



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

PETAÏN JOSE FERREIRA NETO

**Isolamento e purificação parcial de L-asparaginase
produzida por actinobactéria em solo do Cerrado**

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Petain Jose Ferreira Neto		
E-mail:	prof.petain@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Estudante de Mestrado		
Agência de fomento:	Não	Sigla:	
País:	Brasil	UF:GO	CNPJ:
Título:	Isolamento e purificação parcial de L-asparaginase produzida por actinobactéria em solo do Cerrado		
Palavras-chave:	L-asparaginase, Streptomyces, Inibidor da reação de Maillard. Enzima antitumoral.		
Título em outra língua:	Isolation and partial purification of L-asparaginase produced by actinobacteria in soil of the Cerrado		
Palavras-chave em outra língua:	L-asparaginase, Streptomyces, Inhibitor of the Maillard reaction. Antitumor enzyme.		
Área de concentração:	Biologia da relação parasito-hospedeiro		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	13/07/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Biologia da relação parasito-hospedeiro		
Orientador (a):	Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira		
E-mail:	jdgvieira62@yahoo.com.br		
Co-orientador (a):*			
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: 25/04/2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

PETAIN JOSE FERREIRA NETO

**Isolamento e purificação parcial de L-Asparaginase
produzida por actinobactéria em solo do Cerrado**

Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia das Relações
Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. José Daniel
Gonçalves Vieira

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Ferreira Neto, Petain Jose

Isolamento e purificação parcial de L-asparaginase produzida por
actinobactéria em solo do Cerrado [manuscrito] / Petain Jose Ferreira
Neto. - 2015.

xx, 90 f.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) , Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. L-asparaginase. 2. Streptomyces. 3. Inibidor da reação de Maillard.
4. Enzima antitumoral.. I. Vieira, José Daniel Gonçalves, orient. II. Título.

I

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Petain Jose Ferreira Neto

Orientador (a): Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Membros:

1. Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

2. Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro

3. Dra. Ana Beatriz Mori Lima

Data:13/07/2015

“O papel dos infinitamente pequenos na Natureza é infinitamente grande.”
Louis Pasteur

*Entender que todos estamos em constante aprendizado.
Foi uma das várias lições que meus pais sempre me ensinaram,
hoje entendo cada uma esta lição, além das várias outras.
Por isso dedico este trabalho às pessoas que me serviram de pilar,
que me permitiram crescer como estudante e como pessoa,
aos meus pais (Amilton José Ferreira e Valdeci Justino da Silva) e minha família.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Professor Dr. José Daniel Gonçalves Vieira (vulgo **Capitão Caverna; The Boss**) pela oportunidade dada de me aprimorar; pela orientação neste trabalho. Agradeço pelos momentos de (enorme) paciência dele para com a minha pessoa.

Ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública pela oportunidade de realização deste curso de pós-graduação.

Ao professor Dr. Marcos Antônio de Oliveira, por me oferecer a oportunidade de realizar uma parte dos experimentos do presente trabalho no Laboratório de Biologia Molecular e Estrutural (LABIMES) da Universidade Estadual Paulista – Campus Experimental do Litoral Paulista.

Ao Doutorando Carlos Alexandre Breyer, do mesmo laboratório, por seu auxílio e orientação na parte experimental lá realizada.

À professora Dra. Keili Maria Cardoso de Souza por sua colaboração com as correções (que foram muitas), a este trabalho, também por sua instrução especialmente na parte molecular deste trabalho.

Ao professor Dr. Evandro Leão Ribeiro por seu auxílio, principalmente na correção dos erros linguísticos por mim cometidos.

A Dra. Ana Beatriz Mori Lima por sua paciência com as importantes correções ao trabalho de qualificação e por sua participação na banca de defesa.

Ao Mestre Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira (**Brunao Brasil**), companheiro de mestrado, que teve grande participação na maioria dos ensaios realizados neste trabalho.

À Ariana Alves Rodrigues (**Chefa**) que ajudou muito com conselhos da parte prática deste trabalho, além dos companheiros de laboratório, que muito me auxiliaram nesta empreitada: Marcus Forzani Araújo, Renan Souza Soares (**Lorde Renan**), Thaís Maitan Vieira, Igor Daniel Ribeiro (**Sr. Ribeiro**).

À minha família, sem a qual eu não teria chegado até este momento, pelo suporte (financeiro e moral) para a realização deste aprimoramento pessoal e profissional.

À Daniela Braz dos Santos pelo carinho, compreensão, incentivo e apoio dado para a realização deste trabalho.

À **Dona Vera** Lúcia da Penha e **àquela senhora** Leda Maria Valadão pelos ensinamentos mediados ao longo destes anos de LAMAB.

A todos aqueles, que de uma forma direta ou indireta, colaboraram na realização e conclusão deste trabalho, minha sincera gratidão e reconhecimento.

SUMÁRIO

TABELAS E FIGURAS	X
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Cerrado	1
1.1.1 Solo do Cerrado	4
1.2 Actinobactérias.....	6
1.2.1 Actinobactérias em solo	9
1.2.2 Enzimas de actinobactérias	10
1.3 Câncer.....	11
1.3.1 Leucemia Linfoblástica Aguda	15
1.4 Acrilamida	16
1.4.1 Acrilamida na indústria alimentícia.....	17
1.4.2 Efeitos da acrilamida no organismo	20
1.5 Enzimas	20
1.5.1 Utilização terapêutica de enzimas (produção biotecnológica)	21
1.5.2 L-Asparaginase	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MÉTODOS	28
4.1 Coleta e processamento das amostras	28
4.2 Isolamento das actinobactérias	28
4.3 Triagem dos isolados para atividade sobre L-asparagina	30
4.4 Fermentação da asparagina por fermentação submersa.....	31
4.5 Purificação parcial da L-asparaginase	31

4.6 Determinação da atividade L-asparaginase	32
4.7 Otimização da atividade enzimática	33
4.7.1 Temperatura ótima	33
4.7.1 pH ótimo	34
4.8 Dosagem de proteínas nas soluções fracionadas	33
4.9 Caracterização do isolado produtor de L-asparaginase	35
4.9.1 Caracterização morfológica.....	35
4.9.1.1 Macromorfologia	35
4.9.1.2 Micromorfologia.....	35
4.9.1.2.1 Microscopia ótica.....	35
4.9.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	36
4.9.1.2.2.1 Preparação das amostras biológicas	36
4.9.1.2.2.2 Observação em microscópio eletrônico de varredura	37
4.9.2 Caracterização fisiológica e bioquímica	38
4.9.2.1 Testes nutricionais e de tolerância.....	38
4.9.2.2 Testes enzimáticos e de degradação.....	39
4.9.3 Caracterização molecular.....	41
4.9.3.1 Extração do DNA genômico	41
4.9.3.2 Amplificação do segmento gênico do 16S rRNA.....	42
4.9.3.3 Purificação dos produtos de PCR	43
4.9.3.4 Sequenciamento da região gênica do 16S rRNA.....	43
4.9.3.5 Identificação molecular com base nas sequências gênicas de 16S rRNA	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Isolamento das actinobactérias.....	45
5.2 Teste de atividade enzimática sobre L-asparagina	45
5.3 Fermentação submersa	47
5.4 Purificação parcial da L-asparaginase	47
5.5 Otimização da atividade enzimática.....	48
5.5.1 Otimização da temperatura	48
5.5.2 Otimização do pH.....	50
5.6 Caracterização do isolado.....	52
5.6.1 Caracterização morfológica.....	52
5.6.1.1 Macromorfologia	52

5.6.1.2 Micromorfologia.....	54
5.6.2 Caracterização fisiológica e bioquímica	55
5.6. Caracterização molecular.....	58
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	66
8 REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	86
ANEXO IA.....	86
ANEXO IB.....	92

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1	Concentração média, mínima e máxima de acrilamida encontrada em alguns alimentos na Suécia adaptado de Neri (2004).	18
Tabela 2	Índice enzimático das morfoespécies isoladas de amostra do solo do Cerrado.	47
Tabela 3	Produção de pigmento difusível relativo a melanina pelo isolado produtor de L-asparaginase.	53
Tabela 4	Características culturais do crescimento dos isolados de actinobactérias nos meios específicos de caracterização taxonômica após 14 dias de cultivo a 30°C.	53
Tabela 5	Diferentes características fenotípicas do isolado BC-A.1. ...	55
Figura 1	Localização da vegetação do Cerrado no Brasil (MMA & IBAMA 2011).	2
Figura 2	O gradiente fitofisionômico do Cerrado, segundo Coutinho (1978), modificado por Ruggiero et al. (2002).	3
Figura 3	Chave taxonomica proposta para o filo Actinobacteria de acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (adaptado de Gao; Gupta, 2012).	7
Figura 4	Etapas no desenvolvimento do câncer metastático, adaptado de Souhami & Tobias (2005a).	13
Figura 5	Estrutura molecular da acrilamida (Arisseto & Toledo 2006). ...	16

Figura 6	Mecanismo de formação da acrilamida na batata (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (Zyzak et al. 2003).19
Figura 7	Mecanismo de ação da enzima L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) sobre o aminoácido L-asparagina (Adaptada de Roth, 2011).24
Figura 8	Estrutura tridimensional da enzima L-asparaginase de <i>Erwinia chrysanthemi</i> (1hfj), no <i>Protein Data Bank</i> (PDB), segundo (Jaskólski et al. 2001).24
Figura 9	Câmara de quimiotaxia aplicada no isolamento de Actinoplanetes, segundo modelo de Palleroni, (1976b).29
Figura 10	Curva de calibração de sulfato de amônio.33
Figura 11	Representação esquemática da Microplaca™ GEN III da Biolog39
Figura 12	Halos de atividade enzimática dos isolados BC-A.1 (a), BC-A.8 (b), BC-A.18 (c) e BC-A.10 (d) após 120 horas de crescimento.46
Figura 13	Meio de cultura indutor após 120 horas de cultivo sob agitação rotativa.47
Figura 14	Dosagem da quantidade de proteínas presentes nas no extrato bruto (E.B.) e nas frações: dialisado precipitado saturado a 60% com sulfato de amônio (DP 60), dialisado precipitado saturado a 80% (DP 80), dialisado sobrenadante saturado a 60% (Sob 60) e dialisado sobrenadante saturado a 80% (Sob 80).49

Figura 15	Gráficos demonstrando a produção de íons de amônia de cada uma das frações testadas, tendo a temperatura como variável: Extrato Bruto (a); dialisado sobrenadante saturado a 60% (b); dialisado precipitado saturado a 80% (c); dialisado precipitado saturado a 60% (d) e dialisado sobrenadante saturado a 80% (e).50
Figura 16	Gráficos demonstrando a produção de íons de amônia de cada uma das frações testadas, tendo o pH como variável: Extrato Bruto (a); dialisado sobrenadante saturado a 60% (b); dialisado precipitado saturado a 80% (c); dialisado precipitado saturado a 60% (d) e dialisado sobrenadante saturado a 80% (e).52
Figura 17	Morfoespécie inoculada nos meios ISP-2 (a), ISP-3 (b), ISP-4 (c1), ISP-5 (c2), ISP-6 (c4), ISP-7 (c5) e Suter sem a presença de tirosina (c3) e com a presença de tirosina (c6).54
Figura 18	Cadeia de esporos vista em aumento de 1000X (A) em microscópio óptico; visualização de cadeia de esporos isolada (B) (aumento de 5.000X); visualização de várias cadeias de esporos (aumento de 2.500X) (C) da morfoespécie BC-A.1.55

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ABM	Ágar de Bennet modificado
AC	Ágar Amido-Caseína
ALL	<i>Acute Lymphoblastic Leukemia</i>
BC/UFG	Biblioteca Central da UFG
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BB	<i>Bromothymol blue</i>
BSB	<i>Bovine serum albuminum</i>
CBS	Cabine de Segurança Biológica
°C	Graus Celsius
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>
DAP	<i>Diaminopimelic acid</i>
DHISTO/UFG	Departamento de Histologia da UFG
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfato
DP 60	Fração saturada a 60% de sulfato de amônio dialisada e precipitada
DP 80	Fração saturada a 80% de sulfato de amônio dialisada e precipitada
EB	Extrato bruto sobrenadante do caldo de indução enzimática
EC	<i>Enzymatic classification</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FR	Vermelho de fenol
g	Aceleração da gravidade
GPS	<i>Guinea Pig Serum</i>
h	Hora (s)
HDMS	Hexa-metil-disilano
HMF	<i>Hidroxymethylfurfural</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IE	Índice Enzimático
IF	Instituto de Física
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
ISP	<i>International Streptomyces Project</i>
km	Quilômetro (s)
L	Litro (s)
μL	Microlitro (s)
mL	Mililitro (s)
LABEM	Laboratório de Estudos Morfológicos
LabMic	Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução
LAMAB	Laboratório de Microbiologia Aplicada e Biotecnologia
m	Metro (s)
mm	Milímetro (s)
ηm	Nanômetro
M	Molar
mM	Milimolar

MBA	Ágar Bennet's modificado
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
mg	Miligrama (s)
nBLAST	<i>Nucleotide BLAST</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	<i>Natural Killers</i>
ONG	Organização Não Governamental
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietileno glicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
rDNA	<i>Ribosomal Desoxiribonucleic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	Rotações por minuto
rRNA	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
S	<i>South</i>
SDS	Sulfato Duodecil de Sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
Sob 60	Sobrenadante da fração saturada a 60% de sulfato de amônio dialisada.
Sob 80	Sobrenadante da fração saturada a 80% de sulfato de amônio dialisada.
TAE	Tris/Acetato/EDTA
TBE	Tris/Borato/EDTA

TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i>
TE	Tris-EDTA
UCB	Universidade de Brasília
UFG	Universidade Federal de Goiás
UV	Radiação Ultravioleta
V	Volts
W	<i>West</i>

RESUMO

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil. Tal ambiente possui um solo diferenciado de várias outras regiões. Existem vários seres vivos neste Bioma, dentre estes, as actinobactérias. São micro-organismos cujas células têm parede celular Gram-positiva, >50% de G+C (guanina + citosina) em seu DNA, produzem diversas substâncias com alto valor agregado. Actinobactérias são importantes produtores de enzimas úteis aos seres humanos. A enzima L-asparaginase é utilizada na terapia de Leucemias Linfoblásticas Agudas (ALL) sendo também empregada no pré-tratamento de alimentos ricos em açúcares redutores, inibindo a formação de acrilamida. O objetivo deste estudo foi produzir a enzima L-asparaginase a partir de uma actinobactéria isolada do solo, caracterizar a enzima e identificar a espécie do isolado bacteriano. Uma amostra do solo foi coletada no Cerrado e passou por um pré-tratamento. Foi utilizada a quimiotaxia dos esporos de *Actinoplanetes* para a seleção deste organismo. Foram recuperadas 19 morfoespécies. Utilizou-se um meio indutor de L-asparaginase, e o halo róseo ao redor da colônia medido. O isolado BC-A.1 produziu o maior halo em tempo menor, com índice enzimático médio de 4,1. Após a realização das etapas de produção, purificação parcial e otimização da atividade enzimática, percebeu-se que a enzima produzida pela morfoespécie isolada é muito eficiente a 40°C e pH 8,0. Foram realizados testes bioquímicos, fisiológicos e moleculares, bem como a observação em microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura, mas não foi possível identificar a espécie do isolado, provavelmente pertence ao gênero *Streptomyces*.

