, invisível, Deus único, honra e glória pelos séculos dos séculos. Amém!” 1Timóteo 1:17. Diz o Senhor: “Meu é o conselho e a verdadeira sabedoria, eu sou o Entendimento, minha é a fortaleza.” Provérbios 8:14.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP-01.08.0392.00) e a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE APQ-0583-2.12/10), pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

Agradeço aos professores e estudantes do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da UFPE pela contribuição no conhecimento e toda ajuda prestada.

Agradeço à minha orientadora querida Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta pela confiança, agradeço ao Centro de Ciências Biológicas da UFPE, Departamento de Micologia da UFPE e aos membros do Laboratório de Pesquisa da Coleção de Culturas – Micoteca URM , Profa. Maria José, Profa. Débora, Profa. Eliane, Prof. Bruno, Luan, Renan, Suzanna, Ana. Agradeço à co-orientação de Ana Lúcia Figueiredo Porto pelo apoio.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Jadson Bezerra, Dianny Pinheiro, Aline Julião, Gianne Rizzuto, Karla Freire, Virginia Svedese, Greicilene Rodrigues, Ana Lúcia, Diogo Lopes, Daniela Bounafina, Pamela Ximenes, Minelli Sousa, Marcela e a todas as meninas de iniciação científica, agradeço por toda ajuda dada durante todo o tempo, somos e trabalhamos em equipe, louvo a Deus pela vida de cada um, em especial a Profa. Laura Mesquita por me estender a mão na micologia e por todo seu amor que recebo em sua presença, sou extremamente grata.

Agradeço a minha família: minha mãe Marcella Gomes ‘minha guerreira’ mulher sábia que Deus escolheu para cuidar de mim, ao meu pai Jeosafá Santos, pelo incentivo e força, meus tios Vicente Souza e Etienne Gomes são meus segundos

pais meus anjos na fé e ao meu irmão João Vitor, amo vocês. Aos meus parentes minha vózinha querida por todas as orações.

A todos os meus irmãos e pais na fé: Ademir e Lilian, Adriana Frazão (minha irmã), Thiala Félix, Andrezza Lins, a todos do grupo de louvor em especial Andre Belo, Patricia Ferreira, Luan Sharegan, Diogo Andrade, Georgia Kyrillos, Jetro Rodrigues, Gisele e Marcus Belo, por todas as orações, apoio e força.

Aos meus amigos queridos: Manuela Novaes, Marina Novaes, Rafaela Portella, Rodrigo Monteiro, André Oliveira, Leandra Vasconcelos, Priscila Ramos, Priscila Moreira, Nelânia Baptista e Alexandra que estão comigo desde a graduação, Rafael Beserra, Geyse Raquel, Ilanne Macedo, Ilanne Macedo, Marcela Almeida, Carla Baltar, Carla Borba, Profa. de ballet Andrea Oliveira e todas meninas do Ballet, agradeço por todo apoio e força por essa conquista.

RESUMO GERAL

A L-asparaginase é uma enzima usada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer humano. Atualmente, busca-se outras fontes produtoras de L-asparaginase para diminuir os efeitos colaterais ocasionados pela utilização dessa substância quando sintetizada por bactérias. Estudos utilizando fungos endofíticos tem sido realizados, contudo, não há relatos sobre a produção de L-asparaginase por esses fungos no Brasil. Fungos endofíticos foram isolados do cacto mandacaru (*Cereus jamacaru*) e depositados na Micoteca URM. Para a seleção quanto a produção de L-asparaginase, foram utilizados 44 isolados. Em meio sólido, foi observada a formação de um halo ao redor da colônia fúngica, indicando a capacidade de produção de L-asparaginase. A produção em meio líquido, foi realizada inculando as culturas de fungos em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de Czapek Dox's modificado (CDM) e incubados a 30 °C e 120 rpm durante 5 dias. Dos 44 fungos endofíticos estudados, 30 apresentaram halo de degradação, e 19 produziram L-asparaginase em meio líquido. *Aspergillus ochraceus* URM 6885, *A. japonicus* URM 6872, *A. terreus* URM 6888, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 e *Penicillium brevicompactum* URM 6833, são os fungos endofíticos que possuem maior habilidade para síntese da L-Asparaginase em meio líquido e por isso são indicados para estudos mais detalhados de produção desta enzima.

Palavras-chave: Enzima Antitumoral. Endófitos. Cactos.

ABSTRACT

The L-asparaginase is an enzyme used as a chemotherapeutic agent for the treatment of human cancer. There is a search for other sources of producing L-asparaginase to decrease the side effects caused by use of this substance as those synthesized by bacteria. Studies using endophytic fungi have been performed, however, no reports on the production of L-asparaginase by these fungi in Brazil, which holds great biological diversity. Endophytic fungi were isolated cactus mandacaru (*Cereus jamacaru*) and presented at the URM Culture Collection. For selection for of production of L-asparaginase, 44 isolates were used. In a solid medium, the formation of a halo around the fungal colony was observed, indicating the ability of producing L-asparaginase. The production in liquid medium was carried inculando cultures of fungi in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of Dox's modified Czapek (CDM) and incubated at 30 ° C and 120 rpm for 5 days. Of the 44 endophytic fungi studied, 30 showed degradation halo, and 19 produced L-asparaginase in a liquid medium. *Aspergillus ochraceus* URM 6885, *A. japonicus* URM 6872, *A. terreus* URM 6888, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 and *Penicillium brevicompactum* URM 6833 are endophytic fungi which have a greater ability for the synthesis of L-asparaginase in a liquid medium and thus are indicated to more detailed studies of this enzyme production.

Keywords : Antitumor Enzyme. Endophytes. Cacti.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - *Cereus jamacaru*..... 30

Figura 2 - Atividade de L-asparaginase em meio sólido. (a) Placa controle (b) Placa sem atividade da espécie *Aspergillus niger* URM 6870. Placas com atividade enzimática: (c) *Acremonium pteridii* URM 6838; (d) *Cladosporium cladosporioides* URM 6859; (e) *Cladosporium sphaerospermum* URM 6862; (f) *Penicillium aurantiogriseum* URM 6844; (g) *Penicillium chrysogenum* URM 6831; (h) *Giberella jugikuroi* var. *fugikuroi* URM 6816; (i) *Fusarium oxysporum* URM 6704; (j) *Penicillium brevicompactum* URM 6833; (k) *Curvularia lunata* URM 6861; (l) *Aspegillus parasiticus* URM 6867..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos endofíticos isolados do cacto <i>C. jamacaru</i> depositados na Micoteca URM, UFPE, Brasil.....	32
Tabela 2 - Índice enzimático e atividade enzimática de L-asparaginase em meios sólido e líquido de fungos endofíticos isolados do cacto <i>Cereus jamacaru</i>.....	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Fungos Endofíticos	14
2.2 Cactaceae	17
2.3 Caatinga	20
2.4 L-Asparaginase	20
2.4.1 Produção de L-asparaginase por fungos	24
3 CAPÍTULO I	27
Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de cacto da floresta tropical seca brasileira	27
RESUMO	27
INTRODUÇÃO	27
MATERIAL E MÉTODOS	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	40
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos endofíticos são definidos como aqueles que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfestados superficialmente, e que não causam danos ao hospedeiro (Hallmann *et al.* 1997) e podem desempenhar um papel importante na sobrevivência das plantas, melhorando a absorção de nutrientes (Gasoni & Gurfinkel, 1997; Malinowski *et al.* 1999), desenvolvimento e produção de metabólitos promotores do crescimento, como giberelinas (Choi *et al.* 2005; Rim *et al.* 2005) e auxinas (Dai *et al.*, 2008), auxiliando na adaptabilidade ecológica do hospedeiro por incrementar a tolerância a estresses bióticos e abióticos (Strobel *et al.* 1996). Os fungos endofíticos são conhecidos pela sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas, que por sua vez, podem ser tóxicas (micotoxinas) ou serem utilizadas como fármacos contra patógenos, em consequência da grande diversidade de compostos de importância econômica que produzem (Hyde & Soyong, 2008; Theantana *et al.* 2007, 2009; Xu *et al.* 2010; Qui *et al.* 2012).

Trabalhos referentes à avaliação da microbiota endofítica de Cactaceae são ainda muito escassos (Bills, 1996). Foram realizados estudos preliminares sobre fungos endofíticos associados à *Opuntia stricta* (Palma) de regiões semi-áridas da Austrália (Fisher *et al.* 1994) e em cactos do Arizona no Estados Unidos (Suryanarayanan *et al.* 2005). Bezerra *et al.* (2012) relataram os primeiros resultados de fungos endofíticos associados a *Opuntia ficus-indica* no nordeste do Brasil e demonstraram a capacidade desses fungos na produção de compostos de interesse industrial, como enzimas hidrolíticas extracelulares para indústrias de papel, alimentos e têxtil. Bezerra *et al.* (2013) também acessaram a diversidade de endófitos associados a *Cereus jamacaru* e demonstraram tamanha micodiversidade associada ao cacto crescendo na floresta tropical seca brasileira (Caatinga), sugerindo ser uma comunidade de fungos altamente diversificada e rica para biotecnologia.

A L-Asparaginase (L-asparagina amidohidrolase, E.C.3.5.1.1) é uma enzima utilizada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer humano e foi descoberta em 1953 por Kidd (Capizzi *et al.* 1984). A prática terapêutica mais comum é injetar a enzima livre por via intravenosa, a fim de diminuir a concentração

sanguínea de asparagina. Sua ação catalítica transforma o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, privando as células malignas desse nutriente essencial e inibindo a síntese de proteínas constitutivas além de proteínas regulatórias fundamentais como as do ciclo celular, e proteínas anti-apoptóticas, resultando em morte celular (Mitchell *et al.* 1994, Avramis, 2006; Patro & Gupta, 2012).

A L-Asparaginase está presente em vários organismos, incluindo animais, micro-organismos e plantas, no entanto, não é encontrada em seres humanos. Embora a L-Asparaginase seja encontrada em várias espécies de plantas e animais, devido à dificuldade no processo de extração desta enzima, outras fontes potenciais, como fungos e bactérias têm-se mostrado fontes eficazes e de baixo custo desta enzima (Kumar *et al.* 2013). Leveduras e fungos filamentosos têm sido relatados como grande potencial para a produção de asparaginase com menores efeitos colaterais ao ser humano (Sarquis *et al.* 2004; Imada *et al.* 1973; Elshafei *et al.* 2012; Shrivastava *et al.* 2012). Fungos endofíticos foram relatados como produtores de L-asparaginase por Theantana *et al.* (2007, 2009) em estudo com plantas medicinais da Tailândia. Os autores verificaram que os principais gêneros produtores dessa enzima foram *Colletotrichum*, *Eupenicillium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Talaromyces*. Sarquis *et al.* (2004) relataram a produção de L-asparaginase por *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Quando estudaram algas marinhas Thirunavukkarasu *et al.* (2011) também verificaram que a enzima é secretada por endófitos dos gêneros *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Phaeotrichoconis*, *Phoma* e *Pithomyces*.

No Brasil poucos estudos verificaram a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos (Loreiro *et al.* 2012) e atualmente não se tem estudos sobre a produção desta enzima por fungos endofíticos isolados de cactos. Neste contexto, o presente estudo objetivou selecionar fungos endofíticos do cacto *Cereus jamacaru*, promissores para a produção de L-asparaginase, avaliando em meio sólido e líquido e comparando seus resultados, indicando os melhores produtores desta enzima, a fim de contribuir com a implementação do Banco de Fungos com Interesse Biotecnológico da Micoteca URM da UFPE.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fungos Endofíticos

Os micro-organismos endofíticos são definidos como aqueles que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfestados superficialmente, sem causar danos ao hospedeiro (Hallmann *et al.* 1997), e sem produzir estruturas externas que emergem na superfícies das plantas, que podem ou não podem crescer em meio de cultura (Azevedo & Araújo, 2007).

Estes micro-organismos passam todo ou parte de seu ciclo de vida colonizando tecidos de plantas hospedeiras sem causar sintomas aparentes de doença (Schulz & Boyle, 2006; Strobel *et al.* 2004; Tan & Zou, 2001). Endófitos podem também interagir com seus hospedeiros, aumentando o seu crescimento e melhorando a sua resistência a estresses ambientais (Clay, 1988; Wolock-Madej & Clay, 1991; Knoch *et al.* 1993) ou a sua capacidade para resistir a ataques de herbívoros e fungos patogênicos e animais além de produzir fito-hormônios, enzimas e outros compostos químicos, proporcionando vantagens para a planta hospedeira (Faeth & Fagan, 2002; Clay, 1990; Leuchtmann *et al.* 2000; Azevedo *et al.* 2000).

Os fungos endófitos podem desempenhar um papel importante na sobrevivência das plantas, melhorando a absorção de nutrientes (Gasoni & Gurfmkel, 1997; Malinowski *et al.* 1999), desenvolvimento e produção de metabólitos de promoção do crescimento (Chandra *et al.* 2012), como giberelinas (Choi *et al.* 2005; Rim *et al.* 2005) e auxinas (Dai *et al.* 2008), e eles também podem se tornar um novo e recurso importante para a degradação de policíclico hidrocarbonetos aromáticos (PAH), uma classe tóxica de poluentes ambientais (Dai, *et al.* 2010). Quando a colonização resulta em proteção de tecidos vegetais por estresses bióticos ou abióticos, estes fungos são chamados mutualísticos (Latch, 1993; Saikkonen *et al.* 2010; Vesterlund *et al.* 2011), como ambos se beneficiando dessa interação (Wang & Dai, 2011), melhorando a adaptabilidade ecológica do hospedeiro (Strobel *et al.* 1996).