Palavras chave: L-asparaginase, *Streptomyces*, Inibidor da reação de Maillard, Enzima antitumoral.

ABSTRACT

The Cerrado is the second largest biome in Brazil. Such an environment has a different soil several other regions. There are various living beings in this biome, among them, the actinobacteria. They are microorganisms whose cell wall Gram-positive, >50% G+C (guanine + cytosine) in its DNA, produce substances with high economic value. Actinobacteria are major producers of enzymes useful to humans. L-asparaginase enzyme is used in acute lymphoblastic leukemias therapy (ALL) also being used in the pre-treatment of foods rich in reducing sugars, inhibiting the formation of acrylamide. The aim of this study was to produce L-asparaginase enzyme isolated from a soil actinobacteria, characterize the enzyme and identify the species of bacteria isolated. A soil sample from Cerrado was collected and submitted to a pretreatment. Chemotaxis of Actinoplanetes spores used for the selection of this organism. Nineteen morphospecies were recovered. We used a medium inducing L-asparaginase, and the pink halo around the colony measured. Isolated BC-A.1 produced the largest halo in less time, with an average enzyme content of 4.1. After the completion of the production steps, partial purification and optimization of enzymatic activity, it was realized that the enzyme produced by isolated morphospecies is very efficient at 40 ° C and pH 8.0. Biochemical, physiological and molecular tests were performed, and the observation with optical microscopy and scanning electron microscopy, but it was not possible to identify the species isolated, probably belongs to the genus *Streptomyces*.

Keywords: L-asparaginase, *Streptomyces*, inhibitor of the Maillard reaction, Antitumor enzyme.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Cerrado

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, cobrindo uma área de cerca de dois milhões de km², perdendo apenas para a Floresta Amazônica. Está localizado em sua maior parte nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste. Este bioma compreende cerca de 21 (Klink & Machado 2005) a 24% (Veronez et al. 2010) da cobertura vegetal do Brasil (Figura 1). Sua vegetação é xeromórfica, com árvores de troncos grossos e retorcidos, uma adaptação ao ambiente com queimadas frequentes e solo com altas concentrações de alumínio trocável; tal característica contrasta com as florestas existentes no Brasil, que são formadas por árvores altas e troncos retilíneos (IBGE 2012). A vegetação deste bioma é composta por plantas de fisionomia de Savana e de florestas semidecíduas, durante o período de seca as plantas perdem suas folhas como forma de economia de água (Klink & Machado 2005; Eiten, 1972).

O índice precipitações de chuvas anuais no Cerrado é moderado, entretanto, não é bem distribuído. O clima na região central do Brasil é marcado por seu índice pluviométrico, com uma época do ano muito chuvosa (de outubro a março) e outra época bastante seca (de abril a setembro). Os índices pluviométricos das Savanas podem variar de 750 a 2.000mm anuais (Walter 2006).

Os primeiros debates sobre o Bioma Cerrado remontam ao século XIX. Quando os primeiros pesquisadores tentaram descrever as principais características dessa vegetação e a conceituar o significado do Cerrado enquanto Bioma (IBGE, 2012; Ruggiero et al. 2002). O fato do Cerrado apresentar diferentes fitofisionomias, é o que mais dificulta sua classificação: Campo Limpo, Campo Sujo, Campo-Cerrado, Cerrado *Sensu Stricto* e Cerradão (Figura 2).

A formação de **Campo Limpo** é composta de vegetais herbáceos; **Campo Sujo** possui componentes vegetais arbustivos e, em maior parte,

plantas herbáceas; **Campo-Cerrado** é uma formação vegetativa de pequenos arbustos e árvores lenhosas esparsas; **Cerrado *Sensu Stricto*** possui rica vegetação lenhosa e arbustiva; e o **Cerradão**, onde os componentes arbóreos são mais elevados e lenhosos, com árvores que podem ultrapassar os 10m de



Figura 1. Localização da vegetação de Cerrado no Brasil (MMA & IBAMA 2011).

altura, além das **Matas de Galeria**, que estão localizadas próximas aos leitos de rios, muito comuns na Savana Brasileira, que é também a nascente da maioria dos rios das principais bacias hidrográficas brasileiras (Eiten 1972, Mendonça et al. 1998, Ruggiero et al. 2002).

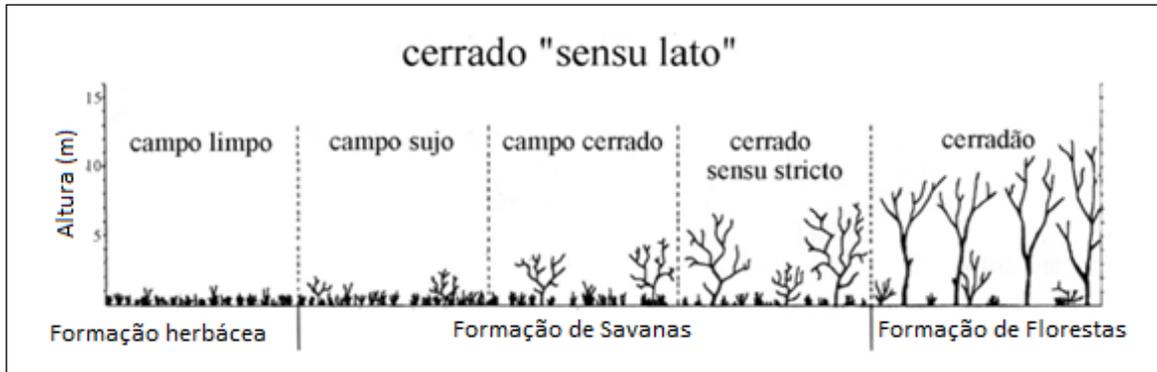


Figura 2. O gradiente fitofisionômico do Cerrado, segundo Coutinho (1978), modificado por Ruggiero et al. (2002).

Uma das características mais marcantes na vegetação do Cerrado é o fato de as raízes possuírem uma grande penetração no solo, para poderem alcançar o lençol freático, que é muito profundo neste ambiente. Estas raízes podem chegar até mais de 10 metros de profundidade. Outra particularidade do Bioma é a boa permeabilidade que o solo possui, permitindo, assim, que a água atinja grandes profundidades (Walter 2006).

Segundo Coutinho (1978) o Cerrado abriga uma biodiversidade de animais (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e uma variedade de invertebrados) e plantas (principalmente angiospermas) muito grande, mas existem poucos estudos na literatura com o objetivo de identificar os micro-organismos do referido Bioma. Vários destes seres vivos são típicos do Cerrado e estão em risco de extinção, devido as ações antrópicas. Neste bioma é grande a variedade de plantas já identificadas e catalogadas, a identificação das espécies deste Bioma é importante para estudos ecológicos, bem como para a bioprospecção de compostos, tanto de plantas quanto dos micro-organismos presentes no solo (Mendonça et al., 1998; von der Weid et al. 2000).

O desmatamento do Cerrado brasileiro tem avançado cada vez mais, principalmente por causa da agricultura, extrativismo e das queimadas (Pavinato et al. 2009). Segundo Klink & Machado (2005), em 2002 o Cerrado contava com

apenas 55% de sua cobertura original. Segundo a Organização Não Governamental (ONG) – *Conservação Internacional Brasil*, o Cerrado tem hoje menos de 20% da sua cobertura original. Este desmatamento prejudica muito o solo, pois o expõe às condições acentuadas de intemperismo, fazendo com que este solo perca ainda mais nutrientes. Desta forma a quantidade de micro-organismos no solo acaba por decair cada vez mais, ocasionando extinção, causando uma grande perda na reciclagem de matéria orgânica.

Segundo Lopes & Guilherme (1994) e Walter (2006), utilizando a nomenclatura preconizada pela EMBRAPA (2006), os solos mais típicos no Cerrado brasileiro são os Latossolos (46%), Arenosos Quartzênicos (15%) e Podzólicos (15%). Em relação aos Latossolos, os mais comumente encontrados neste bioma são os Latossolos Vermelho-Amarelo e Vermelho. Walter (2006) afirma ainda que as diferentes fitofisionomias típicas do Bioma ocorrem nos diferentes solos, sendo que nos mais ricos em nutrientes ocorrem vegetações arbóreas mais ricas, e nos mais pobres em determinados nutrientes ocorrem formações vegetativas mais rasteiras.

1.1.1 Solo do Cerrado

O Cerrado possui um solo diferenciado de várias outras regiões brasileiras, sendo sua capacidade de drenagem das águas da chuva muito grande. Na época chuvosa, a água não se acumula por muito tempo sobre o terreno, indicando que após a precipitação, parte é drenada e uma parte evapora assim que essa se encerra. Possui características ácidas e com micronutrientes em escassez, apesar de ser muito comum a correção de pH (calagem) e adubação para a agricultura (Lopes & Guilherme, 1994).

É um solo muito profundo, podendo alcançar até 10 metros de profundidade, em contraste com as demais vegetações adjacentes, como o da Floresta Amazônica, que possui menos de um metro de profundidade, (Eiten, 1972; Klink & Machado, 2005).

O teor de matéria orgânica presente no solo do Bioma é reduzido, há também poucos nutrientes naturais, fato que poderia torná-lo inviável para as culturas agrícolas e suas expansões nesse ambiente, todavia é importante para

a economia do País, uma vez que as fronteiras agrícolas têm se expandido cada vez mais para este ambiente (Torres et al. 2005; Carneiro et. al. 2009).

O solo do Cerrado apresenta, geralmente, pH ácido e desequilíbrio na disponibilidade de micronutrientes, quantidades de cálcio, manganês e magnésio abaixo das necessárias para os seres vivos e quantidades de alumínio muito acima do necessário, tal característica ambiental, faz com que as plantas tenham adaptações específicas para este tipo de ambiente hostil, como apresentar o tronco bastante retorcido (Bayer et al. 2006; Pavinato et al., 2009; Silva, 2012).

Existem nutrientes dissolvidos no solo, entretanto, ao longo dos anos vem sofrendo uma grande lixiviação, devido a diversos fatores, como as chuvas e os regimes de agricultura. Como a vegetação não oferece cobertura necessária ao solo, este acaba por perder os poucos nutrientes derivados das rochas que se desgastaram ao longo dos anos (Walter 2006).

Green e colaboradores (2007) sugerem que os solos cultivados acabam perdendo ligeiramente a sua atividade enzimática em curtos períodos de cultivo. Este estudo foi realizado em apenas cinco anos, portanto seria difícil fazer inferências sobre o efeito dos cultivos em solos de Cerrado por longos períodos de tempo. Os autores reportaram que os solos naturais, apenas com vegetações nativas possuíam maior atividade do que os solos com algum tipo de interferência antrópica, mesmo aqueles que possuíam técnicas de aragem. Os autores ressaltaram ainda a importância da atividade biológica e sugerem que os solos cultivados podem ser recuperados, caso haja interrupção nas colheitas e ressaltam também a importância dessa atividade biológica para as vegetações nativas.

Além das espécies de animais e vegetais que habitam o Cerrado os micro-organismos são muito variados neste ambiente, tais como *Acidobacteria*, *Actinomicetos*, *Crenarcheote*, *Firmicutes* e outras Proteobacterias (Tagliaferro, 2005). Nos últimos anos os agentes microbianos presentes nos solos deste ambiente têm sido muito pesquisados, especialmente com a finalidade de bioprospecção de metabólitos úteis ao homem (Pereira et al., 1999; Gomes et al., 2000; Silva et al., 2013).

As actinobactérias possuem grande importância biotecnológica, estão entre os micro-organismos mais frequentes em solo do Cerrado e são as

maiores responsáveis pela reciclagem da matéria orgânica nos mesmos. Apesar de sua grande relevância ambiental, poucos são os estudos como objetivo de identificar os micro-organismos e sua variedade, presentes nos solos de Cerrado, e ainda menores são as pesquisas que fazem sua bioprospecção (Pereira et al., 1999; Gomes et al., 2000; Torres et al., 2005; Bayer et al., 2006; Silva et al., 2013).

1.2 Actinobactérias

Descrições de micro-organismos que apresentavam formação de hifas ramificadas datam desde o século XIX, apesar de o conhecimento sobre tais organismos ser muito escasso, uma vez que os equipamentos utilizados àquela época eram rudimentares para uma classificação mais exata.

A descrição mais precisa só ocorreu após a década de 1950, sendo previamente denominados de actinomicetos, uma clara referência ao que se acreditava pertencerem ao Reino *Fungi*. Várias doenças foram atribuídas às actinobactérias (confundidas com os fungos, devido à sua característica de formação de hifas ramificadas). Com o advento da biologia molecular e a comprovação da sua *Nature*za procariótica foram, taxonomicamente, melhor compreendidos (Waksman 1961; Lechevalier & Lechevalier 1970; Williams et al., 1983; Goodfellow et al, 1984; Ventura et al., 2007).

Inicialmente a única forma de identificação da espécie das actinobactérias tinha como base as características morfológicas das hifas. Posteriormente as técnicas químicas e bioquímicas proporcionaram uma maior confiabilidade em sua classificação, embora mesmo a sinergia dessas técnicas não foi suficiente para se estabelecer relações taxonômicas e evolutivas mais estreitas. A união dessas metodologias à taxonomia numérica auxiliou a situar melhor esses micro-organismos, com ampla variedade característica (Williams et al. 1983a).

Apenas no final do século XX e início do XXI, com a introdução das técnicas moleculares de sequenciamento do DNA (*desoxiribonucleic acid*) ribossomal e de sequenciamento do rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*) 16S, houve maior confiabilidade para o estudo e maior competência na identificação das várias espécies de indivíduos assim classificados (Williams et al. 1983a;

Ventura et al., 2007). Na figura 3 pode-se observar os principais gêneros de actinobactérias conhecidas até 2012 e a sua relação filogenética.