A microbiota endofítica têm sido descrita pela sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de moléculas bioativas, como protetora contra o ataque de outros micro-organismos, insetos, e animais herbívoros, devido à

produção de toxinas ou serem utilizadas como fármacos contra patógenos em consequência da grande diversidade de compostos de importância econômica que produzem (Albrechtsen *et al.* 2010; Tan & Zou, 2001; Chandra, 2012; Hyde & Soyong, 2008; Theantana *et al.* 2007, 2009; Xu *et al.* 2010; Qui *et al.* 2012; Suryanarayanan, 2013). Podem ainda produzir fármacos, imunossuppressores, antitumorais, compostos de interesse biotecnológico e outros compostos químicos, enquanto se desenvolvem no hospedeiro. No entanto, sob condições de estresse, podem tornar-se patogênicos (Azevedo, 1998; Azevedo *et al.* 2000). Clay & Schardl (2002), afirmam que os endófitos podem tornar as plantas hospedeiras resistentes à seca, inundações e estresse, bem como proporcionam um reforço nas habilidades competitivas e alteração em propriedades fisiológicas (Stamford *et al.* 2002; Suto *et al.* 2002; Strobel & Daisy, 2003). Os estudos sobre fungos endofíticos de plantas são necessários para fornecer informações fundamentais para a avaliação da diversidade global fúngica e de distribuição, bem como para a descoberta de novas espécies que pode ser promissoras para estudos biotecnológicos (Stone *et al.* 2004; Siqueira *et al.* 2008). Atualmente, quase todas as plantas hospedeiras estudadas tiveram micro-organismos endofíticos isolados (Wang & Dai, 2011).

Micro-organismos endofíticos produzem enzimas extracelulares hidrolíticas como parte de seu mecanismo de resistência em superar as defesas do hospedeiro contra a invasão microbiana e/ou para obter nutrientes do solo (Tan & Zou, 2001). Estas enzimas incluem esterases, pectinases, celulases, lipases, proteases e xilanases (Petrini *et al.* 1992; Silva *et al.* 2006; Suto *et al.* 2002). Como uma forma de estabelecer o papel funcional de fungos endofíticos, entre outros fatores, há uma necessidade de uma detecção das enzimas extracelular (Carroll & Petrini, 1983).

Muitos estudos têm relatado que as plantas são colonizadas por dezenas de endófitos. Uma árvore em uma floresta tropical ou mesmo uma única folha pode abrigar uma grande diversidade de espécies de fungos, mostrando sua importância na estimativa de diversidade de fungos (Arnold *et al.* 2000; Saikkonen *et al.* 2004). Endófitos podem ocupar uma infinidade de nichos biológicos únicos, como por exemplo, plantas superiores (Strobel & Daisy, 2003), pteridófitas (Sati *et al.* 2009) e líquens (Li *et al.* 2007). Eles também são evidentes em muitos ambientes incomuns, tais como raízes de orquídeas terrestres, plantas marinhas, gramíneas, algas (Strobel & Daisy, 2003; Raghukumar, 2008; Sánchez Márquez *et al.* 2008; Tao *et al.*

2008), musgos (Jakucs *et al.* 2003; Davey & Currah, 2006), samambaias (Swatzell *et al.* 1996), plantas arbustivas (Barrow *et al.* 2004; Olsrud *et al.* 2007) decíduas e coníferas (Guo *et al.* 2008; Albrechtsen *et al.* 2010; Mohamed *et al.* 2010). Fungos endofíticos existem amplamente dentro de tecidos vegetais e são ricos em diversidade de espécies (Gennaro, 2003; Li *et al.* 2007). Têm sido associados com plantas de mais de 400 milhões de anos (Krings *et al.* 2007).

Os fungos endofíticos têm sido considerados como presente em todo o reino vegetal (Hyde & Soyong, 2008; Oses *et al.* 2008; Fröhlich *et al.* 2000; Sánchez *et al.* 2010; De Errasti *et al.* 2010; Tejesvi *et al.* 2010), em virtude de na maioria das pesquisas realizadas até recentemente, terem sido encontrados em todas as espécies de plantas examinadas utilizando plantas de regiões temperadas (Azevedo *et al.* 2000).

Dentre as mais de 300 mil espécies de plantas existentes no planeta, poucas foram estudadas quanto a sua microbiota endofítica. A oportunidade de encontrar micro-organismos produtores de substâncias orgânicas que contribuem para relação endofítico-hospedeiro é importante e oferece a descoberta de novos compostos bioativos úteis para a indústria, agricultura e medicina (Strobel *et al.* 2002).

Os fungos estão entre os mais importantes grupos de organismos eucarióticos que estão a ser exploradas para aplicações clínicas. Os fármacos existentes de origem fúngica incluem antibióticos, b-lactâmicos, griseofulvina, ciclosporina A, taxol, alcalóides da cravagem do centeio e lovastatina. Novos produtos naturais de estruturas químicas variadas são continuamente encontrados a partir de fungos (Grabley & Sattler, 2003; Mitchell *et al.* 2008; Stadler & Keller, 2008). A capacidade sintética versátil dos fungos reflete no heterotrofismo e o modo de alimentação e a capacidade de explorar uma variedade de substratos e habitats (Hyde, 2005; Suryanarayanan *et al.* 2005). Conhecemos apenas cerca de 7% dos mais de 1,5 milhão de espécies de fungos (Hawksworth, 2004), e poucos desses foram cultivados e selecionados para a produção de biomoléculas. Estudos sobre a potencialidade dos micro-organismos endofíticos, principalmente das relacionadas à descoberta de novas substâncias, mostram-se relevantes tanto para uso no controle de doenças e pragas, como para aplicação no setor biotecnológico ou indústria farmacêutica.

Os fungos endofíticos têm demonstrado ser uma das mais importantes fontes de novos metabólitos secundários (Strobel *et al.* 2004; Zhang *et al.* 2006; Chandra, 2012). Investigações detalhadas da microbiota interna de plantas e de fungos endofíticos de vegetais bem caracterizados e economicamente importantes, frequentemente revelam novos táxons e novas distribuições das espécies já conhecidas. Estudos sobre fungos endofíticos são necessários para fornecer informações fundamentais para a avaliação da diversidade e distribuição fúngica global (Stone *et al.* 2004). Pelo fato dos endofíticos serem inconspícuos, a diversidade de espécies da microbiota interna ser relativamente alta e uma pequena porção de potenciais hospedeiros terem sido até então examinados, endófitos representam um número substancial de fungos ainda não descobertos (Arnold *et al.*, 2000; Siqueira *et al.* 2008). Devido à elevada diversidade de fungos endofíticos (Arnold & Lutzoni, 2007; Hyde & Soyong, 2007, 2008) e sua capacidade de produzir vários produtos químicos bioativos (Aly *et al.* 2010; Xu *et al.* 2010) o torna-se uma das mais importantes pesquisas concentradas na área da micologia.

2.2 Cactaceae

Os cactos são dicotiledôneas suculentas de hábitos diversos, que podem ser árvores, arbustos, trepadeiras, epífitas ou geófitas; suas hastes (talos) podem ser colunares, roliços, globulares, tuberculados, em forma de costeletas, asas ou achatados, geralmente segmentados sem folhas e com espinhos. A família é composta de quatro subfamílias: Maihuenioideae, Pereskioideae, Opuntioideae e Cactoideae (Taylor e Zappi, 2008), 130 gêneros e 1500 espécies, distribuídas quase exclusivamente nas regiões secas das Américas (Mohamed-Yasseen *et al.* 1996).

As cactáceas são as plantas mais conspícuas e características de regiões áridas quentes, são notáveis não apenas por sua diversidade de formas de crescimento e sua capacidade de crescer, mas para prosperar em ambientes reconhecidos como estressante para a maioria das plantas. Os cactos podem ser usados para evitar a erosão do solo e atuar como uma cerca viva eficaz para a recuperação de terras e funcionar como cultura comercial com atributos únicos. As cactáceas não necessitam de muita água e, conseqüentemente, exibem incomum características fisiológicas e morfológicas (Scheinvar, 1995; Le Houerou, 2000).

Também são conhecidos por conter vários compostos químicos úteis tendo propriedades nutricionais e medicinais desejáveis, apresentam também grande potencial como fonte de substâncias de uso medicinal, cosmético e alimentício (Biavatti *et al.* 2007; Mariath *et al.* 2009; Fernández-López *et al.* 2002; Alarcon-Aguilar *et al.* 2003; Galati *et al.* 2003; Oliveira & Da Machado, 2003; Gentile *et al.* 2004; Sirivardhana & Jeon, 2004; Tesoriere *et al.* 2004; Zou *et al.* 2005; Salim *et al.* 2006).

O cacto *Cereus jamacaru* DC. é conhecido popularmente como mandacaru, (Zappi & Aona, 2007). É uma planta típica do Brasil, sendo um vegetal comum em praticamente todo o nordeste brasileiro, ocorrendo nos estados da Bahia, Maranhão, Pernambuco, Sergipe e também em Minas Gerais (Zappi & Aona, 2007). Pode chegar a 10 metros de altura, possui tronco lenhoso, que é utilizado na fabricação de caixas, porta-retratos, portas e janelas (Britton & Rose, 1919), com muitas hastes eretas, formando topo compacto, as hastes novas são azuladas e possuem de 4 a 6 costelas de ápices obtusos, separados por sulcos profundos, em áreas abertas podem apresentar apenas com uma única haste. As aréolas são circulares distantes de 2 a 5 cm entre si, sendo maiores no tronco principal, com espinhos são radiais, podem ter de 9 a 30 cm de comprimento, sendo os centrais maiores; podem ter coloração amarela, avermelhada ou marrom (Scheinvar, 1985; Britton & Rose, 1919), possuem flores são solitárias, noturnas, laterais a subapicais, brancas e frutos elipsóides alaranjado ou vermelho-claro polpa branca, aroma suave, comestível, doce (Scheinvar, 1985). É extremamente rústico, cresce nas catingueiras arbóreas e em locais quase desprovidos de solos, e se multiplica regularmente, cobrindo extensas áreas da caatinga (Lima, 1996).

O mandacaru é utilizado principalmente na alimentação de ruminantes nos longos períodos de seca que ocorrem na região nordeste (Cavalcanti & Resende, 2006). Os seus frutos servem de alimentos para pássaros e animais silvestres da Caatinga (Cavalcanti & Resende, 2007), e são bastante apreciados pela população (Barbosa, 1998), sendo inclusive uma alternativa para a fabricação de vinho (Almeida *et al.* 2006). A sua polpa, de acordo com Pimentel Gomes (2007), é doce e comestível e pode ser utilizada na alimentação humana (Salema, 1966; Albuquerque & Andrade, 2002; Silva *et al.* 2005a; Estrada-Luna *et al.* 2008).

O uso medicinal popular é pouco difundido, diz-se que as raízes e o caule são diuréticos. Toda a planta é usada no combate ao escorbuto e nas infecções do aparelho respiratório (Scheinvar, 1985; Agra *et al.* 2007; 2008). Dentre as substâncias químicas identificadas no mandacaru está a tiramina, conhecida por sua atividade simpatomimética e provável responsável pela atividade cardiotônica (Brhun; Lindgren, 1976).

As certezas climáticas no Nordeste tornam as cactáceas uma alternativa alimentar e uma fonte de água para os animais na época seca. No Brasil, o ecossistema Caatinga, região natural exclusiva, apresenta uma floresta sazonalmente seca que cobre a maior parte dos estados do Nordeste e a parte de Minas Gerais (Tabarelli & Silva, 2003). Dentre os vegetais, destaca-se a família Cactaceae, pois das 160 espécies registradas, 41 são endêmicas da Caatinga (Taylor & Zappi, 2002). É nesse ambiente que o *C. jamacaru* apresenta ampla e abundante distribuição (Meiado *et al.* 2010).

Cavalcanti & Resende (2004), avaliando a utilização das plantas nativas da Caatinga por pequenos agropecuaristas em cinco comunidades da Bahia e de Pernambuco, registraram que o mandacaru é utilizado por 46,52% deles, enquanto o facheiro é utilizado por 12,28%, o xiquexique por 10,51% e a coroa-de-frade por 6,96%, para alimentação dos animais no período de seca.

Poucos trabalhos verificam a associação endofítica com plantas de ambientes áridos, semiáridos e/ou desérticos, eles têm demonstrado a importância de conhecimento da comunidade endofítica dessas plantas. A partir das observações, algumas hipóteses sobre a relação micro-organismos-planta hospedeira têm sido levantadas, estimulando o estudo dos cactos e a associação com os micro-organismos endofíticos.

O primeiro trabalho verificando a associação de fungos endofíticos e cactos, foi realizado por Fischer *et al.* (1994) na Austrália, quando estudaram a composição da comunidade endofítica fúngica de *Opuntia stricta* (Haw.), seguido por Suryanarayanan *et al.* (2005) que verificaram a comunidade endofítica fúngica de 21 espécies de cactos ocorrendo em várias localidades do Arizona, e mais recentemente no Brasil, Bezerra *et al.* (2012; 2013) verificaram a ocorrência de fungos endofíticos em *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., cultivada em larga escala em regiões semiáridas da Caatinga, e em *C. jamacaru*.

2.3 Caatinga

A Caatinga é o principal ecossistema da região nordeste do Brasil com a maior formação de vegetação seca, são pouco conhecidas do ponto de vista ecológico (Pereira *et al.* 2001), cerca de 6,83% do território nacional (Pereira *et al.*, 1989; Araújo, 1996). Na cobertura vegetal das áreas da região Nordeste, a Caatinga representa cerca de 800.000 Km², o que corresponde a 70% da região, sendo que aproximadamente 50% das terras recobertas com a Caatinga são de origem sedimentar e ricas em água subterrânea (Maracajá e Benevides, 2006).

A vegetação da Caatinga ocorre em faixas descontínuas, estando fortemente marcada pela influência de uma estação chuvosa curta e uma estação seca mais prolongada, limitando o crescimento das plantas, regulando muitos processos ecológicos, por causa de sua variabilidade no tempo e espaço e da imprevisibilidade dos eventos de chuva. (Lázaro *et al.* 2001; Schwinning & Sala, 2004; Sher *et al.* 2004).

Devido às características bióticas da Caatinga e à exploração de seus recursos vegetais de forma não sustentável, este ecossistema vem passando por modificações como a diversificação da agricultura e da pecuária bovina e o aumento da extração de lenha para produção de carvão (Zanetti, 1994). No entanto a eliminação sistemática da cobertura vegetal e o uso indevido das terras têm acarretado graves problemas ambientais, entre os quais se destacam a redução da biodiversidade, a degradação dos solos e o comprometimento dos sistemas produtivos (Brasil, 1995; Brasil, 1991; Japan, 1990).

2.4 L-asparaginase

A L-asparaginase (E.C.3.5.1.1) é a enzima responsável por catalisar a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina resultando em ácido aspártico e amônia, ou seja, catalisa a hidrólise do grupo amino da cadeia lateral do aminoácido convertendo em ácido, portanto a L-asparaginase é também denominada L-asparagina amino hidrolase (Narta *et al.* 2007; Verna *et al.* 2007).

Clementi (1922) relatou a presença da atividade de L-asparaginase no soro de cobaia, mas apenas foram reconhecidos algum tempo mais tarde, quando

Broome (1961) descobriu que a regressão de transplantes linfossarcoma em ratos tratados com soro de cobaia (Kidd, 1953) foi devido à dependência nutricional das células malignas por L-asparagina. Mashburn & Wriston (1963) em seus estudos, purificaram a enzima L-asparaginase produzida pela bactéria *Escherichia coli* e verificaram que esta enzima possuía o mesmo efeito terapêutico daquela procedente do soro de cobaias. Os autores estimularam a produção em larga escala possibilitando a realização dos primeiros testes clínicos. Os primeiros pesquisadores a demonstrarem a eficácia terapêutica da enzima em humanos com leucemia foram Oettgen *et al.* (1967) e Hill *et al.* (1967). Além disso, a L-asparaginase de *Escherichia coli* foi utilizada para diminuir o crescimento do linfossarcoma 6C3HED (Rowley & Wriston, 1963; Eremenco, Evseev & Nikolaiev, 1968; Wade *et al.* 1968; Peterson & Ciegler, 1969a; Yamada, 1970; Boyd & Phillips, 1971; Tosa *et al.* 1971). Reddy *et al.* (1969) relataram que a L-asparaginase de *Mycobacterium tuberculosis* suprimiu ascites sarcoma em ratos. De-Angeli *et al.* (1970) verificaram que a L-asparaginase de *Aspergillus terreus* suprimiu carcinoma Walker 256 ascite em ratos. Peterson & Ciegler (1969 b) e Wade *et al.* (1971) pesquisaram as atividades L-asparaginase de inúmeras bactérias e encontram uma ampla distribuição.

L-asparaginase é também um agente anti-neoplásico, utilizada em quimioterapias contra o câncer, como a leucemia linfoblástica aguda (principalmente em crianças) e linfossarcoma, (Muller & Boos, 1998; Avramis & Panosyan, 2006), doença de Hodgkin, leucemia mielóide aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, tratamento linfossarcoma, reticulosarcoma e melanossarcoma (Verna *et al.* 2007). Em certas linhagens de células leucêmicas, a baixa concentração de outra enzima, a L-asparagina sintetase, faz com que estas células sejam incapazes de produzir L-asparagina suficiente e, portanto, dependentes de uma fonte extracelular desse aminoácido. A degradação da L-asparagina bloqueia a síntese proteica, ocasionando a morte celular por apoptose (Keating *et al.* 1993),

A L-asparaginase tem sido encontrada em muitos mamíferos, algas, plantas e espécies de bactérias, fungos e leveduras, sendo que sua melhor fonte são os micro-organismos, por ser facilmente sintetizada, extraída e purificada a partir deles, facilitando a produção em larga escala, mas apenas as enzimas a partir de *E. coli* e

Erwinia chrysanthemi foram produzidas em escala industrial (Savitri *et al.* 2003; Sarquis *et al.* 2004; Kumar *et al.* 2013).

Embora os medicamentos de ambas as fontes tenham mecanismos idênticos de ação e de efeitos tóxicos, as suas propriedades farmacocinéticas são diferentes e os pacientes alérgicos são frequentemente resistentes a um fármaco ou outro. Apesar da terapia do câncer ser importante, a utilidade clínica da L-asparaginase é muitas vezes limitada por três fatores: a grande variedade de efeitos colaterais associados com a administração de L-asparaginase, incluindo imunossupressão e pancreatite (Wang *et al.* 2003), os efeitos tóxicos caem em duas categorias principais, aqueles relacionados a sensibilização imunológica de uma proteína estranha e as relacionadas com a inibição da síntese de proteínas (Wang *et al.* 2003); cerca de 10% dos pacientes tratados com sucesso sofrem uma recaída, com o aparecimento de tumores que são resistentes à terapia adicional de L-asparaginase; o tratamento prolongado com L-asparaginase pode melhorar o crescimento de tumores resistentes e aumentar a sua atividade metastática (Woo *et al.* 2000; Haskel *et al.* 1969; Arima *et al.* 1972).

Apesar da quantidade considerável de pesquisas em andamento, a base molecular de resistência à L-asparaginase, que é um problema clínico importante, continua a ser mal entendida (Asselin, 1999). Dois mecanismos possíveis para a resistência à L-asparaginase foram propostos por Woo *et al.* (2000). A primeira é relativa a um aumento nos níveis de síntese de L-asparagina, que foi encontrada nos blastos de pacientes com leucemia linfoblástica aguda clinicamente resistente ao fármaco (Asselin, 1999). Outro mecanismo parece ser a indução de uma resposta do hospedeiro que leva à produção de anticorpos anti-asparaginase, que neutralizam L-asparaginase e impedem a sua atividade enzimática (Chakrabarti & Schuster, 1997).

A prática terapêutica mais comum é injetar a enzima por via intravenosa livre a fim de diminuir a concentração no sangue de L-asparagina e afetar seletivamente as células neoplásicas (Mitchell *et al.* 1994). No entanto, a L-asparaginase de origem bacteriana pode provocar hipersensibilidade quando utilizada a longo prazo, conduzindo a reações alérgicas e anafilaxia, reação alérgica como erupção cutânea, dificuldade de respirar, diminuição da pressão arterial, sudorese ou perda de consciência (Reynolds & Taylor, 1993; Sarquis *et al.* 2004). A busca por outras

fontes de L-asparaginase, como micro-organismos eucarióticos, pode levar a uma enzima com menos efeitos adversos.

Principais espécies de bactérias relatadas para produzir L-asparaginase incluem: *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*, *Estafilococos*, *Thermus aquaticus*, *T. pyriformis*, *Pseudomonas ovalis* e *Serratia marcescens* (Dey *et al.* 1988; Duval *et al.* 2002; Savitri *et al.* 2003; Sarquis *et al.* 2004, dentre outros).

Escherichia coli e *Erwinia chrysanthemi* são as principais fontes de L-asparaginase, que têm mecanismos de ação idênticos, mas propriedades farmacocinéticas diferentes. A L-asparaginase de *E. coli* induz maiores alterações na coagulação, mas mostrou-se ser superior a sintetizada por *Erwinia chrysanthemi* no tratamento de doenças malignas linfóides infância (Duval *et al.* 2002). Os principais efeitos colaterais são a disfunção hepática, pancreatite, diabetes, leucopenia, convulsões neurológicas e alterações da coagulação que pode levar a trombose ou hemorragia intracraniana (Duval *et al.* 2002).

O efeito anti-leucêmico da L-asparaginase é resultado do rápido esgotamento de L-asparagina, um aminoácido essencial para a sobrevivência da maioria das células cancerosas as quais são dependentes de uma fonte exógena deste aminoácido. As células normais, no entanto, são capazes de sintetizar L-asparagina e, portanto, são menos afetadas pelo seu rápido esgotamento produzido pelo tratamento com esta enzima. A L-asparagina danifica rapidamente a síntese de proteína e leva a uma inibição do DNA e síntese do RNA, por conseguinte a uma diminuição da função celular, resultando na morte da célula (Müller & Boos, 1998; Ohnuma, Holland & Freeman, 1970).

Segundo o Ministério da Saúde (MS), a L-asparaginase é considerada para tratamento padrão de leucemia linfóide aguda, o câncer infantil mais frequente. A L-asparaginase é vendida comercialmente no Brasil sob o nome de Elspar® da Merk, originada a partir de *E. coli*, e Erwinase da Speywood®. As duas possuem o mesmo mecanismo de ação e toxicidade, diferindo nas propriedades farmacocinéticas. Quando utilizadas por longo prazo, pode causar hipersensibilidade, levando a reações alérgicas e anafilaxia (Reynolds & Taylor, 1993; Keating *et al.* 1993; Duval *et al.*, 2002; Verna *et al.*, 2007).

Em 2010, o fármaco teve a fabricação suspensa no Brasil e, segundo os médicos, a falta dele comprometeu o tratamento de crianças, já que o seu uso é importante nas primeiras quatro semanas de tratamento. Nesse mesmo ano, o Governo precisou de recorrer à importação do medicamento, onde cada caixa contendo um frasco-ampola (10 mL) custava aproximadamente U\$100,00. Atualmente, sua fabricação foi reestabelecida e o Ministério da Saúde já investiu cerca de R\$ 17 mil para compra deste medicamento somente em julho de 2012 (Portal da Transparência, 2012). Nos últimos 12 anos, os gastos federais com a assistência oncológica no país quadruplicaram, passando de R\$ 470, 5 milhões (em 1999) para R\$ 2,2 bilhões. Este aumento de recursos serviu para ampliar e melhorar a assistência aos pacientes atendidos nos hospitais públicos e privados que compõe o Sistema Único de Saúde (SUS), sobretudo para os tipos de câncer como fígado, mama, linfoma e leucemia aguda (Portal da Saúde, 2012). Devido ao potencial de sua aplicação no tratamento de tumores cancerígenos, a demanda por L-asparaginase tende a aumentar nos próximos anos (Krishnan *et al.* 1998; Soliman *et al.* 2005; Pedreschi *et al.* 2008). Portanto, é imprescindível a busca por outras fontes de produção desta enzima para que se aumente a disponibilidade do medicamento à população e diminuam os efeitos colaterais ocasionados pela utilização dessa substância.

2.4.1 Produção de L-asparaginase por fungos

A produção de L-asparaginase por fungos já foi relatada por diversos autores. Arima *et al.* (1972) e Imada *et al.* (1973) relataram a presença de L-asparaginase no filtrado de cultura de *Penicillium claviforme*, sendo que Imada *et al.* (1973) também observaram nos filtrados de culturas de cepas de *P. expansum*. Vários grupos de pesquisa estudaram a produção e purificação de L-asparaginase em tentativa para minimizar impurezas que produzem reações alérgicas (Campbell *et al.* 1967; Boss, 1997; Gallagher *et al.* 1999). Tem-se observado que os micro-organismos eucariotos como leveduras e fungos filamentosos têm um potencial de produção de L-asparaginase (Wade *et al.* 1971; Wiame *et al.* 1985; Pinheiro *et al.* 2001). Por exemplo, espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são comumente relatadas para a produção de asparaginase (De-Angeli *et al.* 1970; Arima *et al.* 1972; Imada *et*

al. 1973; Nakahama *et al.* 1973; Curran *et al.* 1985). Gulati *et al.* (1997) apresentou um método de ensaio simples e rápido para a detecção de L-asparaginase usando diferentes amostras de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Após uma primeira triagem, as culturas que apresentaram uma elevada atividade de L-asparaginase foram cultivadas em fermentação submersa a fim de determinar a produção desta enzima na presença de diferentes fontes de nitrogênio. Saquis *et al.* (2004) observaram que *Aspergillus tamaris* e *A. terreus* tem potencial de produção L-asparaginase.

Outros relatos sobre a produção de L-asparaginase por fungos já foram publicados, tanto utilizando leveduras como *Rhodotorula* sp. e *Candida utilis*, quanto fungos filamentosos, como *Aspergillus nidulans* (Shaffer, 1988), *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* (Sarquis *et al.* 2004), *Aspergillus niger* utilizando agro-resíduos a partir de três leguminosas (Mishra, 2006), *Aspergillus* sp. (Sreenivasulu, 2009), *Aspergillus tamari*, *Aspergillus nidulans* (Lapmak *et al.* 2010), *Helminthosporium* sp. (Soniya *et al.* 2012), *Paecilomyces* sp., (Gupta *et al.* 2009), *Cladosporium* sp. (Kumar *et al.* 2013), *Aspergillus terreus* (Baskar *et al.* 2009; 2010) utilizando bolo de óleo de amendoim como substrato de baixo custo e *Bipolaris* sp. BR438 isolada do arroz na Tailândia (Lapmak, *et al.* 2010).

Siddalingeshwara & Lingappa (2010) relatam que *Aspergillus terreus* KLS2 é um agente promissor para aplicação industrial, uma vez que houve produção de L-asparaginase utilizando a vagem de alfarroba como substrato. Kumar *et al.* (2013) sugeriram fortemente que o *Cladosporium* sp. pode ser um grande potencial como fonte de L-asparaginase para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer. Mishra (2006) estudando a produção e as propriedades da L-asparaginase descobriu um novo isolado de *A. niger* em fermentação em estado sólido (FES) usando um resíduo agrícola. *Aspergillus terreus* também possuem propriedades antitumorais contra ascite de Ehrlich em camundongos que pode ser não tóxico e tem propriedades mielossupressoras (Ali, 1994). Theantana *et al.* (2007) estudando fungos endofíticos isolados de plantas medicinais da Tailândia quanto a produção de L-asparaginase, afirmaram que 23 isolados exibiram atividades enzimáticas promissoras para novos estudos. Em 2009, Theantana *et al.* relataram que espécies de *Colletotrichum* são também promissoras para produção de L-asparaginase.

Patro et al. (2014) estudaram a influência da composição do meio de cultura sobre a produção de L-asparaginase por *Aspergillus flavus*. Os autores observaram que amido e sorbitol como fonte de carbono e L-asparagina e L-glutamina, foram os substratos que mais estimularam a produção de L-asparaginase por esta espécie.

3 CAPÍTULO I

Produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de cacto da floresta tropical seca brasileira¹

Artigo submetido ao *World Journal Microbiology and Biotechnology*

RESUMO

A L-asparaginase é uma enzima usada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer humano. Há uma busca para as outras fontes produtoras de L-asparaginase para diminuir os efeitos colaterais ocasionados pela utilização dessa substância quando sintetizada por bactérias. Estudos utilizando fungos endofíticos tem sido realizados, contudo, não há relatos sobre a produção de L-asparaginase por esses fungos no Brasil, que detém grande diversidade biológica. Fungos endofíticos foram isolados do cacto *Cereus jamacaru* e depositados na Micoteca URM. Para a seleção quanto a produção de L-asparaginase, foram utilizados 44 isolados. Em meio sólido, foi observada a formação de um halo ao redor da colônia fúngica, indicando a capacidade de produção de L-asparaginase. A produção em meio líquido, foi realizada inculando as culturas de fungos em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de Czapek Dox's modificado (CDM) e incubados a 30 ° C e 120 rpm durante 5 dias. Dos 44 fungos endofíticos estudados, 30 apresentaram halo de degradação, e 19 produziram L-asparaginase em meio líquido. *Aspergillus ochraceus* URM 6885, *A. japonicus* URM 6872, *A. terreus* URM 6888, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 e *Penicillium brevicompactum* URM 6833 são os fungos endofíticos que possuem maior habilidade para síntese da L-Asparaginase em meio líquido e por isso são indicados para estudos mais detalhados de produção desta enzima.