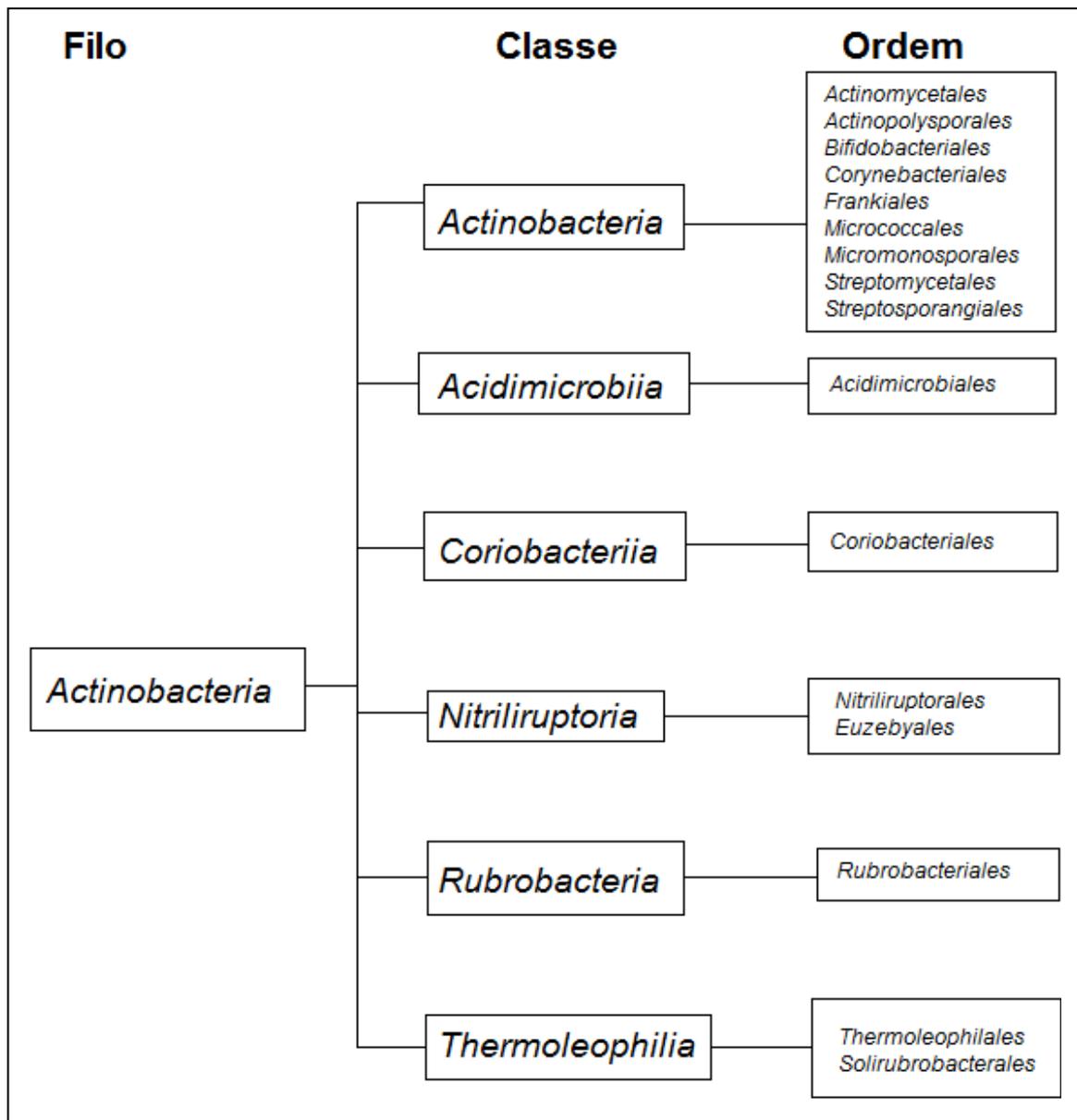


Figura 3. Chave taxonômica proposta para o filo *Actinobacteria* de acordo com o Manual Bergey de Sistemática Bacteriológica (adaptado de Gao & Gupta, 2012).

O grupo das actinobactérias compreende um enorme número de micro-organismos com ampla diversidade de metabolismo e espécies descritas (Bomfim, 2010; Dharmaraj, 2011; Zenova et al. 2011; Mohan & Charya, 2012). As bactérias com características de parede celular gram-positiva, com alto teor (>50%) de Guanina e Citosina (G+C) em seu DNA. É um grupo heterogêneo de

bactérias, sendo algumas espécies capazes de formar filamentos. Este grupo era inicialmente considerado uma Ordem nas classificações taxonômicas bacterianas, entretanto, atualmente passou a ser considerado um filo à parte (Ventura et al. 2007).

O motivo pelo qual estas bactérias foram classificadas como fungos no início de seu estudo deve-se ao fato destes organismos formarem “hifas” morfológicamente muito similares aos fungos. Tais estruturas, assim como os micélios fúngicos, formam verdadeiras e longas ramificações, entretanto, com diferentes diâmetros dos seres eucarióticos. Não possuem, como os fungos hifas septadas, quitina em sua parede celular, apresentam grande resistência aos antibióticos antifúngicos, e uma grande sensibilidade a antibióticos antibacterianos. Algumas actinobactérias, como *Nocardia* e *Actinomyces*, estão estritamente relacionadas aos gêneros bacterianos *Lactobacillus* e *Corynebacterium*. Todas as actinobactérias são sensíveis ao ataque de fagos, diferentemente dos fungos filamentosos (Waksman, 1961).

O Filo *Actinobacteria* contempla seres com metabolismo muito diversificado, podendo ser autotróficos, heterotróficos, fototróficos ou quimiotróficos. Este filo compreende bactérias com variada utilização da tensão de oxigênio, desde organismos anaeróbios obrigatórios, anaeróbios facultativos, microaerófilos e aeróbios obrigatórios (Servin et al. 2008). Ventura et al. (2007) reportaram a existência de diversas formas celulares e miceliais variando desde cocos (*Micrococcus*), hifas rudimentares (*Nocardia*) e micélios amplamente ramificados (*Streptomyces*).

As actinobactérias desenvolvem múltiplas relações simbióticas com outros seres vivos. Podem auxiliar seus hospedeiros, como as actinobactérias endofíticas, aumentando a resistência das plantas aos diversos patógenos, pois são produtoras de antibióticos (Conn et al. 2008). Podem causar doenças em outros seres vivos como é o caso das bactérias do gênero *Mycobacterium*, que englobam os agentes causadores da tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*) e da hanseníase (*M. leprae*) (Silva 2012).

A produção de diversas substâncias economicamente importantes tais como enzimas e metabólitos secundários, como os antibióticos, são produtos do metabolismo destes organismos. Várias destas substâncias têm importância na vida dos seres humanos, que englobam desde produção de detergentes e

medicamentos contra doenças infecciosas e/ou degenerativas, como o câncer (Dhale et al. 2011; Mohan & Charya, 2012).

A diversidade de ambientes que servem de habitat para este grupo de bactérias é muito grande, podendo estar presentes desde desertos, manguezais e águas marinhas (Castro & Prado, 1993; Tagliaferro, 2005; Silva et al. 2013) e também em diversas associações com seres vivos em ambientes hostis (Norovsuren et al. 2007; Canova, 2009; Kurapova et al., 2012). Em solos ácidos, como o do Cerrado, é muito comum encontrar actinobactérias (Silva 2012) sendo que os gêneros mais comuns: *Streptomyces*, *Actinoplanes*, *Glycomyces* e *Streptoacidophilus*. A ocorrência de actinobactérias acidófilas corresponde a um total de 90% dos micro-organismos encontrados no solo. Algumas bactérias estão tão adaptados ao meio ácido, que não conseguem sobreviver em um ambiente com pH neutro (Pereira et al. 1999; Petinate et al. 1999; Zenova et al. 2011).

Vários são estudos que buscam novas fontes produtoras de metabólitos com os diversos grupos de actinobactérias, uma vez que a produção enzimática é um importante setor da economia mundial, e vem se desenvolvendo cada vez mais no Brasil. Apesar desta vertente da economia ainda não ter uma grande importância no país, existem vários grupos de pesquisa atuando para a produção de enzimas e medicamentos, principalmente em universidades brasileiras (Bruzon, 2006; Rodrigues, 2006; Casotti et al., 2007; Bomfim, 2010; Roth, 2011).

1.2.1 Actinobactérias em solo

As actinobactérias estão amplamente distribuídas no solo, tanto em solos ricos em biodiversidade quanto em condições adversas como nos desertos, regiões termais, diferentes amplitudes de pH. As mais prevalentes (90% em média) são as bactérias do gênero *Streptomyces* (Williams et al. 1988; Pereira et al. 1999; Norovsuren et al., 2007).

Pereira et al. (1999), relataram que as modificações antrópicas relacionadas às lavouras e outras atividades de extrativismo, como pecuária, queimadas e produção de carvão mineral, além de aumentar significativamente a emissão de gases que afetam o efeito estufa, alteram completamente a

diversidade dos micro-organismos presentes no solo do Cerrado, sem modificar significativamente as comunidades de actinobactérias no solo não-rizosférico.

Comparando os estudos de Pereira e colaboradores (1999), Bayer et al. (2006) e Pavinato et al. (2009), nota-se que o solo tem grandes prejuízos quando é afetado pela ação antrópica, entre outros pela perda de bactérias resistentes a antimicrobianos. No ritmo desenhado do desmatamento para a implantação de lavouras, pastos e queimadas para a produção de carvão vegetal no Cerrado, a grande biodiversidade de actinobactérias será extinta, sem ao menos ser estudada, similar ao que está acontecendo com a biodiversidade da Floresta Amazônica.

As actinobactérias são importantes integrantes da microbiota do solo, sendo responsáveis pela maior parte da atividade proteolítica neste habitat, convertendo proteínas em aminoácidos e posteriormente, produzindo amônia, por meio da hidrólise. Aqueles organismos participam ativamente do ciclo do Nitrogênio, com participação importante nas etapas de fixação e amonificação desse elemento no solo. Estudos realizados demonstraram que mais de 90% das actinobactérias possuem atividade proteolítica, evidenciando sua participação no ciclo de compostos nitrogenados (Joly, 1960; Treusch et al., 2005).

1.2.2 Enzimas de Actinobactérias

Micro-organismos produzem atualmente mais de 4.000 enzimas. Estes metabólitos enzimáticos são utilizadas pelo homem para a produção de diversos compostos, como biodiesel e álcool, além da princípios ativos de medicamentos utilizados para o tratamento de diversas doenças, como as enzimas L-asparaginase e L-glutaminase, utilizadas no tratamento de leucemias (Souhami; Tobias, 2005a, 2005b).

As actinobactérias são importantes produtoras de biomoléculas, que vão desde a produção de enzimas de importância econômica até a produção de agentes antitumorais, devido a estes micro-organismos terem um metabolismo muito variado (Melo, 2009). A importância das actinobactérias na produção de enzimas utilizados pelo homem vem crescendo nos últimos anos, só perdendo

para a produção de antibióticos (Peczynska-Czoch; Mordarski, 1988; de Azeredo et al., 2004; Velho-Pereira; Kamat, 2013).

As enzimas obtidas a partir do metabolismo de actinobactérias têm aplicabilidades, na indústria sucro-alcooleira, pela produção de celulasas (Gottschalk et al. 2013), indústria de laticínios, produção de detergentes, produtoras de lipases (Sharma et al. 2001), aplicações em exames médicos, como a urato oxidase, utilizada no tratamento de hiperuricemia grave (Cruz et al. 2008) e também na regressão de tumores, como as enzimas L-asparaginase e L-glutaminase (Amena et al. 2010; Balagurunathan et al. 2010).

L-asparaginase e L-glutaminase são utilizadas para o tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL). Ambas possuem modo de ação semelhantes, catalisam a hidrólise do aminoácido, L-glutamina ou L-asparagina, em L-glutamato ou L-aspartato, respectivamente. Vários trabalhos reportam a capacidade de actinobactérias de produzirem tais enzimas sendo isoladas de diversos ambientes: marinhos (Poorani et al. 2009), colonizando poríferos (Dharmaraj 2011), muitos encontrados em solo, como na rizosfera de plantas medicinais (Khamna et al. 2009) e em solo da Caatinga (Costa et al. 2011).

Mesmo que duas bactérias produzam uma enzima com a mesma atividade, as mesmas terão diferentes particularidades, tais como temperatura e pH ótimos de atuação. Um exemplo são as L-asparaginases produzidas por *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora* que possuem diferentes faixas de pH ótimo de atuação, tempo de meia-vida no organismo do paciente, reações anafiláticas e de eficácia no tratamento de pacientes que apresentam a ALL (Aljewari et al. 2010; Agarwal et al. 2011; Pieters et al. 2011).

No início do século XXI foi detectada a presença de acrilamida nos alimentos, e desde então vem se buscando uma alternativa para a eliminação de tal composto dos mantimentos. A indústria alimentícia tem incentivados, desde então, pesquisas para o pré-tratamento de alimentos ricos em açúcares redutores, tais como a batata *chips*, *french fries* e *cookies*, para a redução da quantidade daquele composto produzido pelo aquecimento repentino desses alimentos (Arisseto & Toledo 2006).

1.3 Câncer

Câncer é uma nomenclatura dada para um conjunto de doenças causadas por uma multiplicação exacerbada das células (INCA, 2006), caracterizada como doença crônica não transmissível de evolução insidiosa. Este crescimento é resultado de um processo de acumulação de várias anomalias no genoma celular, culminando na diferenciação do comportamento celular e surgimento de neoplasias malignas. As doenças genéticas são as maiores causas de neoformações (Alberto 2002).

As células corporais vivem de forma harmoniosa e até certo ponto independente, uma vez que as mesmas só podem se proliferar caso haja um comando das células vizinhas. Entretanto, existem algumas células que não respeitam estes comandos, por diferentes fatores (químicos, biológicos e/ou ambientais), e que geram uma falha nos vários genes reguladores de tumores (Cerestiato 2003, Souhami & Tobias 2005c).

Caso a célula não consiga controlar os vários danos ao seu genoma, irá acumular estas mutações e quando não houver formas de supressão de sua multiplicação, esta começará a se dividir. Ainda existem outras formas de controle do crescimento destas células pelo corpo, a morte celular programada (apoptose), caso a célula não responda a esta defesa, ocorrerá a formação de um tumor podendo ter reduzida ou elevada taxa de invasividade dos tecidos (Souhami & Tobias 2005c). Na figura 4 podemos observar um esquema das etapas de desenvolvimento de células cancerosas malignas.

O câncer é a causa de morte natural mais comum, sendo superada apenas pelas mortes violentas (acidentes e criminalidade) (Birch 2005). As neoplasias são responsáveis pelas mortes de mais de 11.000 pessoas ao ano, sendo que as formas mais frequentes desta doença em homens são as neoplasias de próstata e pulmão, em mulheres os de mama e cólon, em crianças de até 15 anos as malignidades prevalentes são as leucemias, segundo dados oficiais do site do INCA (2015).

Entre as pessoas portadoras de neoplasias, os indivíduos mais idosos (maiores que 50 anos) sofrem com maior frequência de carcinomas (como exemplo os de pulmão e próstata), correspondendo a um total maior que 50% de todas as neoplasias nessa faixa etária. Em pessoas mais jovens, outros tipos de

câncer são prevalentes, como linfomas, leucemias e do sistema nervoso central são frequentemente observados (Birch 2005).

A prevalência dos tumores é multifatorial, podendo depender de fatores genéticos, como o exemplo das pessoas de etnia branca possuírem maior predisposição às leucemias agudas que pessoas de etnia negra (Pui & Crist 1994). Fatores ambientais, como a alimentação baseada em *fast foods*, podem estar associados, por exemplo, aos cânceres de cólon, predominantes em estadunidenses, e menos em japoneses. Entretanto, a incidência deste tipo de tumor é aumentada em cinco vezes quando um japonês emigra de sua terra natal e vai viver nos Estados Unidos da América (Souhami & Tobias 2005d).

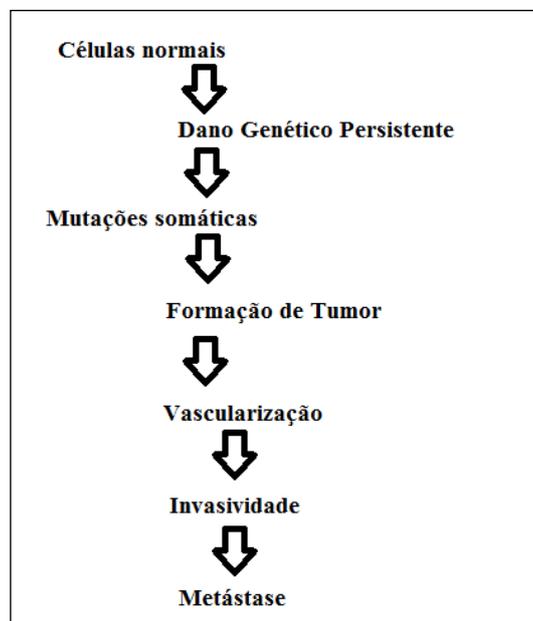


Figura 4. Etapas no desenvolvimento do câncer metastático, adaptado de Souhami & Tobias (2005a).

O corpo humano apresenta diversos mecanismos de produção dos linfócitos, células sanguíneas de defesa. Os leucócitos derivam de uma linhagem de células da medula óssea denominada linhagem linfoide. Os linfócitos originados na medula óssea e são maturados nos órgãos linfoides (timo, baço e linfonodos), são denominados células T. Aqueles que amadurecem fora destes órgãos ou na medula óssea são denominados de linfócitos B (Alves 2012).

Após completarem seu estágio de amadurecimento, as células T e B *naïves* (normais), são direcionadas para os linfonodos periféricos, onde a partir dali, entrarão em contato com os antígenos. São sensibilizadas tornando-se células efectoras, onde as células B secretarão anticorpos e as células T serão diferenciadas em células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Abbas 2009).

As leucemias são neoplasias originárias no sangue, geralmente associadas às células blásticas da medula óssea, sendo que ambas linhagens (mieloides e linfoides) podem gerar o câncer. Após se multiplicarem desordenadamente, tais células invadem o sangue periférico e até mesmo diferentes tecidos (como fígado, baço e sistema nervoso central). Com o aumento de células neoplásicas na medula e as recorrentes alterações genéticas das células tumorais, há uma supressão na produção das demais células sanguíneas. O paciente desenvolve sintomas como anemia e sangramentos, devido a depleção de produção de eritrócitos e plaquetas (Cobaleda & Sánchez-García 2009).

Um dos fatores considerados leucemogênicos é a exposição às radiações ionizantes. Se ocorrer durante a gravidez, duplica as chances leucemia durante a infância. Uma causa genética comumente envolvida neste processo é a translocação do cromossomo 11. Esta anormalidade genética implica em uma alteração no crescimento e sinalização celular (Souhami & Tobias 2005c). As leucemias também são comuns em pacientes que foram tratados com radioterapia e quimioterapia para outros tipos de neoplasias (Kaldor et al. 1990).

Existe uma diferença fundamental entre as denominações leucemia e linfoma, a primeira ocorre predominantemente na corrente sanguínea e na medula óssea, enquanto a segunda ocorre predominantemente nos linfonodos e órgãos linfoides (Bain 2007). A leucemia é responsável por boa parte dos gastos com a saúde destinados ao tratamento de câncer desde a década de 1990 no Brasil (Alberto 2002, Souhami & Tobias 2005d, e). Sendo que mais de 80% dos casos de leucemias em crianças e jovens adultos são casos de ALL (Souhami & Tobias 2005e).

As leucemias mais comuns entre as crianças e jovens adultos (faixa etária que compreende os pacientes de 0 a 24 anos) são as ALL (Birch 2005, Cobaleda & Sánchez-García 2009, Alves 2012), correspondendo por até

3,5/100.000 pessoas por ano em pessoas de até 15 anos de idade (Bain 2007). Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer – José de Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro, RJ - Brasil), em estimativa sobre o câncer para os anos de 2014 e 2015 (disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>), cerca de 11.000 pessoas foram/serão afetadas por algum tipo de leucemia em 2014/2015. Tais agravos são responsáveis por 1,7% da totalidade dos tumores malignos identificados, e no Brasil são, ainda, responsáveis por 6000 mortes ao ano.

As estimativas para o Brasil nos anos de 2014 e 2015, segundo o INCA (2015), são de pelo menos 500 novos casos de leucemias na região Centro-Oeste, sendo 200 desses casos apenas no Estado de Goiás. Uma incidência de 7 casos para cada grupo de 100.000 pessoas deste Estado.

1.3.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A produção descontrolada de blastos leva a uma diminuição das células e resíduos celulares presentes no sangue, este quadro é conhecido como leucemia. As leucemias linfoblásticas são aquelas que possuem sua origem nas células de origem linfóide, ou seja, células precursoras de linfócitos T e B e das células assassinas naturais (*Natural Killers* – NK). As leucemias podem também ser classificadas quanto a sua velocidade de desenvolvimento em dois grandes grupos: as leucemias: agudas e crônicas. As leucemias agudas apresentam quadro de desenvolvimento clínico mais rápido do que as crônicas, desta forma as agudas são mais letais. É muito comum a pessoas que já tiveram tumores no sangue, desenvolverem novamente esse agravo, uma vez que as leucemias começam seu desenvolvimento na medula óssea e se espalham para o corpo (Souhami & Tobias 2005f).

Por meio de exames laboratoriais (hemograma, citometria de fluxo, imunoquímicos e de citogenética), é possível normalidade ou a presença de Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL), já que existirá uma exorbitante diferença entre as células (trombocitopenia e eritrocitopenia). Pacientes com esta doença desenvolvem frequentemente sintomas como fadiga generalizada, perda de peso, anorexia, aumento de linfonodos, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia

(número de eritrócitos é reduzido) e febre (pois os leucócitos deixam de desempenhar suas funções normais).

As ALL apesar de serem tipos raros de neoplasias, são as principais dentro dos grupos de Leucemias. Correspondem a cerca de 25% de todos os casos de câncer em crianças, correspondendo a cerca de 80% dos casos de leucemias em volta do globo, exceto na África (Wartenberg et al. 2008).

Entre as opções terapêuticas mais utilizadas para a ALL, estão a utilização de enzimas hidrolíticas de dois aminoácidos não-essenciais às células normais, L-asparaginase e L-glutaminase. Foi reportado que a enzima produzida pelo plasma de porcos-da-Índia (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758] [Rodentia, Caviidae]) tinha efeito regressivo sobre linfomas em modelos murinos (Kidd, 1953) e posteriormente relatado por Mashburn & Wriston (1964), que a enzima produzida por *E. coli* também tinha o mesmo efeito inibidor de tumores.

1.4 Acrilamida

A acrilamida, em condições laboratoriais, é um sólido cristalino branco e inodoro. A molécula tem comportamento anfipático, sendo dissolvida em solventes polares (água) e apolares (acetona). A temperatura de fusão deste composto é 84,5°C. Possui boa mobilidade e alta capacidade de ser lixiviado do solo, por ser solúvel em água pode infiltrar no solo até os lençóis freáticos, por isso é muito utilizado como condicionante de solo. É uma molécula com fácil deterioração por micro-organismos, principalmente no solo, não-contaminante e degradada ainda nos organismos produtores, pois não há bioconcentração do composto em seres vivos (Friedman 2003).

Esse composto também pode ser chamado de propenoamida, 2-propenoamida, vinilamida ou monômero de acrilamida; possui a fórmula molecular C_3H_5NO (Figura 5) e diversas aplicações na indústria, tais como a produção de corantes e outras substâncias orgânicas, embora seu principal uso seja na produção de polímeros de poli(acrilamida) (CDC 1992, CETESB 2014).

A acrilamida é um composto que possui um grupo amida, e é eletrofilicamente reativo na insaturação. No organismo ocorre o rompimento da dupla ligação através do oxigênio, formando outro composto com alta reatividade, a glicidamida. Ambos compostos são atraídos aos sítios

nucleofílicos com sulfidrilas (–SH) e aminas, como os encontrados em proteínas e moléculas de ácidos nucleicos. Ambas moléculas, têm reatividade com o DNA e com proteínas no organismo (Törnqvist, 2005).

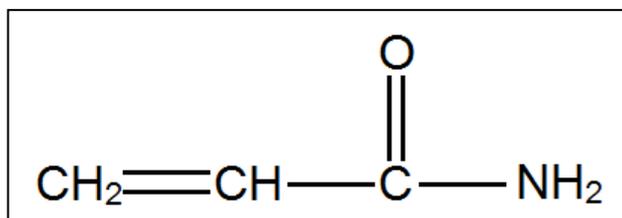


Figura 5. Estrutura molecular da acrilamida (Arisseto & Toledo 2006).

Em laboratório, esta substância deve ser armazenada distante de outras substâncias oxidantes, protegida do calor, faíscas e do fogo, e como há perigo dos recipientes vazios conterem acrilamida residual, as embalagens destes componentes devem ser corretamente descartadas. Ao realizar trabalhos com esta substância, o indivíduo deve ter precauções extras, já que este composto é tóxico se inalado em formas de vapor, poeira ou aerossol e pode ser absorvido pela pele e mucosas do corpo (NIOSH 2011).

No início dos anos 2000, pesquisadores descobriram que este composto químico formava-se em alimentos cuja a temperatura de cozimento fosse muito alta, especialmente aqueles alimentos que possuem uma grande quantidade de amido, e que sofressem mudanças bruscas em sua temperatura, mas não foi descoberta, nesta época, o processo químico pelo qual esta molécula era formada (Tareke et al. 2002).

1.4.1 Acrilamida na indústria de alimentos

A preocupação com a acrilamida nos seres vivos começa na Europa em 1997, sendo que a maioria dos dados obtidos a partir desta exposição ao composto, se dá pela profissão, principalmente daqueles que estão relacionados à construção de túneis para ferrovias de alta velocidade na Suécia (Arisseto & Toledo 2006).

Desde a descoberta da acrilamida nos alimentos em 2002 por pesquisadores suecos e russos, especialmente nas frituras, alguns grupos em diversos países têm se dedicado a encontrar esse composto em outros

alimentos contendo carboidratos de grandes cadeias carbônicas, como a batata. Este alimento contém juntamente com as moléculas de amido associadas ao aminoácido L-asparagina. Vários foram os alimentos em que a acrilamida foi encontrada, tais como batatas (*Solanun tuberosum* L.) fritas de redes de *fast food*, batatas fritas industrializadas (*chips*), cereais matinais industrializados, biscoitos e torradas (Lineback et al. 2006). A tabela 1 mostra a concentração de acrilamida encontrada em alguns alimentos.

Os principais alimentos onde há formação de acrilamida, normalmente pela reação de Maillard (ou escurecimento não-enzimático), são os que possuem açúcares redutores (carboidratos possuidores de grupos com a função orgânica aldeído ou com capacidade de formar uma solução isomérica) (Nitzke & Biedrzycki, Kornbrust et al. 2010).

Tabela 1. Concentração média, mínima e máxima de acrilamida encontrada em alguns alimentos na Suécia adaptado de Neri (2004)

Grupos de Alimentos	Acrilamida ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	
	Média	Mínimo-Máximo
Batatas chips	980	330-2300
Batatas fritas	410	300-1100
Biscoitos	280	<30-640
Pães torrados	160	<30-1900
Cereais matinais	160	<30-1400
Pão	50	<30-60

A reação de Maillard compreende a cadeia de reações que ocorrem do açúcar redutor (primariamente as pentoses e em seguida as hexoses) com uma molécula contendo o grupamento amina (o mais reativo dos aminoácidos é a lisina, seguido pelos básicos não polares e pelos ácidos) sob intensa fonte de calor. Nas batatas fritas, por exemplo, a L-asparagina é o resíduo de aminoácido que reage através dessa reação (utilizada na cozinha para dar melhor sabor aos alimentos e uma coloração diferenciada às fontes alimentares (Figura 6) (Shibao & Bastos 2011).

Dentre os vários produtos e intermediários da reação de Maillard estão a acrilamida e outros compostos amínicos heterocíclicos aromáticos. Esses produtos da referida reação estão associados à instalação e desenvolvimento da osteoporose, doenças renais, diabetes (através da inibição da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), Alzheimer e artrite (Arisseto & Toledo 2006).

O objetivo desta reação é melhorar o sabor, odor e cor do alimento, resultando em uma coloração característica de alimentos “bem cozidos”. Esta transformação no alimento se dá pelo produto final da reação de Maillard, as melanoidinas, que possuem uma cor marrom (Nitzke & Biedrzycki).

Várias foram as medidas de controle de acrilamida produzida pela fritura, desde a sua descoberta em alimentos fritos, em 2002. Entre as medidas de controle testadas com sucesso em laboratório estão as medidas de adicionar às batatas fritas de redes de *fast food*, por exemplo, compostos como: ácido acético, ácido cítrico e a enzima L-asparaginase (Vinci et al. 2011).

Uma das medidas de controle mais eficazes e mais promissoras para o controle da produção de acrilamida em alimentos, focada principalmente nos produtos derivados da batata (*S. tuberosum* L.), é a utilização da enzima asparaginase, por ser, dentre as medidas de mitigação da produção de acrilamida, a que não afeta a produção de 5-hydroxymethylfurfural – HMF (composto também tóxico). Atualmente são utilizadas duas enzimas asparagina-hidrolases na indústria de alimentos, ambas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, já aprovadas, inclusive, pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos da América, para ser utilizado nos alimentos desse país (Capuano & Fogliano 2011).

1.4.2 Efeitos da acrilamida no organismo humano

A acrilamida está classificada no grupo 2A dos vários possíveis agentes carcinogênicos humanos, fato fundamentado nos estudos realizados em roedores. Entretanto não há evidências comprobatórias de mortes causadas por câncer em humanos, cuja origem das neoplasias esteja diretamente ligada à acrilamida (Arisseto & Toledo 2006, Lineback et al. 2006).

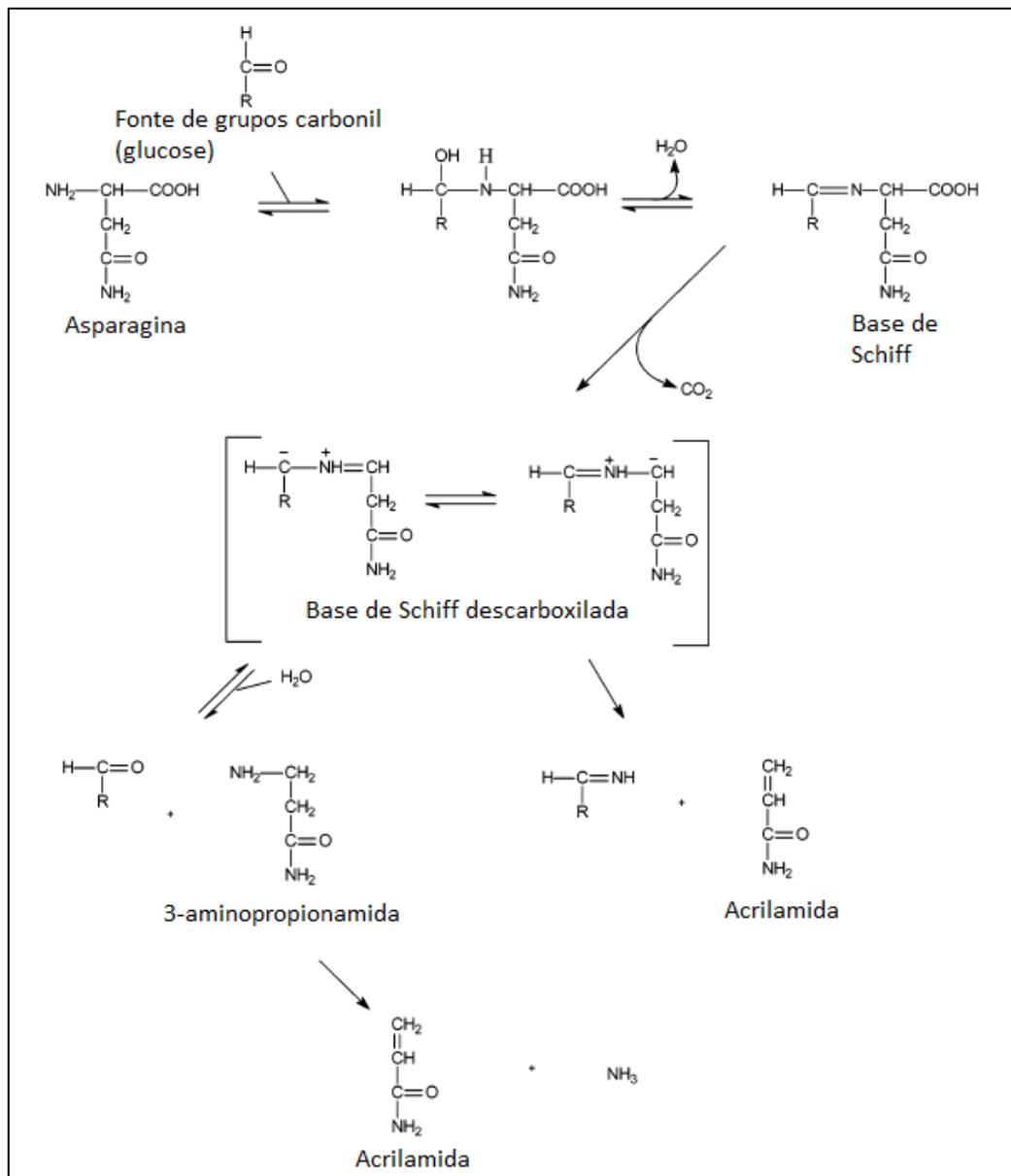


Figura 6. Mecanismo de formação da acrilamida na batata (*Solanum tuberosum* L.) (Zyzak et al. 2003).