INTRODUÇÃO

¹ Trabalho a ser submetido para publicação como Marília Gomes da Silva Santos, Jadson Diogo Pereira Bezerra, Virginia Michele Svedese, Minelli Albuquerque Sousa, Dianny Carolyne Vasconcelos da Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Cristina Maria de Souza Motta 2014. Production of L-asparaginase by endophytic fungi from cactus of the brazilian tropical dry forest. *World Journal Microbiology and Biotechnology*.

Os micro-organismos endofíticos podem desempenhar um papel importante na sobrevivência das plantas, melhorando a absorção de nutrientes (Gasoni & Gurfinkel, 1997; Malinowski *et al.*, 1999), desenvolvimento a produção de metabólitos promotores do crescimento vegetal, tais como giberelinas (Choi *et al.*, 2005; Rim *et al.*, 2005) e auxinas (Dai *et al.*, 2008) e auxiliando na adaptabilidade ecológica do hospedeiro a fatores bióticos e abióticos (Strobel *et al.*, 1996). Os endófitos também são conhecidos pela capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de outras moléculas bioativas que podem ser tóxicas ou utilizadas pelas indústrias farmacológicas (Hyde & Soyong, 2008; Theantana *et al.*, 2007, 2009; Xu *et al.*, 2010; Qui *et al.*, 2012).

Estudos referentes à avaliação da microbiota endofítica tem sido realizado em todos os continentes (Carroll *et al.* 1977; Chen *et al.* 2003; Costa *et al.* 2012; Suryanarayanan *et al.* 2003). Plantas das florestas tropicais úmidas e temperadas foram verificadas quanto à diversidade da comunidade de fungos endofíticos (Fröhlich *et al.* 2000; Azevedo *et al.* 2000). As florestas tropicais secas ocupam cerca de 30% da superfície da Terra (Peel *et al.* 2007) e só mais recentemente tem sido exploradas quanto a sua micodiversidade endofítica (Puente *et al.* 2004a; 2004b; Murali *et al.* 2007; Puente *et al.* 2009a; 2009b; Khidir *et al.* 2010; Lopez *et al.* 2011; 2012; Suryanarayanan *et al.* 2011; Sun *et al.* 2012; Bezerra *et al.* 2012b; Loro *et al.* 2012).

Os estudos da comunidade de endófitos em ambientes secos têm revelando comportamento diferenciado quando comparado com pesquisas realizadas em ambientes úmidos. O Brasil possui uma das florestas tropicais secas que é conhecida como Caatinga. Um dos vegetais característicos desse ecossistema são os membros da família Cactaceae que fazem da Caatinga um centro de conservação e dispersão natural mundial de cactos, abrigando cerca de 160 espécies, sendo 41 endêmicas (Taylor & Zappi, 2002). Como poucos estudos de avaliação da comunidade de fungos endofíticos foram realizados em ambientes secos, e menos ainda com cactos, somente quatro estudos acessaram a diversidade endofítica fúngica de espécies da família Cactaceae (Fisher *et al.* 1994; Suryanarayanan *et al.*, 2005; Bezerra *et al.* 2012, 2013).

Uma maior atenção foi dada a capacidade biotecnológica dos fungos endofíticos a partir da síntese da substância anticancerígena conhecida como taxol

(Stierle *et al.* 1993; Strobel *et al.* 1993). A biomolécula taxol foi tradicionalmente isolada de cascas de *Taxus brevifolia* Nutt., entretanto, a partir do isolamento de um novo endófito descrito como *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle & W.M. Hess a produção foi aprimorada. Após o primeiro relato de fungos endofíticos produzindo taxol, outras plantas foram verificadas quanto a sua comunidade endofítica e a capacidade biotecnológica desses micro-organismos na produção de antitumorais e outras biomoléculas (Albrechtsen *et al.* 2010; Tan & Zou, 2001; Chandra, 2012; Hyde & Soyong, 2008; Theantana *et al.* 2007, 2009; Xu *et al.* 2010; Qui *et al.* 2012; Trichur & Suryanarayanan, 2013).

A relação simbiótica dos endófitos com o hospedeiro pode estimular a produção de substâncias bioativas para competir com patógenos e para regular o metabolismo do hospedeiro no equilíbrio da associação, sendo fontes potenciais de novos produtos naturais para exploração na agricultura, medicina e indústria farmacêutica (Wang & Dai, 2011; Chandra, 2012; Nadeem *et al.* 2012). Além do taxol, outra substância antitumoral que tem sido produzida por fungos endofíticos é a L-asparaginase.

A L-asparagina amidohidrolase é uma enzima usada como agente quimioterápico para o tratamento de câncer humano (Wriston; Yellin, 1973; Capizzi *et al.* 1984) de forma que a sua ação catalítica transforma o aminoácido asparagina em ácido aspártico e amônia, privando as células malignas de um nutriente essencial, levando à morte celular (Patro & Gupta, 2012). No entanto, a L-asparaginase foi originalmente relatada a partir de bactérias e quando utilizada por longo prazo, pode causar hipersensibilidade, levando a reações alérgicas e anafilaxia (Reynolds; Taylor, 1993, Keating *et al.* 1993). Para superar estas dificuldades, o fármaco pode ser modificada por peguilação ou imobilização, assim como também os protocolos de tratamento podem ser modificados para aumentar a eficácia do fármaco (Kumar *et al.* 2014). Por outro lado, alguns fungos têm sido relatados como grande potencial para a produção de L-asparaginase com menores efeitos colaterais ao ser humano (Sarquis *et al.* 2004; Imada *et al.* 1973; Elshafei *et al.* 2012; Shrivastava *et al.* 2012).

Fungos endofíticos foram descritos como produtores de L-Asparaginase por Theantana *et al.* (2007, 2009) em estudo com plantas medicinais da Tailândia e por Sarquis *et al.* (2004) em estudo com algas marinhas, sendo as espécies na maioria

relatadas do filo Ascomycota. No Brasil, poucos estudos verificaram a produção de L-asparaginase por fungos filamentosos (Loreiro *et al.* 2012) e atualmente não se tem estudos sobre a sua produção de L-asparaginase por fungos endofíticos de Cactaceae. O objetivo desse estudo foi verificar a capacidade dos fungos endofíticos isolados do cacto *C. jamacaru* em produzir a enzima anticancerígena L-asparaginase.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados do cacto *Cereus jamacaru* crescendo na floresta tropical seca brasileira, na Fazenda Tamanduá, Paraíba - PB Nordeste do Brasil (07°1.524S, 037°23.518W) (Bezerra *et al.* 2013) e depositados na Coleção de Culturas – Micoteca URM (WCDM 604) da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil . Para a seleção quanto a produção de L-asparaginase, foram utilizados 44 isolados.



Figura 1 - *Cereus jamacaru*.

Produção de L-asparaginase em meio sólido

Todos os isolados de fungos endofíticos foram cultivados em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) durante 7 dias. Discos de 5 mm de micélio foram transferidos para placas de Petri contendo o meio ágar Czapek Dox's modificado (ACDM) (Saxena & Sinha, 1981). O ensaio em placa de ágar foi utilizado para selecionar os fungos produtores de L-asparaginase. O meio ACDM foi composto por glicose (2,0 g/L), L-asparagina (10,0 g/L), KH_2PO_4 (1,52 g/L), KCl (0,52 g/L),

MgSO₄.7H₂O (0,52 g/L), CuNO₃.3 H₂O (0,001 g/L), ZnSO₄.7H₂O (0,001 g/L), FeSO₄.7 H₂O (0,001 g/L), pH 6,2 e suplementado com vermelho de fenol (0,009% concentração final) que foi utilizado como indicador de produção de L-asparaginase, que muda o meio de cultura da cor amarela (condição ácida) para cor-de-rosa (condição alcalina). Placas de Petri com o meio ACDM sem asparagina foram utilizadas como controle. Todas as placas foram incubadas a 30 °C por cinco dias. O raio da zona cor-de-rosa e o diâmetro da colônia foram mensurados após a incubação. A zona cor-de-rosa indicou a capacidade de produção de L-asparaginase pelo fungo (Gulati *et al.* 1997; Theantana *et al.* 2007).

Produção de L-asparaginase em Meio Líquido

Um disco de 5 mm de micélio das culturas de fungos cultivados em cada placa de Petri contendo o meio de cultura BDA foram usados como inóculo em frascos de Erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL de Czapek Dox's modificado (CDM). Os frascos de Erlenmeyer foram incubados a 30 °C em agitador rotativo a 120 rpm durante 5 dias. Após esse período, as culturas foram filtradas utilizando papel de filtro Whatman nº 1 e centrifugadas a 6000 rev min⁻¹ por 15 min (Theantana *et al.* 2007).

Atividade da L-asparaginase

A atividade da enzima foi determinada do filtrado do CDM pela técnica de Nesslerização e expressas como U/ml, como descrito por Imada *et al.* (1973) e Pradhan *et al.* (2013), modificado. O substrato (L-asparagina) foi preparado em 0,05 M tampão tris (hidroximetil) aminometano (tris-HCl) (pH 7,2), com concentração final de 0,04 M. Os tubos de reação continham 200µL de L-asparagina 0,04 M, 100µL de tris-HCl 0,05 M (pH 7,2) e 100µL de extrato bruto enzimático. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e depois a reação foi interrompida com 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 1,5M. A mistura foi centrifugada a 6000 g, 4°C por 5min e do sobrenadante foram retirados 100µL os quais foram adicionados a 750µL de água destilada esterilizada. O branco da amostra foi preparado em tubos de reação contendo 200µl de tris-HCl 0,05 M (pH 7,2), 200µl de ácido tricloroacético (TCA) 1,5M e 100µl de enzima bruta. O reagente de Nessler foi adicionado e a mistura incubada a 20 °C por 20 minutos. Todas as reações foram medidas em leitor de microplacas a 396 nm. Foi considerada como uma unidade de L-asparaginase a

quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de amônia por min a 37 °C . Todas as análises foram realizadas em triplicata e comparadas ao branco da amostra.

Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Foi utilizado o programa Assistat 7.7 beta (Silva & Azevedo 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fungos endofíticos de *Cereus jamacaru*

Os fungos endofíticos isolados estão relacionados por Bezerra *et al.* (2013). Foram utilizados 44 isolados no presente trabalho para caracterização quanto a produção de L-asparaginase (Tabela 1), por algumas pertencerem a espécies mais frequentes e outras relatadas pela primeira vez como endofíticas de cacto e como endofíticas para o Brasil.

Entre os endofíticos, foram isolados tanto fungos filamentosos quanto leveduras pertencentes aos Filos Zygomycota (atuamente Mucoromycotina) e aos Ascomycota e Basidiomycota, apresentando tanto anamorficos (ex. *Aspergillus*, *Candida*, *Curvularia*, dentre outros) quanto teleomórficos (ex. *Giberella* e *Guignardia*). A maioria dos isolados apresentou a fase de reprodução assexuada.

Poucos são os trabalhos que relatam o isolamento de fungos endofíticos de cactos. Na Austrália Fisher *et al.* (1994), observaram que 23 taxa pertenceram aos Ascomycota. No Arizona (EUA), Suryanarayanan *et al.* (2005) isolaram fungos endofíticos pertencentes a 22 espécies de Ascomycota e Bezerra *et al.* (2012) isolando da palma forrageira no Brasil também observaram 13 espécies pertencentes a este Filo.

Tabela 1 - Fungos endofíticos isolados do cacto *Cereus jamacaru* depositados na Micoteca URM, UFPE, Brasil.

Fungos endofíticos	Número de acesso URM	Fungos endofíticos	Número de acesso URM
<i>Acremonium bacillisporum</i>	6840	<i>Curvularia lunata</i> (Wakker)	6861

(Onions & G.L. Barron) W. Gams		Boedijn	
<i>Acremonium pteridii</i> W. Gams & J.C. Frankland	6838	<i>Debaryomyces hansenii</i> Zopf) Lodder & Kreger-van Rij	6883
<i>Aspergillus flavus</i> Link	6886 6887	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltld.	6704 6815
<i>Aspegillus japonicus</i> Saito	6872 6873	<i>Gibberella fujikuroi</i> var. <i>fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw. <i>Guinardia bidwellii</i> (Ellis) Viala & Ravaz	6816 6817
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh.	6870 6871	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> Dierckx <i>Penicillium brevicompactum</i> Dierckx	6844 6833
<i>Aspergillus ochraceus</i> G. Wilh.	6869 6885	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom <i>Penicillium commune</i> Thom	6831 6832 6845
<i>Aspegillus parasiticus</i> Speare	6867 6868	<i>Penicillium griseofulvum</i> Dierckx	6847 6846
<i>Aspergillus sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	6866		
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	6888	<i>Penicillium minioluteum</i> Dierckx	6843 6889
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill.) Tirab.	6864 6865	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (Thom) Luangsa-ard, Hywel- Jones & Samson	6818
<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud	6874 6875 6876	<i>Rhodotorula minuta</i> (Saito) F.C. Harrison <i>Sterigmatomyces elviae</i> Sonck & Yarrow <i>Syncephalastrum</i> <i>racemosum</i> Cohn ex J. Schröt.	6882 6880 6819
<i>Candida magnoliae</i> (Lodder & Kreger-van Rij) S.A. Mey. & Yarrow	6881	<i>Trichoderma viride</i> Pers.	6823
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	6859	<i>Tritirachium dependens</i> Limber	6822
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> Penz.	6862 6863		

Seleção de Fungos Endofíticos Quanto a Produção de L-asparaginase em Meio Sólido

Para a atividade em meio sólido, das 44 linhagens de fungos endofíticos testadas, 30 apresentaram halo de degradação com o índice enzimático variando de 1,04 a 8,09. Todos os fungos endofíticos cresceram no meio de cultura ágar CDM com vermelho de fenol. *Cladosporium sphaerospermum* URM 6862, *Cladosporium cladosporioides* URM 6859, *Penicillium aurantiogriseum* URM 6844 e *Acremonium pteridii* URM 6838 apresentaram os maiores índices enzimáticos, estatisticamente comprovado (Tabela 2), quando comparadas as outras espécies testadas.