Este composto é comprovadamente um agente carcinogênico e diminui a fertilidade de machos (em modelos murinos), já os efeitos neurotóxicos em humanos expostos a acrilamida devido à ocupação profissional é comprovado (Capuano & Fogliano 2011).

Os efeitos da 2-propenoamida no organismo humano levam à axonopatia, uma reação comum do corpo humano em contato com algumas toxinas. A acrilamida age inibindo as quinesinas, proteínas de transporte neural, reduzindo a velocidade de comunicação dos neurônios causando uma axonopatia distal. Quando o organismo tem exposições duradouras a este composto, não somente o sistema nervoso periférico (SNP) é afetado, mas

também o sistema nervoso central (SNC), embora os efeitos no SNC ainda não tenham sido completamente elucidados (Capuano & Fogliano 2011, Morfini et al. 2012).

1.5 Enzimas

Catalisadores naturais que diminuem a energia de ativação das reações que ocorrem em um organismo vivo, são conhecidos como enzimas. Quase sempre são formadas por proteínas (exceto as ribozimas, que são constituídas de RNA). Estes compostos têm diversas aplicabilidades e o homem faz uso destes compostos há muito tempo, principalmente na produção de etanol e na indústria alimentícia, como a fabricação de queijos, cervejas e pães. Nos últimos anos estes compostos vem ganhando cada vez mais importância, e sendo economicamente valorizados, pois têm alta especificidade de substratos, e aumentam, em até milhares de vezes, a velocidade das reações que catalisam (Headon; Walsh, 1994).

O desenvolvimento de produtos com alto valor agregado tem crescido mundialmente e dentre os principais fabricantes, está o Brasil produzindo o etanol a partir da cana-de-açúcar (Casotti et al. 2007). Desde a Segunda Guerra Mundial, vários países estão produzindo substâncias de elevado valor comercial por meio de micro-organismos, por ser uma forma sustentável e, principalmente, com baixo custo de produção (Gulati et al. 1997; Abud, 2005).

A utilização destes compostos tem ganhado cada vez mais importância por sua especificidade e também por sua capacidade de gerar menos lixo uma vez que os produtos das reações que catalisam geralmente tem menor impacto ambiental, sendo portanto sua produção sustentável ao planeta (Politzer & Bon 2006, Bornscheuer 2010).

Várias são as enzimas utilizáveis pelo homem como alternativa para aprimorar o tratamento de doenças graves como o câncer. Entretanto, estas enzimas podem apresentar certa toxicidade aos seres humanos, justificando, assim, o aumento da quantidade de investigações sobre estes catalisadores. Vêm sendo pesquisadas novas fontes de organismos produtores de compostos enzimáticos, afinal as mesmas, utilizadas atualmente para o tratamento de

neoplasias estimulam o organismo humano a ter reações imunológicas (Politzer & Bon 2006).

1.5.1 Utilização terapêutica de enzimas (produção biotecnológica)

Há relatos de uso de enzimas para finalidades terapêuticas desde antes da Primeira Grande Guerra. Algumas enzimas estão aprovadas no Brasil para o uso clínico, as principais são a uricase, para o tratamento de hiperuricemia e a asparaginase, para o tratamento de ALL. Apesar de serem ótimas catalisadoras e específicas aos substratos, as mesmas possuem dificuldades no seu uso para o tratamento de doenças, uma vez que estas podem gerar reações imunológicas específicas, serem afetadas por proteases presentes no organismo do paciente e também possíveis dificuldades quanto ao acesso no órgão-alvo (Cruz et al. 2008)

Por este motivo são necessários mais estudos para a obtenção de enzimas específicas capazes de agir em seus substratos resultando em um menor número de reações adversas e maior penetrabilidade nos tecidos necessários. Existem formulações que potencializam a ação destas enzimas, como por exemplo o que ocorre com a enzima L-asparaginase. A adição de um grupo PoliEtileno Glicol (PEG), pode aumentar o tempo de meia-vida desta enzima no corpo humano e diminuir sua imunogenicidade (Soares et al. 2002, Narta et al. 2007)

Imada e colaboradores (1973) reportam vários trabalhos com micro-organismos produtores de enzimas capazes de eliminar determinados tipos de células cancerígenas. Em estudo desenvolvido citam organismos capazes de produzir estas enzimas, em especial a L-asparaginase.

Atualmente existe uma grande busca por novas fontes desta enzima, especialmente desde que a Elspar[®] (empresa fabricante do medicamento) anunciou ao governo brasileiro que não iria produzir a droga mais utilizado para o tratamento das leucemias. Várias actinobactérias como as dos gêneros *Mycobacterium* (Jayaram et al. 1968) e *Streptomyces* (Aly et al. 2013) tem sido utilizadas para a obtenção de L-asparaginase.

1.5.2 L-Asparaginase (E. C. 3.5.1.1)

Em 1953, Kidd observou a regressão completa de linfomas a partir de infusões parenterais de soro de porcos da Índia (*Cavia porcellus* [Linnaeus, 1758] [Rodentia, Caviidae]) (GPS - *Guinea Pig Serum*) em modelos murinos. A partir destas informações, posteriormente Broome (1961), um dos pesquisadores da equipe de Kidd, comprovou que a substância ativa contra os tumores estudados por seu colega era a L-asparaginase. Em paralelo alguns grupos descobriram que o aminoácido L-asparagina é necessário em grandes quantidades para a cultura de células leucêmicas *in vitro*, apesar de ser um aminoácido não-essencial às células normais do corpo (Neuman & McCoy 1956, Peczynska-czoch & Mordarski 1988).

Em 1964, apesar da dificuldade de extração da enzima, Mashburn & Wriston conseguiram comprovar que a L-asparaginase extraída de *E. coli* possuía atividade semelhante à da enzima extraída de GPS frente às células tumorais de um linfoma. Já na década de 1970, Imada e colaboradores (1973) conseguiram comprovar que várias bactérias produziam esta enzima. Nesta mesma década, há relato de estudo com L-asparaginase produzida por uma cepa de *Streptomyces griseus* (DeJong 1972), embora a enzima de *E. coli* tenha sido mais eficiente, e portanto a escolha para o tratamento de algumas neoplasias (Campbell & Mashburn 1969).

O aminoácido L-asparagina é produzido pelas células normais do corpo, devido a presença de uma enzima chamada L-asparagina sintetase (*Enzymatic Classification* – E.C. – 6.3.1.1) no citoplasma celular, que catalisa a reação de síntese do aminoácido L-asparagina a partir do L-aspartato e NH_4^+ (amônio), com gasto energético. Entretanto, as células cancerosas da ALL não produzem esta enzima, pois perdem o gene codificador da mesma, ou produzem quantidades insuficientes daquele aminoácido, absorvendo-o do meio em que se encontram (BROOME 1961).

Muitos seres vivos que possuem capacidade de produzir esta enzima. Apesar de a L-asparaginase de *E. coli* (Campbell et al. 1967) e a da *Erwinia carotovora* (Roth 2011) serem as escolhas de tratamento com drogas comercialmente vendidas e bem estabelecidas no mercado. Várias são as actinobactérias produtoras desta importante enzima no tratamento de câncer,

tais como algumas espécies do gênero *Mycobacterium* (Grosswicz & Halpern 1956, Jayaram et al. 1968b, Soru & Zaharia 1974), *Streptomyces* (Petinate et al. 1999, Le Maréchal et al. 2013), além de diversos isolados de solo (Azuma 2011) e de ambientes salinos (Dharmaraj 2010).

A L-asparaginase é uma enzima que catalisa a reação de hidrólise do aminoácido L-asparagina (Figura 7) formando um composto intermediário entre o aminoácido e o ácido aspártico, liberando NH_4^+ , retendo a molécula de água. Posteriormente realiza a ligação da molécula de água ao aminoácido, realizando a formação do grupo ácido carboxílico onde antes havia um grupo amina, por esta razão a L-asparaginase também é conhecida como L-asparagina-hidrolase.

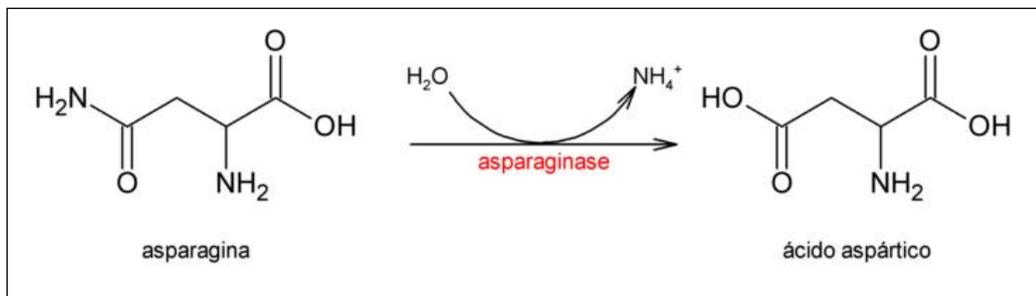


Figura 7. Mecanismo de ação da enzima L-asparaginase (E.C. 3.5.1.1) sobre o aminoácido L-asparagina (Adaptada de Roth, 2011).

Cada numeração da E.C. – *Enzymatic Classification* – tem como finalidade identificar uma ação até concluir a ação específica da enzima, a asparaginase é classificada como: E.C. 3.5.1.1. Por ser uma hidrolase (3) sobre ligações de carbono-nitrogênio (5) em moléculas lineares (1), lisando o aminoácido L-asparagina (1). Existem 48 destas enzimas descritas no *Protein Data Bank* (PDB). O esquema desta enzima produzida por *Erwinia chrysanthemi* é mostrada na figura 8. A enzima possui 4 sítios ativos, onde pode ocorrer a clivagem do aminoácido L-asparagina.

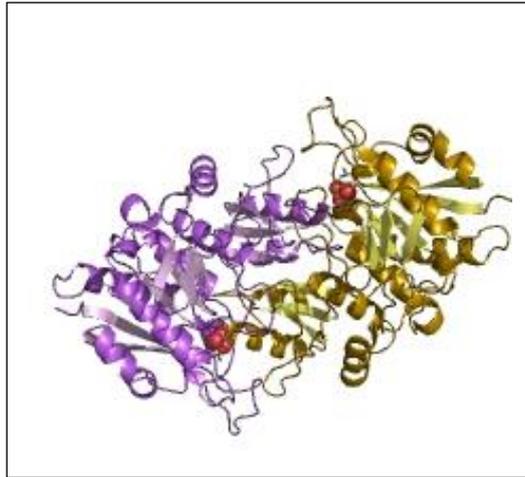


Figura 8. Estrutura tridimensional da enzima L-Asparaginase de *Erwinia chrysanthemi* (1hfj), no *Protein Data Bank* (PDB), segundo (Jaskólski et al. 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A Leucemia Linfoblástica Aguda é causa de morte mais comum entre crianças e jovens de zero a 15 anos de idade, excetuando-se as causas de morte violenta. É uma doença degenerativa que atinge as células brancas do sangue, resultando em uma multiplicação exacerbada de células de origem linfóide da medula óssea.

Nos últimos dois anos, os pacientes de hospitais oncológicos têm tido uma incerteza com relação ao seu tratamento, uma vez que a empresa que produz o quimioterápico de maior importância no tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), anunciou ao Governo Brasileiro que não mais produzirá o medicamento. No ano de 2013, a falta deste agente quimioterápico foi noticiada em jornais de grande circulação, como a Folha de São Paulo (São Paulo, SP – Brasil) (Nublat 2013a, b). O Governo tentou tranquilizar a situação dizendo que existiam esforços para que não houvesse falta deste medicamento no país (Nublat 2013c).

Além da utilização desta enzima no tratamento de câncer, a mesma também pode ser aplicada na indústria de alimentos para que haja a redução da formação de compostos de acrilamida nos alimentos. Tal composto possui diversos efeitos negativos no organismo humano conhecidos. Reduzir a formação deste composto nos gêneros alimentícios, especialmente os fritos, se faz necessário para a redução de possíveis efeitos neurotóxicos ocasionados pelo contato do corpo com a 2-propenoamida.

As actinobactérias são micro-organismos com papel relevante no ramo da Biotecnologia, pois produzem um grande número de substâncias, sendo imprescindíveis em vários ramos industriais como a alimentícia, produção de detergentes e a farmacêutica (antibióticos e enzimas).

Sendo assim, este trabalho se faz necessário para estudar actinobactérias com elevado potencial produtor de enzimas capazes de eliminar células leucêmicas. A produção desta enzima no país pode reduzir o custo do

tratamento, uma vez que esta enzima é importada pelos hospitais para a realização de procedimentos quimioterápicos nos pacientes, reduzindo também o tempo de espera do paciente quando houver demora na entrega e/ou escassez do medicamento no país.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Selecionar e caracterizar actinobactéria presente em solo do Cerrado brasileiro capaz de produzir a enzima L-asparaginase.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar actinobactérias de solo do Cerrado brasileiro produtoras de L-asparaginase;
- Determinar por seleção direta o isolado de actinobactéria com melhor potencial de produção da enzima;
- Produzir a L-asparaginase em condições laboratoriais e purificá-la parcialmente;
- Estimar parâmetros ideais de atividade enzimática da L-asparaginase produzida (temperatura e pH);
- Analisar por técnicas morfológicas, bioquímicas e moleculares a actinobactéria isolada com melhor capacidade de produção da enzima.

4 MÉTODOS

4.1 Coleta e Processamento das amostras

Amostras de aproximadamente 100g de solo foram coletados em solo de Cerrado goiano do Bosque Auguste Saint-Hilaire, próximo a Biblioteca Central da Universidade Federal de Goiás (BC/UFG), na cidade de Goiânia/GO – Brasil – sob as coordenadas geográficas: latitude 16°36'20" S longitude 49°15'48" W, no decorrer do mês de abril do ano de 2013, ao final da estação chuvosa a uma profundidade de até dez centímetros da superfície.

Então o material foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB) do IPTSP/UFG, onde foram analisadas. O seu processamento consistiu da retirada de resíduos de raízes e rochas. Em seguida, as mesmas passaram por procedimento de secagem uma temperatura aproximada de 80°C por 24-48 horas. Posteriormente as amostras foram passadas em peneira de malha de 1mm, e armazenadas em sacos plásticos esterilizados a -20°C.

4.2 Isolamento das actinobactérias

Para o isolamento dos micro-organismos do solo foram selecionados aqueles com escassos estudos sobre bioprospecção e possível emprego biotecnológico: as bactérias do *Genera Actinoplanetes* pertencentes à família *Actinoplanaceae*. Estes micro-organismos foram escolhidos devido seu potencial biotecnológico pouco descrito na literatura e por seus esporos possuírem quimiotaxia para a xilose (Palleroni 1976a, 1980). Para o isolamento foi empregada a metodologia da câmara de quimiotaxia (Palleroni 1976b) (Figura 9).

A câmara de quimiotaxia foi previamente esterilizada sob radiação Ultravioleta (UV) por 30 minutos. Após a esterilização, amostras de 0,5g do solo

tratado foram colocadas em cada um dos dois compartimentos da câmara. Em seguida, água destilada esterilizada foi adicionada aos compartimentos, até que a mesma atingisse o nível do canal estreito que une os dois compartimentos da câmara.

A câmara foi colocada em uma placa de Petri esterilizada e deixada em repouso na câmara de Cabine de Segurança Biológica (CSB) por uma hora para que os esporos dos *Actinoplanetes* fossem liberados. Após este tempo, foi inserido por meio de uma pinça esterilizada por tripla flambagem com álcool, no canal conector, um tubo capilar contendo tampão xilose/fosfato a 10mM (pH 7,0). Em seguida a amostra foi incubada, por mais uma hora nas condições descritas anteriormente.

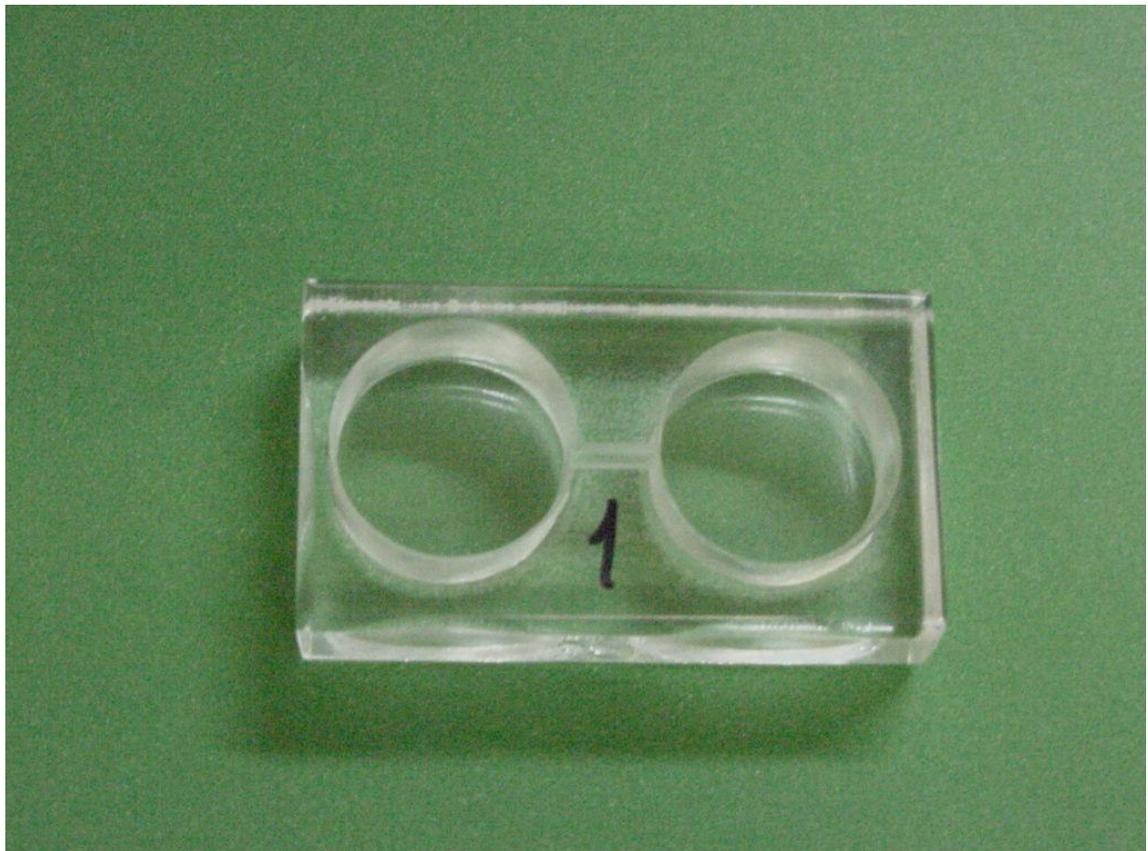


Figura 9. Câmara de quimiotaxia aplicada no isolamento de *Actinoplanetes*, segundo modelo de Palleroni (1976b)

Após a segunda incubação, duas formas de inoculação foram adotadas para o isolamento. Na primeira, o capilar foi removido, lavado externamente com água esterilizada (Palleroni 1976b). O tubo lavado teve todo o seu conteúdo

vertido em tubos de centrifugação, tipo *Eppendorf*, de 1,5mL contendo 1,0mL de água esterilizada. Este material foi homogeneizado em vórtex. Todo o conteúdo dos tubos foi inoculado na superfície do ágar amido-caseína (AC) (Waksman, 1961) (em alíquotas de 100µL da solução). Na segunda forma de isolamento, após os procedimentos de lavagem, o conteúdo do tubo capilar, foi aplicado diretamente sobre placas de Petri contendo o meio AC. Em ambas formas de isolamento, o material inoculado sobre a superfície do ágar, foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski, esterilizada por tripla flambagem.

As placas foram incubadas por sete a 14 dias, sendo observadas três vezes ao dia, para o acompanhando do crescimento de colônias com características típicas de actinobactérias. As colônias características de actinobactérias foram selecionadas e reinoculadas por método de esgotamento em ágar ISP-2 e novamente incubadas por sete a 14 dias a 30°C. A colônia isolada foi novamente inoculada em ágar ISP-2 (*International Streptomyces Project*), até a esporulação típica de actinobactérias. Este processo foi repetido por mais três vezes e as morfoespécies isoladas consideradas puras, foi dada a nomenclatura do solo coletado (BC.A.), e aos diferentes isolados foi atribuído um número respectivo (de 1 a 22).

Para a preservação dos isolados, os mesmos foram semeados em ágar ISP-2 formando um tapete. As placas de Petri foram então incubadas a 30°C até a esporulação das colônias. Após essa etapa, foi adicionado às placas de cultura 10mL de uma solução esterilizada contendo glicerol a 20%. A solução final (glicerol+esporos) foi fracionada e 2,0mL foram adicionados aos tubos criogênicos e armazenadas a -20°C.

4.3 Triagem de isolados com atividade enzimática sobre L-asparagina

A triagem das actinobactérias isoladas na etapa anterior foi realizada em meio de cultura indutor de produção da enzima L-asparaginase. Este meio de cultura possuía como fonte única de nitrogênio o aminoácido L-asparagina (a composição do meio de cultura está descrita no anexo I). Uma alíquota de 20µL da solução de esporos bacterianos preservados em glicerol a 20% foi inoculada centralmente nas placas de Petri. Em seguida, as placas foram incubadas a 30°C e a produção da enzima L-asparaginase acompanhada durante 120 horas.

A positividade de produção da enzima foi avaliada por meio da formação de halo róseo ao redor das colônias. Os valores do halos formados, indicativo da atividade enzimática e o diâmetro da colônia crescida foram anotados. Este teste foi realizado em triplicata e as médias calculadas. A razão das médias entre o halo e o diâmetro foi utilizado para determinação do Índice Enzimático (IE) de cada uma das amostras selecionadas (Gulati et al. 1997; El-sabbagh et al. 2013).

4.4 Produção da L-asparaginase por fermentação submersa

Inicialmente 50 μ L do estoque do isolado selecionado (aquele que obteve maior IE), foi inoculado em dez *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 20mL de meio caldo ISP-2. Os frascos foram incubados por 48 horas a 30°C com agitação de 140rpm. Em seguida, adicionou-se ao inóculo 80 mL do meio indutor de produção da enzima (anexo I) e novamente foram incubados sob as mesmas condições de temperatura e agitação por 120 horas (El-sabbagh et al. 2013).

Após o período de incubação, o caldo resultante foi submetido à filtração a vácuo para separar os micélios bacterianos do extrato enzimático bruto. Uma alíquota de 100 μ L do extrato enzimático bruto foi inoculada sobre o meio de triagem por 10 minutos a temperatura ambiente, para a confirmação da presença da enzima neste extrato. O micélio bacteriano foi armazenado a -20°C, já o sobrenadante foi recolhido para realizar os experimentos a seguir.

4.5 Purificação parcial da L-asparaginase

Após a produção da enzima, do extrato bruto filtrado foi separada a alíquota de 20mL para os experimentos posteriores. O maior volume foi submetido à precipitação de proteínas por meio da adição de sulfato de amônio a uma saturação de 60% da solução (calculada a partir do endereço eletrônico: <http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>), e incubado *overnight* a 4°C sob leve agitação. Após esse procedimento, o caldo foi submetido à centrifugação de 4.000rpm a 4°C por 60 minutos, separado em tubos tipo *Falcon* de 50mL. O precipitado foi recolhido e armazenado em tubo *Falcon* a -20°C. O sobrenadante resultante teve o volume medido. E saturado a 80% com NH₄SO₄

(sulfato de amônio) (calculado por meio do site descrito anteriormente), e incubado *overnight* a 4°C sob leve agitação. Em seguida, o caldo foi submetido a centrifugação de 4.000 rpm a 4°C por 60 minutos, separado em tubos tipo *Falcon* de 50mL. O precipitado e uma alíquota de 20mL do sobrenadante foi recolhida e também armazenados em tubos *Falcon* a -20°C, o restante do sobrenadante foi descartado (El-sabbagh et al. 2013, Deshpande et al. 2014).

Após todo o procedimento, as frações resultantes das precipitações de 60% e 80% foram retirados do armazenamento a -20°C, e realocados em temperatura de 4°C, para que pudessem liquefazer sem perder as propriedades enzimáticas. Em seguida, as soluções resultantes foram diluídas em tampão 0,05M Tris-HCl a um pH 8,6, e posteriormente foi realizada a diálise por 24 horas, contra o mesmo tampão, sendo trocado por 3 vezes neste período. Após a diálise, as amostras foram identificadas e armazenadas a -20°C até a etapa de determinação das atividades de cada um dos dialisados obtidos.

4.6 Determinação de atividade L-asparaginase

Para a determinação da atividade enzimática foram selecionadas as seguintes frações: extrato bruto armazenado (E.B.), dialisado precipitado 60% (DP 60), sobrenadante 60% (Sob. 60), dialisado 80% (DP 80) e sobrenadante de 80% (Sob. 80).

A atividade da L-asparaginase produzida foi avaliada de acordo com o método de Mashburn e Wriston (1963) modificado. Para a determinação da atividade de L-asparaginase, 0,1mL do E.B. foi separado em três tubos de ensaio. Em cada tubo foi adicionado 0,2mL de tampão Tris-HCl 50mM a um pH de 8,6 e 1,7mL de solução de L-asparagina a uma concentração de 0,01M. A mistura foi incubada durante 10 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 0,5mL de ácido tricloroacético (TCA) a 1,5M e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi recolhido 0,1mL de cada tubo e transferido para outros três tubos de ensaio, contendo 3,7mL de água destilada e adicionado o 0,2mL do reagente de Nessler previamente preparado (Anexo I) e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. A amônia liberada no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria a um comprimento de onda de 480nm.

4.7 Otimização da atividade enzimática

Os parâmetros foram avaliados independentemente, otimizando a temperatura e posteriormente o pH. O parâmetro otimizado obtido (com base na atividade enzimática mais alta alcançada) foi mantida para o próximo experimento.

A curva de calibração (Figura 10) foi construída tendo como parâmetro em uma solução de sulfato de amônio, nas faixas de 0,1 a 2,0 μmol de NH_3 liberados a partir da reação com o reagente de Nessler (El-sabbagh et al. 2013). O zero do espectrofotômetro foi realizado com água milli-Q (Abud 2005). A reta de regressão foi obtida pela equação geral da reta (calculada pelo *software* Microsoft Office Excel®): $Y=0,203203356+4,376883311X$.

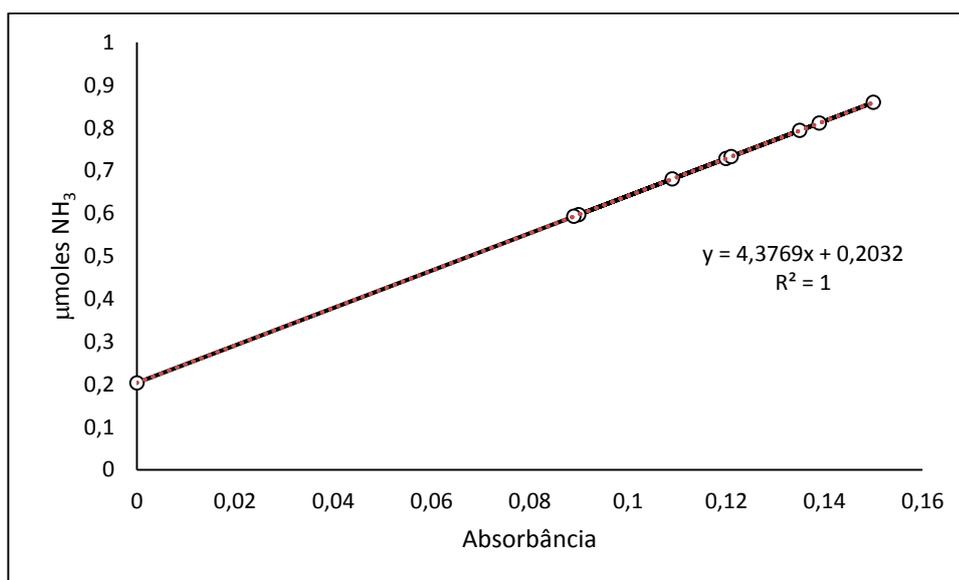


Figura 10. Curva de calibração de sulfato de amônio.

4.7.1 Temperatura ótima

Temperatura ótima para a atividade da enzima foi determinada por meio da incubação da mistura de ensaio durante 10 minutos a temperaturas que variaram de 30 a 60°C em incrementos de 5°C. Após o final dos períodos de incubação, atividade enzimática foi medida como descrito na determinação da atividade L-asparaginase (item 4.6) utilizando-se da curva de calibração para o

experimento calculada no item 4.7, otimização da atividade enzimática (Aljewari et al. 2010, El-Sabbagh et al. 2013).

4.7.2 pH ótimo

Volumes fixos de 0,1mL das soluções fracionadas foram misturadas com 0,2mL de 0,05M dos diferentes tampões em pH que variaram de 4 a 9. O tampão fosfato de potássio foi usado para a escala de pH de 5 a 7, de Tris-HCl foi utilizado para a escala de pH de 8 a 9 e para a escala de 10 e 11 foi preparado o tampão glicina-NaOH (Mashburn & Wriston 1963).