O ensaio em placa de Petri é considerado vantajoso por ser um método rápido onde a produção de L-asparaginase pode ser visualizada diretamente a partir do halo e cálculo da zona de atividade enzimática (Arima *et al.* 1972; De Jong *et al.* 1972). A Figura 1 apresenta alguns dos fungos endofíticos testados que apresentaram atividade enzimática em meio sólido.

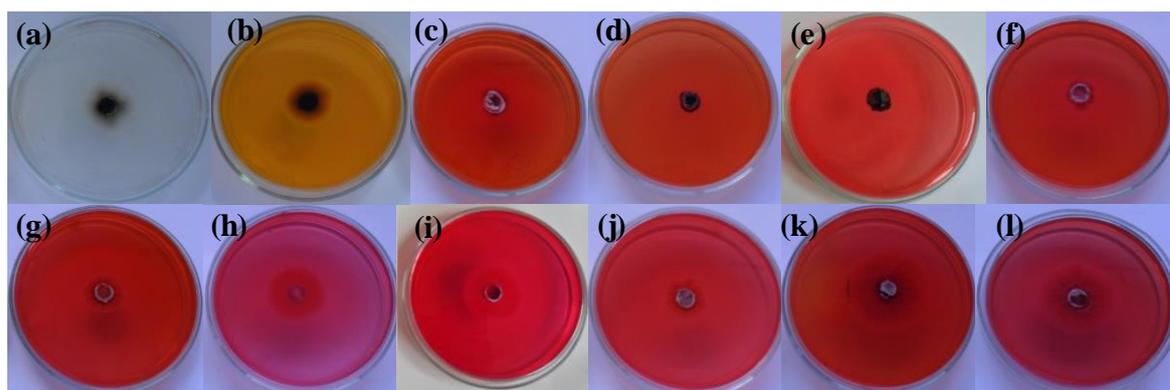


Figura 2 - Atividade de L-asparaginase em meio sólido. (a) Placa controle; (b) Placa sem atividade: *Aspergillus niger* URM 6870; Placas com atividade enzimática: (c) *Acremonium pteridii* URM 6838; (d) *Cladosporium cladosporioides* URM 6859; (e) *Cladosporium sphaerospermum* URM 6862; (f) *Penicillium aurantiogriseum* URM 6844; (g) *Penicillium chrysogenum* URM 6831; (h) *Giberella jugikuroi* var. *fugikuroi* URM 6816; (i) *Fusarium oxysporum* URM 6704; (j) *Penicillium brevicompactum* URM 6833; (k) *Curvularia lunata* URM 6861; (l) *Aspegillus parasiticus* URM 6867.

Estudando a produção de L-asparaginase por fungos, Saquis *et al.* (2004) selecionaram 26 culturas pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, verificando que apenas as amostras de *Aspergillus* apresentaram halo enzimático. Mishra (2006) relata a produção desta enzima por *A. niger*. Entretanto, os isolados *A. niger* URM 6870 e URM 6871 utilizados no presente estudo não apresentaram zona de atividade enzimática, no entanto, as outras espécies de *Aspergillus* testadas apresentaram halo enzimático, exceto *Aspergillus japonicus*

URM 6873 e *Aspergillus flavus* URM 6887. Dentre as espécies de *Fusarium* e *Penicillium* utilizadas neste trabalho, apenas *Penicillium minioluteum* URM 6843 e 6889 não houve detecção de atividade da L-asparaginase. Esses resultados demonstram que a capacidade de produzir a enzima em meio sólido pode ser eficiente e pode ser realizado de forma prévia e rápida indicando isolados com potencialidade para síntese de L-asparaginase.

Verificando a potencialidade de fungos na produção de L-asparaginase, Soniyamby *et al* (2012) relataram que espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* e Basidiomycetes são produtores do anticancerígeno com zona de atividade enzimática com diâmetro acima de 15 mm, com destaque para o isolado *Aspergillus* sp. KUFS20 que apresentou zona de 27 mm. Em outra pesquisa, Soniyamby *et al.* (2011) utilizaram 22 espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* e verificaram que apenas 10 culturas tiveram halo de degradação, com destaque para o gênero *Penicillium*. Balasubramanian *et al.* (2012) também estudaram 5 espécies de fungos isoladas a partir da amostra de solo marinho e relataram os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* com capacidade de produzir L-asparaginase, com destaque para *Aspergillus terreus* que exibiu alta atividade enzimática.

Hosamani & Kaliwal (2011) isolaram *Fusarium equiseti* do solo de rizosfera de *Ipomoea muricata* e indicaram este isolado como produtor de L-asparaginase por exibir halo de 0,6-0,9 cm. Kumar *et al.* (2013) realizaram atividade de L-asparaginase em meio sólido com 70 de fungos isolados do solo e demonstraram que 50 isolados apresentaram zona de diâmetro, entretanto com atividade considerada fraca. Theantana *et al.* (2007) selecionando fungos endofíticos de plantas medicinais na Tailândia, identificaram 41 isolados com atividade positiva para L-asparaginase com halos variando entre 1,61-1,88 cm, Gulati *et al.* (1997) consideraram *Aspergillus oryzae*, *Penicillium nelicum* e *Penicillium granulatum* como bons produtores de L-asparaginase, com o coeficiente variando entre 0,97-1,08. No presente estudo os índices enzimáticos foram maiores que os encontrados na literatura variando entre 1,04-8,09, sendo considerados com atividade forte. Além disso, este trabalho corrobora com os resultados dos autores citados, onde os endófitos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentam os maiores índices enzimáticos destacando-se as espécies de *Penicillium* (Tabela 2).

Entre os isolados testados, *Cladosporium sphaerospermum* URM 6862 destacou-se na atividade em meio sólido com índice enzimático de 8,03. Na literatura científica não foram encontrados estudos relatando a capacidade de produção de anticancerígenos por espécies de *Cladosporium*. Espécies de *Cladosporium* foram mais frequentes no estudo da comunidade endofítica do cacto *C. jamacaru* e, segundo Bezerra et al. (2013), esse gênero parece ter importância ecológica para o vegetal crescendo na floresta tropical seca brasileira. Kumar & Manonmani (2013) sugeriram fortemente que *Cladosporium* sp. pode ter um grande potencial como fonte L-asparaginase para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o tratamento do câncer.

Lapmak et al. (2010) testaram em meio sólido fungos isolados de arroz na Tailândia pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Cochliobolus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Hansfordia* e *Phaeotrichoconis* e consideraram este método eficiente para a detecção de atividade de L-asparaginase. Theantana et al. (2009) testaram 82 isolados de fungos endofíticos de plantas medicinais da Tailândia se destacando *Colletotrichum* na produção do anticancerígeno. Na tabela 2 foi observado que as espécies de *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Purpureocillium* e *Trichoderma* também demonstraram capacidade de produção do anticancerígeno em meio sólido.

A validação do método utilizando meio de cultura sólido contido em placa de Petri para detecção da produção da L-asparaginase foi recentemente efetuada por Mahajan et al. (2013). Estes autores utilizaram dois corantes distintos (vermelho de fenol e o azul de bromotimol) demonstrando que o corante vermelho de fenol não foi claramente eficiente para a produção de L-asparaginase, diferindo desse estudo que demonstrou claramente a capacidade de produzir L-asparaginase por esse método. Patil et al. (2012), utilizaram um método rápido sensível em rodela de ágar com fungos endofíticos isolados de folhas e casca de *Aegle marmelos* onde dos 12 isolados testados apenas 3 apresentaram atividade.

Seleção de Endófitos Quanto a Produção de L-asparaginase em Meio Líquido

Dos 44 fungos endofíticos, 19 produziram L-asparaginase em meio líquido e exibiram atividade entre 1,05-29,02 U/ml (Tabela 2). *Penicillium minioluteum* URM 6843, que não apresentou atividade em meio sólido exibiu atividade em meio líquido com 3,64 U/ml de atividade. Por outro lado, 11 endófitos apresentaram índice enzimático de 1,04 a 8,09, porém não apresentaram atividade de L-asparaginase em meio líquido. Resultados similares foram obtidos por Hölker *et al.* (2004) e Lee *et al.* (2005) os quais sugeriram a importância da utilização das duas metodologias para seleção de fungos com capacidade de produzir L-asparaginase.

Avaliando a atividade de L-asparaginase de fungos endofíticos isolados de plantas medicinais na Tailândia, Theantana *et al.* (2007) verificaram uma variação de atividade entre 0,014-1,530 U/ml. Os resultados obtidos pelos pesquisadores são diferentes aos desse estudo, visto que a atividade mínima foi de 1,05 U/ml por *Penicillium aurantiogriseum* URM 6844 e a máxima de 29,02 U/ml por *Aspergillus sydowii* URM 6866 que apresentou diferença significativa em relação as demais amostras testadas (Tabela 2).

As espécies de *Penicillium* são ótimas produtoras de L-Asparaginase como foi mostrado por Soniyamby *et al.* (2011) estudando as espécies de fungos isoladas do solo, onde destacaram o isolado identificado como *Penicillium* sp. com atividade enzimática de 15 U/ml após a otimização. Gulati *et al.* (1997) em um rápido ensaio para seleção de micro-organismos, também consideraram espécies de *Aspergillus oryzae*, *Penicillium nelicum* e *Penicillium granulatum* como bons produtores da enzima, com resultados de atividade enzimática variando entre 0,13 e 0,16 U/ml. Os resultados obtidos nessa pesquisa mostram a importância deste gênero como produtor de L-asparaginase, contudo a atividade enzimática, entre os isolados do gênero *Penicillium* que produziram L-asparaginase, foram superiores as citadas variando entre 1,05-26,54 U/ml.

Sarquis *et al.* (2004) realizaram estudo aprofundado quanto a produção de L-asparaginase por *A. tamaritii* e *A. terreus* e observaram um alto valor de atividade (38 e 58,8 U/L, respectivamente). Balasubramanian *et al.* (2012) isolaram apenas *Aspergillus terreus* de amostras de solo marinho e mostraram atividade de 9,3 U/ml pelo fungo estudado. Soniyamby *et al.* (2012) e Rani *et al.* (2011) isolaram espécies de *Aspergillus* de solo de jardim e relataram a capacidade desses fungos de

produzir uma quantidade significativa de enzima L-asparaginase (3,8 U/ml). Mishra (2006) utilizou resíduo de baixo custo para produção de L-asparaginase por *A. niger* demonstrando ser um isolado e um substrato economicamente atraente com produção em condições laboratoriais em torno de 40,21 U/ml. Siddalingeshwara & Lingappa (2010) utilizaram alfarroba como substrato e relataram *A. terreus* KLS2 como um agente promissor para aplicação industrial, uma vez que houve produção de L-asparaginase de 5,63 U/ml. As espécies do gênero *Aspergillus* tem demonstrado ser promissoras na produção desta enzima. Neste estudo dos 14 isolados testados, 9 apresentaram atividade enzimática variando entre 6,66 a 29,02 U/ml.

Imada *et al.* (1973) testaram diversas espécies de fungos e bactérias e destacaram *Fusarium*, *Penicillium* e as leveduras *Rhodotorula* e *Candida utilis* com capacidade extracelular de síntese de L-asparaginase. Hosamani & Kaliwal (2011) indicaram *Fusarium equiseti* (0,14 U/ml) como fungo com melhor capacidade de produzir a enzima L-asparaginase após a otimização. Gupta *et al.* (2009) isolaram *Fusarium* de solo da rizosfera do mangue e relataram que o isolado foi capaz de produzir L- asparaginase. Nesse estudo, *F. oxysporum* URM 6704 e URM 6815 e o seu teleomórfico *G. fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 também tiveram destaque na atividade enzimática, sendo este último um dos que apresentou a maior atividade com 26,93 U/ml.

Tabela 2 - Índice enzimático e atividade enzimática de L-asparaginase em meios sólido e líquido de fungos endofíticos isolados do cacto *Cereus jamacaru*.

URM	Espécies fúngicas	Índice Enzimático	Atividade de L-asparaginase (U/ml)
6840	<i>Acremonium bacillisporum</i>	4,84 b	0 h
6838	<i>Acremonium pteridii</i>	5,99 a	0 h
6886	<i>Aspergillus flavus</i>	3,11 f	6,66 fgh
6887	<i>Aspergillus flavus</i>	0 k	0 h
6872	<i>Aspergillus japonicus</i>	3,88 d	23,37 abc
6873	<i>Aspergillus japonicus</i>	0 k	0 h
6870	<i>Aspergillus niger</i>	0 k	0 h
6871	<i>Aspergillus niger</i>	0 k	0 h
6869	<i>Aspergillus ochraceus</i>	4,13 c	0 h
6885	<i>Aspergillus ochraceus</i>	2,00 i	19,63 bcd
6867	<i>Aspergillus parasiticus</i>	3,14 f	12,50 def
6868	<i>Aspergillus parasiticus</i>	3,06 f	9,36 efg
6866	<i>Aspergillus sydowii</i>	3,66 e	29,02 a

6888	<i>Aspergillus terreus</i>	3,22 f	28,20 a
6864	<i>Aspergillus versicolor</i>	2,46 h	11,48 ef
6865	<i>Aspergillus versicolor</i>	5,71 b	12,38 def
6874	<i>Aureobasidium pullulans</i>	3,60 e	0 h
6875	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0 k	0 h
6876	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1,04 j	0 h
6881	<i>Candida magnoliae</i>	0 k	0 h
6859	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	6,75 a	0 h
6862	<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	8,09 a	0 h
6863	<i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i>	4,28 c	15,64 de
6861	<i>Curvularia lunata</i>	2,99 g	5,23 fgh
6883	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0 k	0 h
6704	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,76 d	5,38 fgh
6815	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,88 d	16,75 cde
6816	<i>Gibberella fujikuroi</i> var. <i>fujikuroi</i>	3,73 d	26,93 ab
6817	<i>Guinardia bidwellii</i>	0 k	0 h
6844	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	6,26 a	1,05 h
6833	<i>Penicillium brevicompactum</i>	4,37 c	26,54 ab
6831	<i>Penicillium chrysogenum</i>	5,27 b	0 h
6832	<i>Penicillium chrysogenum</i>	5,27 b	0 h
6845	<i>Penicillium commune</i>	5,27 b	0 h
6847	<i>Penicillium commune</i>	5,32 b	9,27 efg
6846	<i>Penicillium griseofulvum</i>	3,90 d	0 h
6843	<i>Penicillium minioluteum</i>	0 k	3,64 gh
6889	<i>Penicillium minioluteum</i>	0 k	0 h
6818	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	3,78 d	5,95 fgh
6882	<i>Rhodotorula minuta</i>	0 k	0 h
6880	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	0 k	0 h
6819	<i>Syncephalastrum racemosum</i>	0 k	0 h
6823	<i>Trichoderma viride</i>	2,00 i	0 h
6822	<i>Tritirachium dependens</i>	0 k	0 h

Teste de Tukey com nível de significância de 5%. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

A importância biotecnológica de fungos endofíticos tem sido demonstrada em estudos realizados em vários países. Schultz *et al.* (2002) relataram a importância da pesquisa dos metabólitos desses micro-organismos, pois, quando comparados com fungos obtidos de outros substratos, relativamente poucos metabólitos tem sido isolados. Além disso, 51% das substâncias já estudadas se tratam de compostos inéditos obtidos a partir de fungos endofíticos, enquanto que da microbiota do solo e outros substratos apenas 38% eram novas. A procura da diversidade fúngica em

novos habitats são fatores importantes na busca por produtos naturais e, conseqüentemente, no desenvolvimento de novos fármacos (Siqueira, 2008).