4.8 Dosagem de proteínas nas soluções fracionadas

A dosagem de proteínas foi realizada no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG, realizada por meio do método de Bradford, com base em uma curva padrão com diferentes concentrações de uma proteína conhecida, usualmente a albumina do soro bovino (BSA), e a solução corante (Bradford 1976).

A solução corante é preparada dissolvendo-se 50mg de Azul Brillhante de Coomassie G (Sigma) em 25mL de etanol 95%, sob agitação constante. Foram adicionados 50mL de ácido fosfórico 85% e 500mL de água destilada. A solução foi mantida sob agitação por uma hora e, posteriormente, filtrada. A solução foi armazenada a 4°C e antes de sua utilização foi filtrada.

A curva de calibração foi fornecida pelo Laboratório de Enzimologia (ICB/UFG) obtida por meio da fórmula: $Y=(23,94X+0,0877)(10)$. Após 10 minutos de contato, foi realizada leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. Como “branco” foi utilizada a leitura em absorbância de uma amostra contendo 0,1mL de água e 1mL da solução corante.

Foram separados e identificados seis tubos de ensaio (E.B., DP 60, Sob. 60, DP 80, Sob. 80 e branco) e em cada um deles foi adicionado 1mL do reagente Bradford. Em seguida foram adicionados em cada um dos respectivos tubos a fração para a dosagem de proteínas totais contidas nos dialisados. Homogeneizou-se as soluções e foram incubadas a temperatura ambiente por

15 minutos. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm.

4.9 Caracterização do isolado

4.9.1 Caracterização morfológica

4.9.1.1 Macromorfologia

A morfoespécie, anteriormente semeada em caldo ISP-2 sob agitação rotativa de 140 rpm a 30°C por 48-72 h, foi inoculada em meios contendo ágar ISP-2, ISP-3 em placas de Petri e em placas de cultura de células com seis poços os meios ISP-4, ISP-5, ISP-6, ISP-7 e Suter com e sem tirosina. Após o cultivo, as colorações detectadas foram distinguidas de acordo com o sistema de identificação de cores RAL K-7® (RAL Farben) (Shirling & Gottlieb 1966; Wink 2012).

As características de crescimento, colorações dos micélios vegetativo (visto no anverso da placa) e aéreo e presença de pigmentos solúveis foram avaliadas após incubação a 30°C por 7-14 dias, em todos os meios, exceto no ágar Suter. A cromogenicidade foi averiguada mediante análise do cultivo nos meios ISP-6, ISP-7 e Suter suplementado ou não com tirosina (Korn-Wendisch & Kutzner 1992).

4.9.1.2 Micromorfologia

4.9.1.2.1 Microscopia óptica

A determinação das características micromorfológicas da actinobactéria foi realizada conforme procedimento descrito abaixo.

A morfoespécie foi cultivada por 14 dias a 30°C em ágar ISP-2, foi semeada em três estrias bem delimitadas na superfície do outro meio sólido ISP-2. Em seguida, lamínulas esterilizadas foram inseridas formando um ângulo de aproximadamente 45°C em com distâncias equivalentes entre si, sobre o local das estrias (técnica da lamínula enterrada) (Holt et al. 1994).

Após incubação a 30°C por 14 dias foi observada a esporulação das colônias. As lamínulas foram retiradas com auxílio de pinça esterilizada e depositadas na superfície de lâminas de microscopia. Em seguida, o material foi levado ao microscópio óptico para observação das seguintes características morfológicas: presença de cadeia de esporos, esporângio, esporos únicos e sua superfície e fragmentação de micélio aéreo ou vegetativo. A coloração de Gram e a técnica de Ryu também foram executadas (Wink 2012).

4.9.1.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

4.9.1.2.2.1 Preparação das amostras biológicas

A amostra bacteriana foi preparada para a microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Estudos Morfológicos (LABEM) do Departamento de Histologia (DHISTO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFG sob orientação da Profa. Dra. Walquíria Arruda.

A morfoespécie foi inicialmente cultivada de acordo com a técnica da lamínula enterrada, explicada anteriormente (item 4.8.1.2.1). Devido aos solventes orgânicos usados no processo, toda essa etapa experimental foi efetuada no interior de capela de exaustão.

Primeiramente, câmaras úmidas foram montadas para a deposição do material biológico a ser submetido ao tratamento. Tais câmaras consistiam de placas de Petri descartáveis de tamanho médio preenchidas com papel filtro comum, umedecido com a solução fixadora específica, e lâminas simples de microscopia na superfície. A confecção dessas câmaras teve como principal objetivo evitar a desidratação do material durante o processamento.

Posteriormente, as lamínulas inseridas no meio de cultivo foram transferidas para as lâminas nas câmaras úmidas. Depositou-se sobre a superfície da lamínula a mesma solução fixadora com a qual se umedeceu o papel filtro das câmaras. Então, foi incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente, três lavagens de 5 minutos foram realizadas com tampão cacodilato de sódio a 0,1 M para remoção da solução de fixação. O excesso da mistura foi descartado.

As câmaras foram organizadas e identificadas, com exceção da aplicação da solução fixadora no papel filtro. As lamínulas parcialmente processadas foram transferidas para as câmaras recém-montadas para a etapa de desidratação. As amostras foram tratadas sucessivamente com concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 100%), com a duração aproximada de 5 minutos para cada etapa de lavagem. O excedente do álcool entre os passos de aplicação foi desprezado.

As lamínulas foram realocadas sobre novas lâminas nas câmaras úmidas. O agente secante hexa-metil-disilano (HDMS) foi adicionado às lamínulas pré-tratadas para atingir o ponto crítico. Seguida à incubação por 6 minutos, o excesso do reagente foi descartado e as amostras foram deixadas em repouso a temperatura ambiente até total secagem.

Finalmente, as lamínulas tratadas foram removidas para novas placas de Petri descartáveis, as quais foram armazenadas no interior de recipientes de acrílico preenchidos com partículas de sílica gel, a fim de garantir secagem total para a análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV). O material foi conservado a temperatura ambiente.

4.9.1.2.2.2 Observação em microscópio eletrônico de varredura

O exame morfológico dos isolados microbianos por microscopia eletrônica de varredura foi efetuado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), alocado no Instituto de Física (IF) da UFG, pela responsável técnica Dra. Tatiane Oliveira dos Santos. Inicialmente, as lamínulas processadas foram depositadas com auxílio de pinça em um suporte metálico apropriado. O material foi fixado nessa estrutura com tinta à base de carbono, a qual foi acrescida por meio de um pincel adequado apenas nas extremidades das lamínulas.

Confirmada a fixação das lamínulas no suporte, o mesmo foi transferido para o interior do aparelho *Denton Vacuum Desk V* para metalização das amostras. Completada a cobertura com partículas de ouro metálico, todo o material foi encaminhado para o MEV JEOL JSM 6610. Realizou-se micrografias em diferentes aumentos e campos para melhor visualização das estruturas

morfológicas do isolado. Realizou-se a comparação com as espécies já caracterizadas (Miyadoh et al. 1997).

4.9.2 Caracterização fisiológica e bioquímica

A actinobactéria foi caracterizada fenotipicamente por vários testes nutricionais, de degradação, atividade enzimática e tolerância a múltiplos fatores (Shirling & Gottlieb 1966; Williams et al. 1983; Wink 2012).

4.9.2.1 Testes nutricionais e de tolerância

O crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio; sensibilidade a variados compostos químicos e antimicrobianos; e a diversos graus de pH e salinidade foram averiguados por meio do emprego de Microplacas™ GEN III (Biolog). O painel consiste em 94 testes fenotípicos (Figura 11) e é utilizado para obtenção do perfil metabólico e caracterização bioquímica de um amplo conjunto de bactérias, auxiliando na identificação taxonômica microbiana a níveis específicos.

O preparo do isolado da actinobactéria para a execução da etapa de fenotipagem foi realizado mediante cultivo inicial em caldo 5006 modificado (Wink 2012) incubado sob agitação rotativa a 130rpm a 30°C durante 48-72 h. Alíquotas de 1,0mL da cultura foi diluída em tubos com 9,0 mL de água destilada esterilizada. O conteúdo dessa suspensão foi vertido em reservatórios esterilizados. O volume de 100µL foi transferido os poços das microplacas, com auxílio de pipeta multicanal, e incubadas a 30°C por 10 a 14 dias, com monitoramento diário. A leitura dos testes foi efetuada mediante observação de crescimento micelial e turvação no interior dos poços, indicando o resultado positivo.

Com o propósito de complementar a caracterização proveniente do uso da microplaca, testes de tolerância a crescentes níveis de pH e concentração de NaCl foram executados separadamente.

Para a tolerância a diferentes pH, o isolado foi semeado em ágar ISP-2, com os seguintes intervalos de pH: 4,0; 5,0; 7,0; 9,0; 11,0. Quanto à salinidade

do meio, os isolados foram cultivados em meio basal específico em placas de cultura para crescentes concentrações de NaCl: 0%; 2,5%; 5,0%; 7,5% e 10,0%.

A1 Controle negativo	A2 Dextrina	A3 D-maltose	A4 D-trealose	A5 D-celobiose	A6 Gentiobiose	A7 Sacarose	A8 D-turanose	A9 Estaquiose	A10 Controle positivo	A11 pH 6	A12 pH 5
B1 D-rafinose	B2 α -D-lactose	B3 D-melibiose	B4 β -metil-D- glicosídeo	B5 D-salicina	B6 N-acetil-D- glicosamina	B7 N-acetil-D- manosamina	B8 N-acetil-D- galactosamina	B9 Ácido N- acetil neuramínico	B10 NaCl 1%	B11 NaCl 4%	B12 NaCl 8%
C1 α -D-glucose	C2 D-manose	C3 D-frutose	C4 D-galactose	C5 3- metilglucose	C6 D-fucose	C7 L-fucose	C8 L-ramnose	C9 Inosina	C10 Lactato de sódio 1%	C11 Ácido fússico	C12 D-serina
D1 D-sorbitol	D2 D-manitol	D3 D-arabitol	D4 Mio-inositol	D5 Glicerol	D6 Glicose-6- PO4	D7 D-Frutose- 6-PO4	D8 Ácido D- aspártico	D9 D-serina	D10 Trosandomicina	D11 Rifamicina	D12 Minociclina
E1 Gelatina	E2 Glicil-L- prolina	E3 L-alanina	E4 L-arginina	E5 Ácido L- aspártico	E6 Ácido L- glutâmico	E7 L-histidina	E8 Ácido L- piroglutâmico	E9 L-serina	E10 Lincomicina	E11 Hidroclorato de guanidina	E12 Niaproof 4
F1 Pectina	F2 Ácido D- galacturônico	F3 Ácido L- galactônico lactona	F4 Ácido D- glucônico	F5 Ácido D- glucurônico	F6 Glucoronamida	F7 Ácido múico	F8 Ácido químico	F9 Ácido D- sacárico	F10 Vancomicina	F11 Violeta de tetrazólio	F12 Azul de tetrazólio
G1 p-hidroxil- ácido fenilacético	G2 Metil piruvato	G3 Ácido D- lático metil éster	G4 Ácido L- lático	G5 Ácido cítrico	G7 Ácido α - cetoglutárico	G7 Ácido D- málico	G8 Ácido L- málico	G9 Ácido bromo- succínico	G10 Ácido nalidíxico	G11 Clorato de lítio	G12 Telhrito de potássio
H1 Tween 40	H2 Ácido gama- aminobutírico	H3 Ácido α - hidroxibutírico	H4 Ácido DL- β - hidroxibutírico	H5 Ácido α - cetobutírico	H6 Ácido acetoacético	H7 Ácido propiónico	H8 Ácido acético	H9 Ácido fórmico	H10 Axtreonam	H11 Butirato de sódio	H12 Bromato de sódio

Figura 11. Representação esquemática da Microplaca™ GEN III da Biolog (adaptado de: <http://www.biolog.com/pdf/milit/00P%20185rA%20GEN%20III%20MicroPlate%20IFU%20Mar2008.pdf>, acessado em 01/11/2014).

4.9.2.2 Testes enzimáticos e de degradação

A hidrólise de amido foi verificada mediante cultivo da actinobactéria em ágar de Bennet modificado (ABM). Decorrido o período de uma semana de incubação, solução de lugol foi aplicada na superfície do meio de cultura. A visualização de zona clara em torno da colônia bacteriana confirmou qualitativamente a ação amilolítica (Jones 1949).

A atividade proteolítica foi detectada após cultivo da bactéria em meio basal (Vieira 1999) adicionado de 1,5% (v/v) de leite desnatado (caseína). Após a incubação por uma semana, a leitura foi realizada após exposição à solução de ácido acético a 5,0% (v/v), sendo resultado positivo por meio da observação de halos claros ao redor das colônias.

A degradação de gelatina foi observada em caldo de Bennet com 0,4% de gelatina. O inóculo foi realizado em tubos de cultura com 3,0mL de meio

basal, incubado por 7 dias. Após esse período, de incubação os tubos foram novamente incubados sob refrigeração (4°C) por 15 minutos. A positividade foi determinada por meio da não solidificação.

A produção de lipase e esterase foi examinada por meio do inóculo da amostra no meio de Sierra (1957) suplementado com Tween 80 e Tween 20, respectivamente. Regiões opacas na periferia das colônias, efeito da precipitação de cristais de cálcio a partir dos ácidos graxos liberados na degradação dos lipídios, indicaram resultado positivo depois de 7 dias de incubação.

A degradação de DNA e RNA foi averiguada após crescimento do isolado em ágar Bacto DNase (Himedia) e ágar triptona acrescido de 0,3% de RNA (Goodfellow & Alderson 1979), respectivamente. Em seguida, foi incubado por 7 dias. A atividade das nucleases foi revelada por meio da transferência para a superfície do meio de uma solução de HCl 1,0M. A formação de áreas transparentes envolvendo a colônia bacteriana atestou a digestão enzimática dos ácidos nucleicos.

O ágar ureia (Korn-Wendisch & Kutzner 1992) foi adotado para analisar a hidrólise do referido composto orgânico. A semeadura foi realizada em placas de Petri contendo o meio com 1,0% (m/v) de ureia, previamente esterilizada por filtração. Após 5 dias de cultivo, a ação ureolítica foi certificada pela alcalinização do meio, provocada pela liberação de amônia como produto de hidrólise, observando a mudança da coloração de avermelhado para róseo, por meio da viragem do indicador de pH (vermelho de fenol).

A hidrólise de ácido úrico (0,5%, m/v) foi determinada em meio basal (Vieira 1999). Após 7 a 9 dias de incubação, o desenvolvimento de zona transparente ao redor da colônia foi indicativo da produção de uricase.

A degradação de esculina (0,1%, m/v) foi confirmada após inóculo microbiano em placas contendo o meio sólido basal. O período de incubação foi de cinco a dez dias. (Williams et al. 1983). O resultado positivo consistiu no escurecimento do meio na periferia das colônias, consequência da formação de complexos dos derivados metabólicos do glicosídeo com o citrato férrico.

A redução de nitrato foi analisada em tubos de cultura com 5,0mL de ágar nitrato modificado (Atlas 2005). O inóculo foi realizado com o auxílio de agulha bacteriológica e a incubação por sete a 14 dias. A revelação foi feita com

o acréscimo de 0,2mL dos reagentes de Griess-Ilosvay (I e II) em cada tubo. O aparecimento de coloração avermelhada na superfície do meio comprovou a redução do composto inorgânico em nitrito.