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de fungos endofíticos isolados de planta de floresta tropical seca, com potencialidade biotecnológica para produção de L-asparaginase, além de, fornecer informações sobre endófitos que podem ser aplicados na engenharia genética com intuito de melhorar e aumentar a produção desta enzima anticancerígena. Os fungos endofíticos isolados do cacto *Cereus jamacaru* possuem grande potencial biotecnológico, com capacidade de produzir *in vitro* a enzima L-asparaginase. *Aspergillus ochraceus* URM 6885, *A. japonicus* URM 6872, *A. terreus* URM 6888, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 e *Penicillium brevicompactum* URM 6833 são os fungos endofíticos que possuem maior habilidade para síntese da L-Asparaginase em meio líquido e por isso são indicados para estudos mais detalhados de produção desta enzima. Este é o primeiro relato da produção de L-asparaginase por *A. japonicus* e *A. sydowii*.

4 CONSIDERAÇÕES GERAIS

- O cacto *Cereus jamacaru* abriga uma micodiversidade até então desconhecida e é uma fonte de micro-organismo com capacidade de produzir *in vitro* a enzima anticancerígena L-asparaginase.
- *Aspergillus ochraceus* URM 6885, *A. japonicus* URM 6872, *A. terreus* URM 6888, *A. sydowii* URM 6866, *Fusarium oxysporum* URM 6815, *Gibberella fujikuroi* var. *fujikuroi* URM 6816 e *Penicillium brevicompactum* URM 6833 são os fungos endofíticos indicados para estudos mais detalhados de produção de L-asparaginase, já que demonstraram maior habilidade para síntese da enzima.
- Este é o primeiro relato de fungos endofíticos isolados de planta de floresta tropical seca com potencialidade biotecnológica para produção de L-asparaginase com interesse farmacológico no tratamento de câncer, sendo a

primeira vez que foi observada a produção desta enzima por *A. japonicus* e *A. sydowi*.

REFERÊNCIAS

- Agra, M.J.F., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 114-140.
- Agra, M.F., Silva, K.N., Basílio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M. 2008. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 472-508.
- Alarcon-Aguilar, F.J., Valdes-Arzate, A., Xolalpa-Molina, S., Banderas-Dorantes, T., Jimenez-Estrada, M., Hernandez-Galicia, E., Roman-Ramos, R. 2003. Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* (prickly pear cactus) and *O. streptacantha*. *Proc West Pharmacol Soc* 46:139-142.
- Albrechtsen, B.R., Bjorken, L., Varad, A., Hagner, A., Wedin, M., Karlsson, J., Jansson, S. 2010. Endophytic fungi in European aspen (*Populus tremula*) leaves diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal Divers*. 41: 17-28.
- Albuquerque, U. P., Andrade, L. H. C., Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (nordeste do Brasil). INCI v.27, p.336-346, 2002.
- Ali, S. S., Rai, V., Soni, K., Kulshrestha, P., Lai, S. K. 1994. A fungal L-asparaginase with potential antitumor activity. *Ind. J. Microbiol.* 34, 73-76.
- Almeida, M. M., Tavares, D. P. S. A., Rocha, A. S., Oliveira, L. S. C., Silva, F. L. H., Mota, J. C. 2006. Cinética da produção do fermentado do fruto do mandacaru. *Rev Bras Prod Agroind* 8: 35-42.
- Aly, A. H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch, P. 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers* v.41, p.1-16, doi:10.1007/ s13225-010-0034-4.
- Araújo, F. J. A. 1996. Desenvolvimento sustentável da caatinga. Sobral: Ministério da Agricultura/EMBRAPA/CNPQ.
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D., Kursar, T. A. 2000. Are tropical endophytes fungi hyperdiverse? *Ecology Letters* 3, 267-274.
- Arnold, A. E. 2007 Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers *biology reviews* 21 51 – 66.
- Arima, K., Sakamoto, T., Araki, C., Tamura, G. 1972. Production of extracellular L-asparaginases by microorganisms. *Agric Biol Chem* 36: 356-361.
- Asselin, B. L., Kreissman, S., Coppola, D. J., Bernal, S. D., Leavitt, P. R., Gelber, R. D., Sallan, S. E., & Cohen, H. J. 1999. Prognostic significance of early response to a single dose of asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 21, 6-12.

- Avramis, V. I., Tiwari, P. N. 2006. Asparaginase (native ASNase or pegylated ASNase) in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Int J Nanomed.* 1: 241–54.
- Azevedo, J. L. 1998. Microrganismos Endofíticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.). *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, p.117- 137.
- Azevedo, J. L., Maccheroni, Jr., W., Pereira, J. O., Araújo, W. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 3, n. 1, p. 40-65.
- Azevedo, J. L., Araújo, W. L. 2007. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: Ganguli BN, Deshmukh SK (eds.) *Fungi: multifaceted microbes*. CRC Press, Boca Raton, pp. 189-207.
- Balasubramanian, K., Ambikapathy. V., Panneerselvam, A. 2012. Production, Isolation, And Purification Of L-Asparaginase From *Aspergillus terreus* Using Submerged Fermentation. *IJAPR / Feb. / Vol. 3 / Issue. 2 / 778 – 783*.
- Barbosa, H. P. 1998. Tabela da composição de alimentos do Estado da Paraíba Setor Agropecuário. FAPEP-UFPB, ed.2,
- Barrow, J. R., Osuna-Avila, P., Reyes-Vera, I. 2004. Fungal endophytes intrinsically associated with micropropagated plants regenerated from native *Bouteloua eriopoda* Torr. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. *In Vitro Cell Dev Biol—Plantv.*40, p.608–612, doi:10.1079/lvp2004584.
- Baskar, G., Renganathan, S. 2009. Production of L-Asparaginase from natural substrates by *Aspergillus terreus* MTCC 1782: Effect of substrate, supplementary nitrogen source and L-Asparaginase. *Inter. J. Chem. React. Engg* 7 (41).
- Baskar, G. S., Renganathan. 2010. Optimization of Lasparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network linked genetic algorithm. *Asia Pac. J. Chem. Eng.* DOI: 10.1002/apj.520.
- Brasil, 1991. Subsídios Técnicos para elaboração do relatório nacional do Brasil para a CNUMAD. Ministério das Relações Exteriores, Brasília.
- Brasil, 1995. Nordeste: uma estratégia de desenvolvimento sustentável. Ministério do Planejamento e Orçamento, Brasília.
- Bezerra, J. D. P., Santos, M. G. S., Svedese, V. M., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Paiva, L. M., Souza-Motta, C. M. 2012. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1989-1995.
- Bezerra, J. D. P., Santos, M. G. S., Barbosa, R. N., Svedese, V. M., Lima, D. M. M., Fernandes, M. J. S., Paiva, L. M., Almeida-Cortez, J. S., Souza-Motta, C. M. 2013. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. *Symbiosis*.

Bezerra, J. D. P., Lopes, D. H. G., Santos, M. G. S., Svedese, V. M., Paiva, L. M., Almeida-Cortez, J. S., Souza-Motta, C. M. 2012b. Riqueza de micro-organismos endofíticos em espécies da família Cactaceae. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* 9(2): 19-23.

Biavatti, M., Marensi, V., Leite, S. N., Reis, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn* 17: 640-653.

Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. In: Redlin, S.C.; Carris, L.M. (Eds). *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: systematics, ecology, and evolution. American Phytopathological Society Press, St Paul, MN.* p.31–65.

Boss, J. 1997. Pharmacokinetics and drug monitoring of L-asparaginase treatment. *Int J Clin Pharm Therap* 35: 96-98.

Boyd, J. W. & Phillips, W. 1971. Inhibition of lymphoma 6C3HED by L-asparaginase from *Serratia marcescens*. *Journal of National Cancer Institute* 46, 1271-1 276.

Brhun, J., Lindgren, J. Cactaceae Alkaloids XXIII: alkaloids of *Pachycereus pectinaboriginum* and *Cereus jamacaru*. *Lloydia*, v. 39, n. 2 -3. Mar-Apr, May-Jun, p.175-177, 1976.

Britton, N., Rose, J. 1919. *The Cactaceae: descriptions and illustrations of plants of the cactus family.* V. I e II. NY: Dover Publications. p. 3-23; 197-209.

Broome, J. D. 1961. *Nature (London)* 191, 1114.

Campbell, H. A., Mashburn, L. T., Boyse, C. A. & Old, L. J. 1967. *Biochemistry* 6, 721.

Capizzi, R. L., Poole, M., Cooper, M. R., Richards, F., Stuart, J. J., Jackson, D.V., White, D. R., Spurr, C. L., Hopkins, J. O., Muss, H. B. 1984. Treatment of poor risk acute leukaemia with sequential high-dose ARA-C and asparaginase. *Blood* 63:649-700.

Carroll, F. E., Müller, E., Sutton, B. C. 1977. Preliminary studies on the incidence of needle endophytes in some European conifers. *Sydowia* 29:87–103.

Carroll, G., Petrini, O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75:53–63.

Cavalcanti, N. B., Resende, G. M. 2004. Plantas nativas da Caatinga utilizadas pelos pequenos agricultores para alimentação dos animais na seca. In: Congresso Nordeste de Produção Animal, 3. Campina Grande. Anais. Campina Grande, PB: Sociedade Nordeste de Produção Animal. CD-ROM.

Cavalcanti, N. B., Resende, G. M. Consumo do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC) por caprinos na época da seca no semi-árido de Pernambuco. *Caatinga* v.19, 402-408, 2006.

- Cavalcanti, N. B., Resende, G. M. Efeito de diferentes substratos no desenvolvimento de mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.), facheiro (*Pilosocereus pachycladus* Ritter), xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Webw. Ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl.) e coroa-de-frade (*Melocactus bahiensis* Britton & Rose). *Caatinga* v.20, p.28-35, 2007.
- Chakrabarti, R. 1997. L-asparaginase perspectives on the mechanisms of action and resistance. *Int. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 4: 597-611.
- Chandra, S. 2012. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95:47–59.
- Chen, G., Lin, Y., Wen, L., Vrijmoed, L. L. P., Jones, E. B. G. 2003. Two new metabolites of a marine endophytic fungus from an estuarine mangrove on the South China Sea Coast. *Tetrahedron* 59:4907-4909.
- Choi, W. Y., Rim, S. O., Lee, J. H., Lee, J. M., Lee, I. J., Cho, K. J., Rhee, I. K., Kwon, J. B., Kim, J. G. 2005. Isolation of gibberellins producing fungi from the root of several *Sesamum indicum* plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 1, 22–28.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology* v.69, p.10–16.
- Clay, K. 1990. Fungal endophytes of grasses. *Annu Rev Ecol Syst* v.21, p.275–297.
- Clay, K., Schardl, C. 2002. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, v.160, p.99–127.
- Clementi, A. 1922. *Arch. Int. Physiol.* 19, 369.
- Costa, I. P. M. W., Assunção, M. M. C., Lima, T. E. F., Oliveira, R. J. V., Cavalcanti, M. A. Q. 2012. Checklist of endophytic fungi from tropical regions. *Mycotaxon* 119:494.
- Curran, M. P., Daniel, R. M., Guy, R. G., Morgan, H. W. 1985. L-asparaginase from *Thermus aquaticus*. *Arch Biochem Biophys* 241: 571-576.
- Dai, C. C., Yu, B. Y., Li, X. 2008. Screening of endophytic fungi that promote the growth of *Euphorbia pekinensis*. *African Journal of Biotechnology* 7, 19, 3505–3510.
- Dai, C. C., Tian, L.S., Zhao, Y.T., Chen, Y., Xie, H. 2010. Degradation of phenanthrene by the endophytic fungus *Ceratobasidium stevensii* found in *Bischofia polycarpa*. *Biodegradation* 21:244–255
- Davey, M. L., Currah, R. S. 2006. Interactions between mosses (Bryophyta) and fungi. *Can J Bot* v.84, p.1509–1519. doi:10.1139/B06-120.
- De-Angeli, L. C., Pociarfi, Russi, S., Tonoloa, Zurita, V. E., Ciaranfei, & Perina. 1970. Effect of L-asparaginase from *Aspergillus terreus* on ascites sarcoma in the rat. *Nature*, London 225, 549-550.

De Errasti, A., Carmarán, C. C., Novas, M. V. 2010. Diversity and significance of fungal endophytes from living stems of naturalized trees from Argentina. *Fungal Divers* v.41, p.29–40,

De Jong, P. 1972. L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol* 23, 1163–1164.

Dey SK, Raha SK, Roy SK, Chakrabarty SL (1988) Comparison of Lasparaginase activity in different species of Vibrio. *Indian J Med Res* 88:398–403.

Distasio JA, Niederman RA, Kafkewitz D, Goodman D (1976) Purification and characterization of L-asparaginase with antilymphoma activity from *Vibrio succinogenes*. *J Biol Chem* 251(22):6929–6933

Duval, M., Suciú, S., Ferster, A., Rialland, X., Nelken, B., et al. 2002. Comparison of *Escherichia coli* L-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* 99: 2734-2739.

Elshafei, A. M., Hassan, M. M., Abouzeid, M. A. E., Mahmoud, D. A., Elghonemy, D. H. 2012. Purification, Characterization and Antitumor Activity of L-Asparaginase from *Penicillium brevicompactum* NRC 829. *British Microbiology Research Journal* 2, 158-174.

Eremenco, V., Evseev, P. & Nikolaeva, Y. A. 1968. Asparaginase of *Bacterium cadaveris*. *Mikro biologiya* 37, 207-212.

Estrada-Luna, A. A., Martínez-Hernández, J. D. J., Torres-Torres, M. E., Chablé-Moreno, F. 2008. In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus *Opuntia lanigera* Salm-Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. *Sci Hortic* 117:378–385.

Faeth, S. H., Fagan, W. F. 2002. Fungal endophytes: common host plant symbionts but uncommon mutualists. *Integr Comp Biol* v.42, p.360–368.

Fernández-López, J. A., Castellar, R., Obón, J. M., Almela, L. 2002. Screening and mass-spectral confirmation of betalains in cactus pears. *Chromatographia* 56:591–595.

Fisher, P. J., Sutton, B. C., Petrini, L. E., Petrini, O. 1994. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a first report. *Nova Hedwigia* 59, 195–200.

Fröhlich, J., Hyde, K. D., Petrini, O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycological Research* 104:1202–1212.

Galati, E. M. Mendello, M. R., Giuffrida, D., Miceli, N. 2001. Anticulcer activity of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultra structural study. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 76, n. 1, p. 1-9.

Gallagher, M. P., Marshall, R. D., Wilson, R. 1999. Asparaginase as a drug for treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Essays Biochemistry* 24: 1-40.

Gasoni, L. Gurfinkel, B.S. 1997 The endophyte *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton roots: phosphorus uptake and host growth. *Mycological Research* 101, 867–870.

Gennaro, M., Gonthier, P., Nicolotti, G. 2003. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in northern Italy. *J Phytopathol*, v.151, p.529–534.

Gentile, C., Tesoriere, L., Allegra, M., Livrea, M. A., D'alessio, P. 2004. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. *Ann NY Acad Sci* 1028:481–486.

Grabley, S., Sattler, I., 2003. Natural products for lead identification: nature is a valuable resource for providing tools. In: Hillisch A, Hilgenfeld A (eds), *Modern Methods of Drug Discovery*. Birkhauser Verlag, Switzerland, p.87–107.

Gulati, R., Saxena, R. K., Gupta, R. 1997 A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing micro-organisms. *Lett Appl Microbiol* 24, 23-26.

Guo, L. D., Huang, G. R., Wang Y 2008. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains, Beijing. *J Integr Plant Biol* v.50, p.997– 1003. doi:10.1111/j.1744-7909.2008.00394x

Gupta, N., Dash, J. S., Basak, U. C. 2009. L- asparaginases from fungi of Bhitarkanika mangrove ecosystem. *Aspac J. Mol. Biol. Biotechnol.* Vol. 17 (1): 27-30.

Hallmann, J. A., Quadt-hallmann, W., Mahaffee, F., Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43, 895-914.

Hawksworth, D. L., 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology* 50: 9–18.

Haskel, C. M., CANELLOS, G. P., LEVENTHABL, G., CARBONEP, P., BLOCK, J. B., SERPICKA, A. & SELAWROY, S. 1969. L-Asparaginase. Therapeutic and toxic effects in patients with neoplastic disease. *New England Journal of Medicine* 281, 1028-1034.

Hill, J. M., Roberts, J., Loeb, E., Klan, A., Lellan, A., Hill, R. W. 1967. L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. *J Am Med Assoc* 202: 882-888.

Hosamani, R., Kaliwal, B. B. 2011. 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* ISSN: 0975-5276 & E-ISSN: 0975–9174, Vol. 3, Issue 2, pp-108-119.

Hyde, K. D., 2005. Tropical fungi. In: Dighton J, White JF, Oudemans P (eds), *The Fungal Community; its Organization and Role in the Ecosystem*. Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 93–115.

Hyde, K. D., Soyong, K. 2007. Understanding microfungus diversity: a critique. *Cryptogam Mycol* v.28, p.281–289.

Hyde, K.D., Soyong, K. 2008 The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33, 163–173.

Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. 1973. Asparaginase and Glutaminase Activities of Micro-organisms. *SGM* 76:85-99.

Japan, 1990. Environment Agency. Global Environment Program and Global Environment Monitoring Program for Fiscal Year. Environment Agency, Tokyo.

Jakucs, E., Naar, Z., Szedlay, G., Orban, S. 2003. Glomalean and septate endophytic fungi in Hypopterygium mosses (Bryopsida). *Cryptogam Mycol* v.24, p.27–37.

Keating, M. J., Holmes, R., Lerner, S., Ho, D. H. 1993. L-asparaginase and PEG asparaginase – Past, present and future. *Leuk Lymphoma* 10: 153-157.

Khidir, H. H., Eudy, D. M., Porrás-Alfaro, A., Herrera, J., Natvig, D. O., Sinsabaugh, R. L. 2010. A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *Journal of Arid Environmental* 74:35–42.

Kidd, J. G. 1953 *J. Exp. Med.* 98, 565.

Knoch, T. R., Faeth, S. H., Arnott, D. L. 1993. Endophytic fungi alter foraging and dispersal by desert seed-harvesting ants. *Oecologia* v.95, p.470–475.

Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N., Hermsen, E. J. 2007. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytol* v.174, p.648–657, 2007. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02008.x

Krishnan, S., Prapulla, S. G., Rajalakshmi, D., Misra, M.C., Karanth N.G. 1998. Screening and selection of media components for lactic acid production using Plackett-Burman design. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 19:61-65.

Kumar, N. S. M. R., Manonmani, H.K. 2013. Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. *World J Microbiol Biotechnol* 29:577–587.

Kumar, N. S. M., Ramasamy, R., Manonmani, H. K. 2013. Production and optimization of L-Asparaginase from *Cladosporium* sp. using agricultural residues in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* 43,150-158.

Kumar, K., Kaur, J., Walia, S., Pathak, T., Aggarwal, D. 2014. L-asparaginase: an effective agent in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 55, No. 2 , 256-262.

Lapmak, K., Lumyong, S., Thongkuntha, S., Wongputtisin, P., Sardud, U. 2010. L-asparaginase production by *Bipolaris* sp. BR438 isolated from brown rice in Thailand. *Chinag Mai J. Sci*; 37: 160–164.

Latch, G. C. M. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agric Ecosyst Environ* 44:143–156.

Lázaro, R., Rodrigo, F. S., Gutiérrez, L., Domingo, F. 2001. Analysis of a 30-year rainfall record (1967-1997) in semi-arid SE Spain for implications on vegetation. *Journal of Arid Environments* 48:373-395.

Le Houerou, H. N. 2000. Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semiarid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Res Rehabil* 14:101–135.

Leuchtman, A., Schmidt, D., Bush, L. P. 2000. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma-forming and seed transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes. *J Chem Ecol* v.26, p.1025–1036.

Li, W. C., Zhou, J., Guo, S. Y., Guo, L. D. 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity* 25:69–80.

Lima, J. L. Plantas forrageiras das caatingas: usos e potencialidades. Petrolina: Embrapa, 1996.

Lopez, B. R., Bashan, Y., Bacilio, M. 2011. Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology* 193:527–541.

Lopez, B. R., Tinoco-Ojanguren, C., Bacilio, M., Mendoza, A., Bashan, Y. 2012. Endophytic bacteria of the rock-dwelling cactus *Mammillaria fraileana* affect plant growth and mobilization of elements from rocks. *Environmental and Experimental Botany* 81:26– 36.

Loureiro, C. B., Borges, K. S., Andrade, A. F., Tone, L. G., Said, S. 2012. Biochemical characterization of native and pegylated form of L-Asparaginase produced by *Aspergillus terreus*: evaluation in vitro of antineoplastic activity. *Advances in Microbiology* 2, 138-145.

Loro, M., Valero-Jiménez, C. A., Nozawac, S., Márquez, L. M. 2012. Diversity and composition of fungal endophytes in semiarid Northwest Venezuela. *Journal of Arid Environmental* 85:46-55.

Malinowski, D. P., Brauer, D. K., Belesky, D. P. 1999 *Neotyphodium coenophialum*-endophyte affects root morphology of tall fescue grown under phosphorus deficiency. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183, 53–60.

Maracajá, P. B., Benevides, D. S. 2006. Estudo da Flora Herbácea da Caatinga no Município de Caraúbas no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 6:165-175.

Mariath, I. R., Falcão, H. S., Barbosa-Filho, J. M., Sousa, L. C. F., Tomaz, A. C. A., Batista, L. M., Diniz, M. F. F. M., Athayde-Filho, P. F., Tavares, J. F., Silva, M. S., Cunha, E. V. L. 2009. Plants of the American continent with antimalarial activity. *Rev Bras Farmacogn* 19: 158-192.

- Mashburn, L. T. & Wriston, J. C., Jr. 1963. Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 50.
- Meiado, V. M., Albuquerque, L. S. C., Rocha, E. A., Rojas-Aréchigas, M., Leal, I. R. 2010. Seed germination responses of *Cereus jamacaru* DC. ssp. (Cactaceae) to environmental factors. *Plant Species Biology* 25:120-128.
- Mishra, A. 2006. Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from *Aspergillus niger* using agricultural waste in solid state fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135(1), 33–42.
- Mitchell, Hoogendoorn, H., Giles, A. R. 1994. Increased endogenous thrombin generation in children with acute lymphoblastic leukemia: risk of thrombotic complications in L-asparaginase induced antithrombin III deficiency. *Blood*; 83:386-391.
- Mitchell, A. M., Strobel, G. A., Hess, W. M., Vargas, P. N., Ezra, D. 2008. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Anans ananassoides* in the Bolivian Amazon. *Fungal Diversity* 31:37–43.
- Mohamed, R., Jong, P. L., Zali, M. S. 2010. Fungal diversity in wounded stems of *Aquilaria malaccensis*. *Fungal Divers* v.43, p.67–74, doi:10.1007/s13225-010-0039-Z
- Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S. A., Splittstoesser, W. E. 1996. A note on the uses of *Opuntia* spp. in Central/North America. *Journal of Arid Environments* 32(3):347-353.
- Muller, H. J., Boos, J. 1998. Use of L-asparaginase in childhood ALL. *Crit Rev Oncol Hematol.* 282: 97-113.
- Murali, T. S., Suryanarayanan, T. S., Venkatesan, G. 2007. Fungal endophytes communities in two tropical forest of southern India: diversity and host affiliation. *Mycol Prog* 6:191–199 Nakahama K, Imada A, Igarasi S, Tubaki K 1973. Formation of L-asparaginase by *Fusarium* species. *J Gen Microbiol* 75: 269-276.
- Nadeem, M., Mauji, R., Pravej, A., Ahmad, M. M., Mohammad, A., Qurainy, F. A., Khan, S., Abdin, M. Z. 2012. *Fusarium solani*, P1, a new endophytic podophyllotoxin-producing fungus from roots of *Podophyllum hexandrum*. *Afr J Microbiol Res* 6:2493–2499.
- Nakahama, K., Imada, A., Igarasi, S., Tubaki, K. 1973. Formation of L-asparaginase by *Fusarium* species. *J Gen Microbiol* 75: 269-276.
- Narta, U. K., Kanwar, S. S., Azmi, W. 2007. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia, *Critical Reviews in Oncology Hematology*, v.61, p.208-221.
- Oettgen, H. F., Old, L. J., Boyse, E. A., Campbell, H. A., Bayard, D., Clarkson, B. D., Tallal, L., Leeper, R.D., Schwartz, M. K. 1967. Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res* 27: 2619-2631.

- Ohnuma, T., Holland, J. F., Freeman, A. & Sinks, L. F. 1970. Biochemical and pharmacological studies with asparaginase in man. *Cancer Res* 30: 297–305.
- Oliveira, A. J. B., Da Machado, M. F. P. S. 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Appl Biochem Biotechnol* 104:149–155
- Olsrud, M., Michelsen, A., Wallander, H. 2007. Ergosterol content in ericaceous hair roots correlates with dark septate endophytes but not with ericoid mycorrhizal colonization. *Soil Biol Biochem* v.39, p.1218–1221. doi:10.1016/j.soilbio.2006.11.018
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E., Rodriguez, J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Divers* v.33, p.77–86.
- Patro, K. R., Gupta, N. 2012. Extraction, purification and characterization of L-Asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *Biology Research* 3, 30-34.
- Patro, K.R.P., Basak, U.C., Mohapatra, A.K., Gupta, N. 2014. Development of new medium composition for enhanced production of L-asparaginase by *Aspergillus flavus*. *Journal of Environmental Biology*, 12: 167-174.
- Pradhan, B., Dash, S. K., Sahoo, S. 2013. Optimization of Some Physical and Nutritional Parameters for the Production of L-asparaginase by Isolated Thermophilic *Pseudomonas aeruginosa* strain F1. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, June Vol. 10(1), 389-395.
- Pedreschi, F., Kaack, K. and Granby, K. 2008. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chem* 109, 386–392.
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., McMahon, T. A. 2007. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*v.4, ed.2.
- Pereira, I. M., Andrade, L. A., Costa, J. R. M., Dias, J. M. 2001. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. *Acta Botanica Brasilica* 15(3):413-426.
- Pereira, R. M. A., Filho, J. A. A., Lima, R.V., Paulino, F. D. G., Lima, A. O. N., Araújo, Z. B. 1989. Estudos fenológicos de algumas espécies lenhosas e herbáceas da caatinga. *Ciência Agronômica* 20:11-20.
- Peterson, R. E. & Cieglera. 1969a. L-Asparaginase production by *Erwinia aroideae*. *Applied Microbiology* 18, 64-67.
- Peterson, R. E. & Cieglera,. 1969b. L-Asparaginase production by various bacteria. *Applied Microbiology* 17, 929-930.
- Petrini, O., Stone, J., Carroll, F. E. 1992. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can J Bot* 60:789–796
- Pimentel, G. R. Fruticultura brasileira, 13ed. São Paulo: Nobel, 2007.

Pinheiro, I.O., Araujo, J.M., Ximenes, E.C.P.A., Pinto, J.C.S., Alves, T.L.M. 2001. Production of L-asparaginase by *Zymomonas mobilis* strain CP4. *Biomaterial and Diagnostic BD 06*: 243- 244.

Portal Da Saúde, 2012. Disponível em:
<<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/imprensa/3400/162/saude-lanca-perfil-%3Cbr%3Edo-cancer-para-2012.html>>

Portal Da Transparência, 2012. Disponível em:
<http://www.portaltransparencia.gov.br/despesasdiarias/empenho?documento=250052000012012NE801976>

Puente, M. E., Bashan, Y., Li, C.Y., Lebsky, V.K. 2004a. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology* 6:629-642.

Puente, M. E., Li, C.Y., Bashan, Y. 2004b. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biology* 6:643-649.

Puente, M. E., Li, C. Y., Bashan, Y. 2009a. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environmental and Experimental Botany* 66:389–401

Puente, M. E., Li, C. Y., Bashan, Y. 2009b. Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 66:402–408.

Qui, F., Zhan, Y., Zeng, F., Jing, T. 2012. Effect of endophytic fungi on the growth situation in cell suspension cultures of *Acer ginnala* Maxim. *AMR* 343-344, 384-390.

Raghukumar, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. *Fungal Divers* v.31, p.19–35, 2008.

Reddy, V. S., Jayaramh., N., Sirsi, M. & Ramakrishnta. N. 1969. Inhibitory activity of L-asparaginase from *Mycobacterium tuberculosis* on Yoshida ascites sarcoma in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 132, 262-267.

Reynolds, D. R., Taylor, J. W. 1993. *The Fungal Holomorph: A Consideration of Mitotic Meiotic and Pleomorphic Speciation*, CAB International, Wallingford, UK.

Rim, S. O., Lee, J. H., Choi, W. Y., Hwang, S. K., Suh, S. J., Lee, I. J., Rhee, I. K., Kim, J. G., 2005 *Fusarium proliferatum* KGL0401 as a new gibberellins-producing fungus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15, 4, 809–814.

Rowley, B. & Wriston, J. C., Jr. 1963. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 160.

Salema, S. 1966. Doces em caldas, velha tradição brasileira. *Jornal do Commercio*. Rio de Janeiro. In: *Jangada Brasil* .v.5, <http://www.jangadabrasil.com.br/abril56/cp56040b.htm>, acesso em 12 de fevereiro de 2006.

Salim, N., Abdelwaheb, C., Rabah, C., Ahcene, B. 2009. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *Afr J Biotechnol* 8 (8):1623–1624

Sánchez Márquez, S., Bills, G. F., 2008. Zabalgoeazcoa, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Divers* v.33, p.87–100.

Sánchez, S., Bills, G. F., Domínguez, A. L., Zabalgoeazcoa, I. 2010. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. *Fungal Divers* v.41, p.115–123.

Sati, S. C., Pargaein, N., Belwal, M. 2009. Diversity of aquatic hyphomycetes as root endophytes on pteridophytic plants in Kumaun Himalaya. *J Am Sci* v.5, n.4, p.179–182.

Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M., Faeth, S.H. 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends Plant Sci* 9(6):275–280.

Saikkonen, K., Saari, S., Helander, M. 2010. Defensive mutualism between plants and endophytic fungi? *Fungal Divers* 41:101–113.

Sarquis, M. I. M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., Costa, G. L. 2004. Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99:489-492.

Savitri, A. N., Azmi, W. 2003. Microbial L-asparaginase: a potential antitumor enzyme. *Indian J Biotechnol* 2:184–194.

Saxena, R. K., Sinha, U. 1981. L-Asparaginase and glutaminase activities in the cultures filtrates of *Aspergillus nidulans*. *Current Science* 50:281-219.

Scheinvar, L. 1995. Taxonomy of utilized *Opuntia*. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; PIMENTA-BARRIOS, E. (Ed.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. Roma: FAO, p. 20-27,

Scheinvar, L. *Cactáceas. Flora Ilustrada Catarinense*, Itajaí, 1985.

Sher, A., Goldberg, D. E., Novoplansky, A. 2004. The effect of mean and variance in resource supply on survival of annuals from Mediterranean and desert environments. *Oecologia* 141:353-362.

Schulz, B., Boyle, C.. 2006. What are endophytes. In: Sieber, T.N. (Ed.), *Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, p.1–13.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Aust, H. J., Römmert, A. K., Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106(9):996-1004.

Schwinning, S., Sala, O. E. 2004. Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* 141:211-220.

Siddalingeshwara, K. G. and Lingappa K. 2010. Key Fermentation Factors For The Synthesis Of L-Asparaginase - An Anti Tumour Agent Through Ssf Methodology. *An International Journal Of Pharmaceutical Sciences*. vol.1: 103-112.

Silva, F. A. S. & Azevedo, C. A. V. 2009. Principal components analysis in the software Assisat – Statistical Assistance. *In World Congress on Computers in Agriculture*. 7th ed, American Society of Agricultural and Biological Engineers, Reno.

Silva, J. G. M., Silva, D. S., Ferreira, M. A., Lima, G. F. C., Melo, A. A. S., Diniz, M. C. N. M. 2005. Xiquexique (*Pilosocereus gounellei* (A. Weber ex K. Schum.) Bly. Ex Rowl.) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) na alimentação de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, p.1408-1417.

Silva, R. L. O., Luz, J. S., Silveira, E. B., Cavalcante, U. M. T. 2006. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Bot Bras* 20:649–655.

Srivardhana, N., Jeon, Y. L. 2004. Antioxidative effect of cactus pear fruit (*Opuntia ficus-indica*) extract on lipid peroxidation inhibition in oils and emulsion model systems. *Eur Food Res Technol*. 219:369–376.

Shaffer, P. M., A. R. S. T., H. N. Jr., Estberg, L., Fernando, L., Tran, L. Y., Sitter, M. 1988. An asparaginase of *Aspergillus nidulans* is subject to oxygen repression in addition to nitrogen metabolite repression. *Mol. Gen. Genet*. 212(2), 337–341.

Shrivastava, A., Khan, A. A., Shrivastav, A., Jain, S. K., Singhal, P. K. 2012. Kinetic studies of L-Asparaginase from *Penicillium digitatum*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 42, 574-581.

Siqueira, V. M. De. 2008. Fungos endofíticos de folhas e caule de *Lippia sidoides* Cham. E avaliação da atividade antimicrobiana. Recife: Universidade Federal de Pernambuco 94fls. Dissertação (Mestrado: Biologia de Fungos) – UFPE, 2008.

Soliman N. A., Berekaa, M. N., Abdel-Fattah, Y. R. 2005. Polyglutamic acid production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69:259-67.

Soniyamby, A.R, Lalitha, S., Praveesh, B.V, Priyadarshini, V. 2011 Isolation, production and anti tumor activity of L-asparaginase of *Penicillium* sp. *International Journal of Microbiological Research*. 2(1): 38-42.

Soniyamby, Ambi, Rani, Lalitha, Sundaram, Praveesh, Bahuleyan, Vasantha. 2012. Isolation And Screening Of L-Asparaginase Producing Fungi From Soil Samples. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 4, Issue 1, 279-282.

Sreenivasulu, V., Jayaveera, K. N. and Rao, P. M. 2009. Optimization of process parameters for the production of L-asparaginase from an isolated fungus. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1: 30-34.

Stadler, M., Keller, N. P. 2008. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. *Mycological Research* v.112, p.127–130.

Stamford, T. L. M., Stamford, N. P., Coelho, L. C. B. B. Araujo, J. M. 2002. Production and characterization of a *thermostable glucoamylase* from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technology*, v.83, p.105-109,

Stierle, A., Strobel, G. A., Stierle, D. 1993. Taxol and taxen production by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260:214–216.

Stone, J. K.; Polishook, J. D.; White, Jr. F. 2004. Endophytic Fungi. In: Muller, J. M.; Bills, G. F.; Foster, M. S. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods. San Diego: *Elsevier Academic Press*, p.241-270.

Strobel, G. A., Stierle, A., Stierle, D., Hess, W. M. 1993. *Taxomyces andreanae* a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew. *Mycotaxon* 47:71–78.

Strobel, G. A., Hess, W. M., Ford, E., Sidhu, R. S., Yang, X. 1996. Taxol from fungal endophyte and issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology* 17, 417–423.

Strobel, G. A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22:315-333.

Strobel, G. A.; Daisy, B. 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.67, n.4, p.491-502.

Strobel, G. A., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products* 67:257–268.

Sun, Y., Wang, Q., Lu, X., Okane, I., Kakishima, M. 2012. Endophytic fungal community in stems and leaves of plants from desert areas in China. *Mycological Progress* 11(3):781-790.

Suryanarayanan, T. S. 2013. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology*. Volume 6, Issue 6, December, Pages 561–568.

Suryanarayanan, T.S., Venkatesan, G., Murali, T.S. 2003. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science* 85: 489–493.

Suryanarayanan, T. S., Wittlinger, S. K., Faeth, S. H. 2005. Endophytic fungi associated with cacti in Arizona. *Mycological Research* 109:635–639.

Suryanarayanan, T. S., Murali, T. S., Thirunavukkarasu, N., Rajulu, M. B. G., Venkatesan, G., Sukumar, R. 2011. Endophytic fungal communities in woody perennials of three tropical forest types of the Western Ghats, southern India. *Biodivers Conserv* 20:913–928.

- Suto, M., Takebayashi, M., Sait, K., Tanaka, M., Yokota, A., Tomita, F. 2002. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.93, n.1, p.88-90.
- Swatzell, L. J., Powell, M. J., Kiss, J. Z. 1996. The relationship of endophytic fungi to the gametophyte of the fern *Schizaea pusilla*. *Int J Plant Sci* v.157 p.53–62,
- Tabarelli, M., Silva, J. M. C. 2003. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Caatinga. In: LEAL, I.R., TABARELLI, M., SILVA, J.M.C. (eds.). *Ecologia e conservação da Caatinga*. Univ. Federal de Pernambuco, Recife, pp. 777-796.
- Tao, G., Liu, Z. Y., Hyde, K. D., Lui, X. Z., Yu, Z. N. 2008. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae). *Fungal Divers*. 33: 101-122.
- Tan, R. X., Zou, W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18:448–459.
- Taylor, N. P., Zappi, D. 2002. Distribuição das espécies de Cactaceae na Caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B. et al. (eds.). *Vegetação e flora da Caatinga*. Associação Plantas do Nordeste – APNE, Centro Nordestino de Informações sobre Plantas – CNIP, Recife, PE.
- Taylor, N., Zappi, D. 2008. Diversidade e endemismo das Cactaceae na Cadeia do Espinhaço. *Megadiversidade* 4:1-2.
- Tejesvi, M. V., Ruotsalainen, A. L., Markkola, A. M., Pirttilä, A. M. 2010. Root endophytes along a primary succession gradient in northern Finland. *Fungal Divers* v.41, p.125–134,
- Tesoriere, L., Butera, D., A. M. P., Allerga, M., Liverea, M. A. 2004. Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr* 80(2):391–395.
- Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2007 Asparaginase production by endophytic fungi isolated from some Thai medicinal plants. *KMITL Sci. Tech. J* 7, S1, 13-18.
- Theantana, T., Hyde, K.D., Lumyong, S. 2009 Asparaginase production by endophytic fungi from Thai medicinal plants: cytotoxicity properties. *IJIB* 7, 1.
- Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Murali, T.S., Ravishankar, J.P., Gummadi, S.N. 2011. L-asparaginase from marine derived fungal endophytes of seaweeds. *Mycosphere* 2:147–155.
- Tosa, T., Sanor, Yamamoto, Nakamura, Andok, & Chibata, 1971. L-Asparaginase from *Proteus vulgaris*. *Applied Microbiology* 22, 387-392.
- Verna, N., Kumar, G., Anand, S. 2007. L-asparaginase: A Promising Chemotherapeutic Agent, *Critical Reviews in Biotechnology*. V.27, p.45-62.

Vesterlund, S-R., Helander, M., Faeth, S., Hyvönen, T., Saikkonen, K. 2011. Environmental conditions and host plant origin override endophyte effects on invertebrate communities. *Fungal Diversity* 47:109–118.

Xu, J., Ebada, S. S., Proksch, P. 2010. Pestalotiopsis a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Divers*. doi:10.1007/s13225-010-0055-z.

Wade, H. E., Elsworth, Herbert, Keppie, & Sargeant, 1968. A new L-asparaginase with antitumor activity. *Lancet* ii, 776-777.

Wade, H. E., Robinson, K. & Phillips, W. 1971. Asparaginase and glutaminase activities of bacteria. *Journal of General Microbiology* 69, 299-312.

Wang, B., Relling, M. V., Storm, M. C., Woo, M. H., Ribeiro, R., Pui, C. H., Hak, L. J. 2003. Evaluation of immunologic crossreaction of anti-asparaginase antibodies in acute lymphoblastic leukemia (ALL) and lymphoma patients. *Leukemia* 17:1583–1588.

Wang, Y., Dai, C-C. 2011 Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. Review article. *Ann Microbiol* 61:207–215.

Wiame, J. M., Grenson, M., Arst, N. H. Jr 1985. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv Microbiol Physiol* 26: 1-88.

Wolock-Madej, C., Clay, K. 1991. Avian seed preference and weight loss experiment: the role of fungal-infected fescue seeds. *Oecologia* v.88, p.296–302.

Woo, M. H., Hak, L. J., Storm, M. C., Sandlund, J. T., Ribeiro, R. C., Rivera, G. K., et al. 2000. Hypersensitivity or development of antibodies to asparagines does not impact treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*.18:1525–32.

Wriston, J. C., Yellin, T. O. 1973. L-asparaginase: A review. In: *Advances in enzymology* (Ed: A. Meister). John Wiley and Sons, Inc., New York. 39, 185-248 (1973).

Yamada, K. 1970. Antileukemia activity of L-asparaginase. *Igaku no Ayumi* 72, 112-113.

Zanetti, R. 1994. Análise fitossociológica e alternativas de manejo sustentável da mata da agronomia, Viçosa, Minas Gerais. Trabalho integrante do conteúdo programático da disciplina Manejo Sustentado de Florestas Naturais. Viçosa: UFV.

Zappi, D., Aona, L. 2007. Cactaceae in Flora brasiliensis revisitada. Disponível em: <<http://flora.cria.org.br>>. Acesso em: junho de 2007.

Zhang, H. W., Song, Y. C., Tan, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat. Prod. Rep.* v.23, p.753–771.

Zou, D., Brewer, M., García, F., Feugang, J. M., Wang, J., Zang, R., Liu, H., Zou, C. 2005. Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutr J* 4:25–36.