A produção de catalase foi determinada após o cultivo dos isolados por 7 dias em ABM. Colônias isoladas foram homogeneizadas em gotas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), previamente depositadas sobre lâminas de microscopia. A formação de bolhas de oxigênio foi considerada como positivo.

Todos os testes fenotípicos foram executados em triplicata. A bactéria foi semeada diretamente a partir da suspensão de esporos em glicerol a 20%. A incubação ocorreu em estufa microbiológica a 30°C.

4.9.3 Caracterização molecular do isolado

A caracterização taxonômica do isolado foi executada por meio da amplificação, sequenciamento e identificação por comparação do segmento gênico que codifica a porção do 16S rRNA.

4.9.3.1 Extração do DNA genômico

O isolamento do DNA total da actinobactéria selecionada foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Van Soolingen e colaboradores (1994). O isolado foi inicialmente cultivado em *Erlenmeyer* contendo 50mL de caldo ISP-2 acrescido de 0,5% de glicina (Hopwood et al. 1985) sob agitação (140rpm) a 30°C por 48-72 horas. Uma alíquota de 1,5mL da cultura foi transferida para microtubo *Eppendorf*, o qual foi centrifugado a 6.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado. Um volume de 1,5mL de cultura líquida foi adicionada ao tubo, que foi submetido à centrifugação sob as mesmas condições anteriores.

Após o descarte do sobrenadante, a amostra foi ressuspensa em 400µL de tampão Tris/EDTA (TE) e 40µL de lisozima (20µg/mL) e incubada em banho-maria a 37°C por 1h e 30 minutos. Posteriormente, alíquota de 70µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% e 6,0µL de proteinase K (Sigma-Aldrich) a 10mg/mL foram transferidas para o microtubo, o qual foi novamente incubado a

56°C por 10 minutos. Logo após, adicionou-se à amostra 100µL de NaCl 5M e 80µL de solução de CTAB/NaCl 0,73M, em seguida foram agitadas em vórtex até a solução apresentar um aspecto leitoso.

Posteriormente, um volume de 650µL de clorofil (clorofórmio: álcool isoamílico, 24:1, v/v) foi acrescido ao microtubo e foi agitado manualmente por 30 segundos. Realizou-se a centrifugação por 15 minutos a 12.000g, posteriormente a fração superior da solução foi removida para novos tubos e precipitado com 0,6 volumes (0,6X) de isopropanol. A amostra foi armazenada em *freezer* a -20°C por 18-24 h.

O material foi finalmente centrifugado por 20 minutos a 12.000g, o sobrenadante foi desprezado e 1,0mL de etanol a 70% gelado foi transferido ao microtubo. Encerrada mais uma fase de centrifugação a 12.000g por 5 minutos a 4°C, o material permaneceu em repouso a temperatura ambiente para secagem. O DNA extraído foi finalmente redissolvido em 40µL de água ultrapura esterilizada. A confirmação da extração de DNA foi efetuada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0%, como descrito no item 4.5. As amostras foram preservadas a -20°C.

4.9.3.2 Amplificação do segmento gênico do 16S rRNA

A região gênica codificante do 16S rRNA foi amplificada por reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) a partir do DNA genômico extraído. Foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores universais para o domínio Eubacteria 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al. 1991). A mistura de reação foi preparada para um volume final de 50µL, incluindo 5,0µL de tampão 1X da Taq polimerase (Invitrogen), 1,5µL de MgCl₂ (50 mM), 1,5µL de cada primer (10µM), 4,0µL de solução de dNTPs (10 mM) (Invitrogen), 1,0µL de Taq polimerase (5U) (Invitrogen), 1,0µL de DNA (50-100ng) e 35,5µL de água ultrapura esterilizada.

A PCR consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificação, cada um consistindo de: desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a

72°C por 2 minutos, e um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação (aproximadamente 1.500 pb) foram detectados após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE 1X, utilizando-se o padrão de massa molecular (ladder) (1Kb) (Invitrogen), a 100V por 20 minutos e 80V por 45 minutos.

4.9.3.3 Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi executada de acordo com modificação da metodologia padronizada por Silva e colaboradores (2008). A amostra foi precipitada com dois volumes (2X) de isopropanol gelado a 65% e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000g por 5 minutos. Prosseguiu-se com uma lavagem com o mesmo volume de etanol a 70% gelado, o microtubo foi novamente centrifugado e invertido sobre papel toalha a temperatura ambiente depois do descarte do sobrenadante. Finalizada a secagem, o DNA purificado foi ressuspensão em 20µL de água ultrapura esterilizada. O material foi conservado a -20°C.

4.9.3.4 Sequenciamento da região gênica do 16S rRNA

O produto de PCR purificado foi enviado ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (UCB) para sequenciamento. O processo foi realizado em um sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems) e os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR foram aplicados na reação de sequenciamento separadamente. Os dados derivados do sequenciamento foram enviados em arquivos no formato *.ab1, os quais foram acessados mediante o programa *Sequence Scanner* (Applied Biosystems).

4.9.3.5 Identificação molecular com base nas sequências gênicas de 16S rRNA

As sequências nucleotídicas geradas foram editadas no *software* CodonCode Aligner versão 5.01, o qual já inclui os programas Phred/Phrap/Consed, principalmente para a retirada de bases de baixa

qualidade (phred < 20). As sequências resultantes do gene do 16S rRNA foram comparadas quanto à sua similaridade com outras depositadas no *GenBank* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), via a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), BLASTn (*nucleotide BLAST*), especificamente (Altschul et al. 1990). Os primeiros resultados (*hits*) com maiores valores de identidade foram listados como a provável identificação do isolado de actinobactéria.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento das actinobactérias

A identificação inicial dos isolados com potencial uso na prospecção de enzimas foi realizada selecionando organismos com aspecto de colônia típico de *Actinoplanetes*, ou seja, colônias ressecadas e bem aderidas ao ágar de isolamento. Foram isoladas 22 amostras, com nomenclatura baseada no ponto de coleta (Biblioteca central): “BC-A” com numeração de 1 a 22. Os isolados BC-A.4, BC-A.6 e BC-A.14 foram excluídos, por apresentarem crescimento característico de fungos (BC-A.4 e BC-A.6) e crescimento mucoide (BC-A.14) característico de bactérias que não *Actinoplanetes* quando semeados em meio ISP-2.

5.2 Teste de atividade enzimática sobre L-asparagina

Todos os 19 isolados da etapa anterior foram submetidos ao teste de triagem de produção da enzima L-asparaginase. Foi realizada a média de três repetições do experimento e os resultados podem ser observados na tabela 2. Aproximadamente 94% dos isolados apresentaram atividade enzimática satisfatória. Apenas um dos isolados não apresentou atividade para a enzima a ser prospectada.

O IE para os diferentes isolados variou de 0 (isolado BC-A.10) a 4,1 (isolado BC-A.1). Outros isolados como BC-A.13 (4,0), BC-A.2 e BC-A.17 (3,7) apresentaram IE bem próximo ao isolado BC-A.1. Apesar das médias destes isolados serem semelhantes, a morfoespécie BC-A. 1 foi escolhida em virtude da visualização do halo ao redor da colônia ser produzido em até 72 horas, diferentemente dos demais isolados, onde halo de atividade enzimática ficou visível apenas decorridas 120 horas de crescimento. Na figura 11 observamos os resultados de quatro isolados quanto à produção de atividade enzimática.

Tabela 2. Índice enzimático das morfoespécies isoladas de amostra de solo do Cerrado

Morfoespécies isoladas	Índice enzimático*
BC-A.1	4,1
BC-A.2	3,7
BC-A.3	3,1
BC-A.5	2,0
BC-A.7	2,2
BC-A.8	2,8
BC-A.9	1,8
BC-A.10	-
BC-A.11	2,2
BC-A.12	2,7
BC-A.13	4,0
BC-A.15	1,6
BC-A.16	2,0
BC-A.17	3,7
BC-A.18	1,5
BC-A.19	1,8
BC-A.20	1,3
BC-A.21	1,7
BC-A.22	1,3

* Média de 3 repetições.

- Sem produção enzimática.

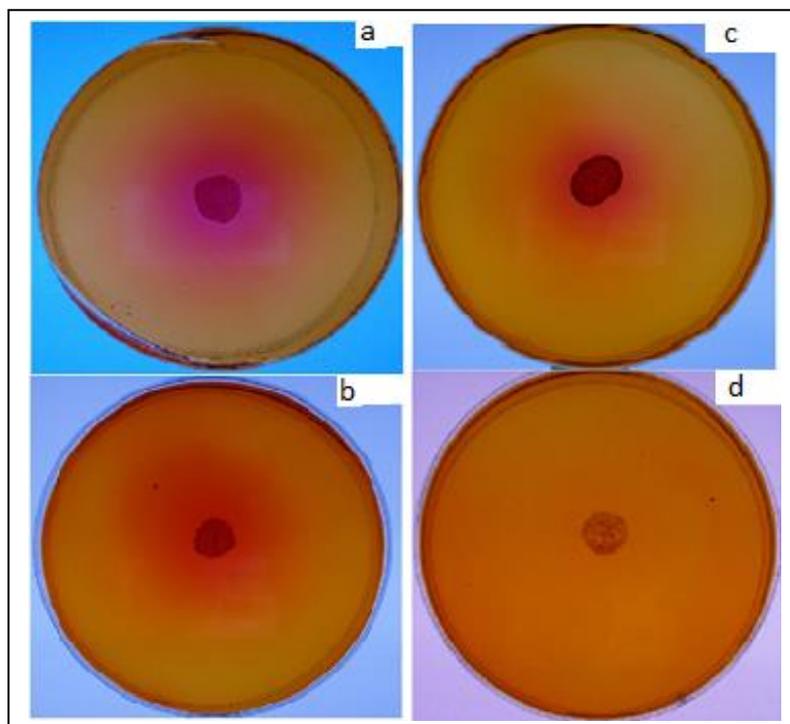


Figura 12. Halos de atividade enzimática dos isolados BC-A.1 (a), BC-A.8(b), BC-A.18 (c) e BC-A.10 (d) após 120 horas de crescimento

5.3 Fermentação submersa

A fermentação submersa para a produção da enzima foi realizada obtendo-se aproximadamente 1.000mL de extrato enzimático bruto. A figura 13 apresenta um dos meios de indução da produção enzimática decorridas 120 horas da produção. Após a filtração a vácuo, foi obtido o extrato bruto (E.B.), e a massa micelial armazenada a temperatura de -20°C .

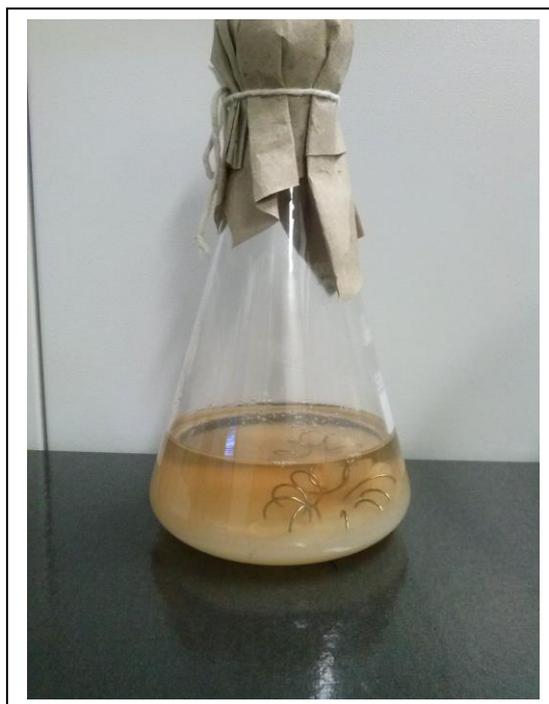


Figura 13. Meio de cultura indutor após 120 horas de cultivo sob agitação rotativa.

5.4 Purificação parcial da L-asparaginase

Após a obtenção das soluções dialisadas (consideradas parcialmente purificadas) foram obtidas aproximadamente 20mL das frações: DP 60, Sob. 60, DP 80 e Sob. 80, utilizadas para os experimentos de determinação da atividade enzimática, caracterização da enzima e dosagem de proteínas. Não foi possível realizar a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida para a verificação do provável peso molecular da enzima produzida em virtude da reduzida quantidade de enzima produzida pela bactéria.

A dosagem de proteínas sugeriu uma quantidade reduzida de proteínas nas frações obtidas, contudo, fica implícito a alta efetividade da proteína produzida pela actinobactéria isolada a partir de métodos clássicos de bioprospecção de solo. A quantidade de proteína detectada nas frações pode ser detectada na figura 14. As frações parcialmente purificadas, concentram mais proteína que o extrato bruto, indicando o sucesso na concentração parcial das proteínas.

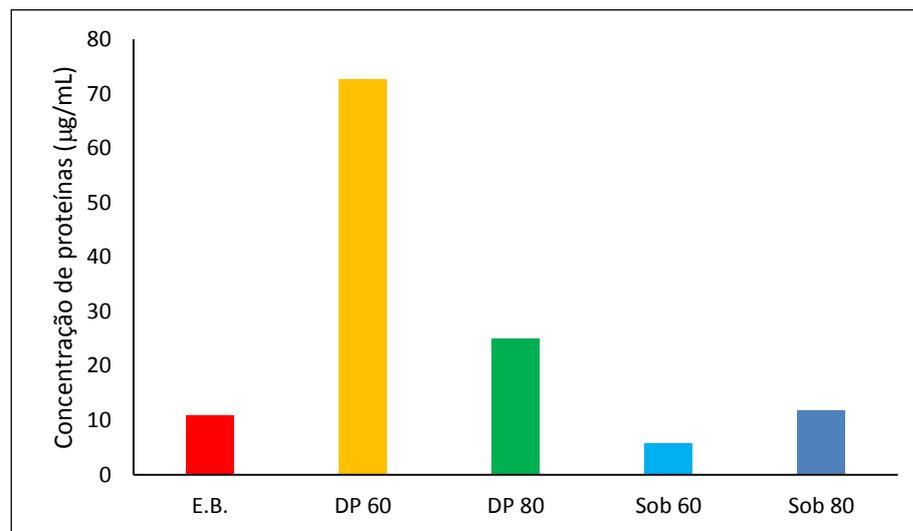


Figura 14. Dosagem da quantidade de proteínas presentes nas no extrato bruto (E.B.) e nas frações: dialisado precipitado saturado a 60% com sulfato de amônio (DP 60), dialisado precipitado saturado a 80% (DP 80), dialisado sobrenadante saturado a 60% (Sob 60) e dialisado sobrenadante saturado a 80% (Sob 80).

Uma unidade de asparaginase é a quantidade de enzima que catalisou a formação de 1 µmol de amônia por mililitro (U/mL) por minuto às temperaturas e pH testados.

5.5 Otimização da atividade enzimática

5.5.1 Otimização da temperatura

A partir dos experimentos realizados, e da curva de calibração realizada observa-se que a fração com a melhor atividade enzimática obtida foi o DP 80,

onde a precipitação proteica realizada foi a de 80%. Tanto a fração DP 80, Sob 60 e o extrato bruto obtiveram resultados semelhantes, o que indica que a atividade obtida foi parcialmente purificada. O processo utilizado consistiu primeiramente na precipitação por saturação com o sulfato de amônio, e posteriormente diálise para a retirada do sal da amostra.

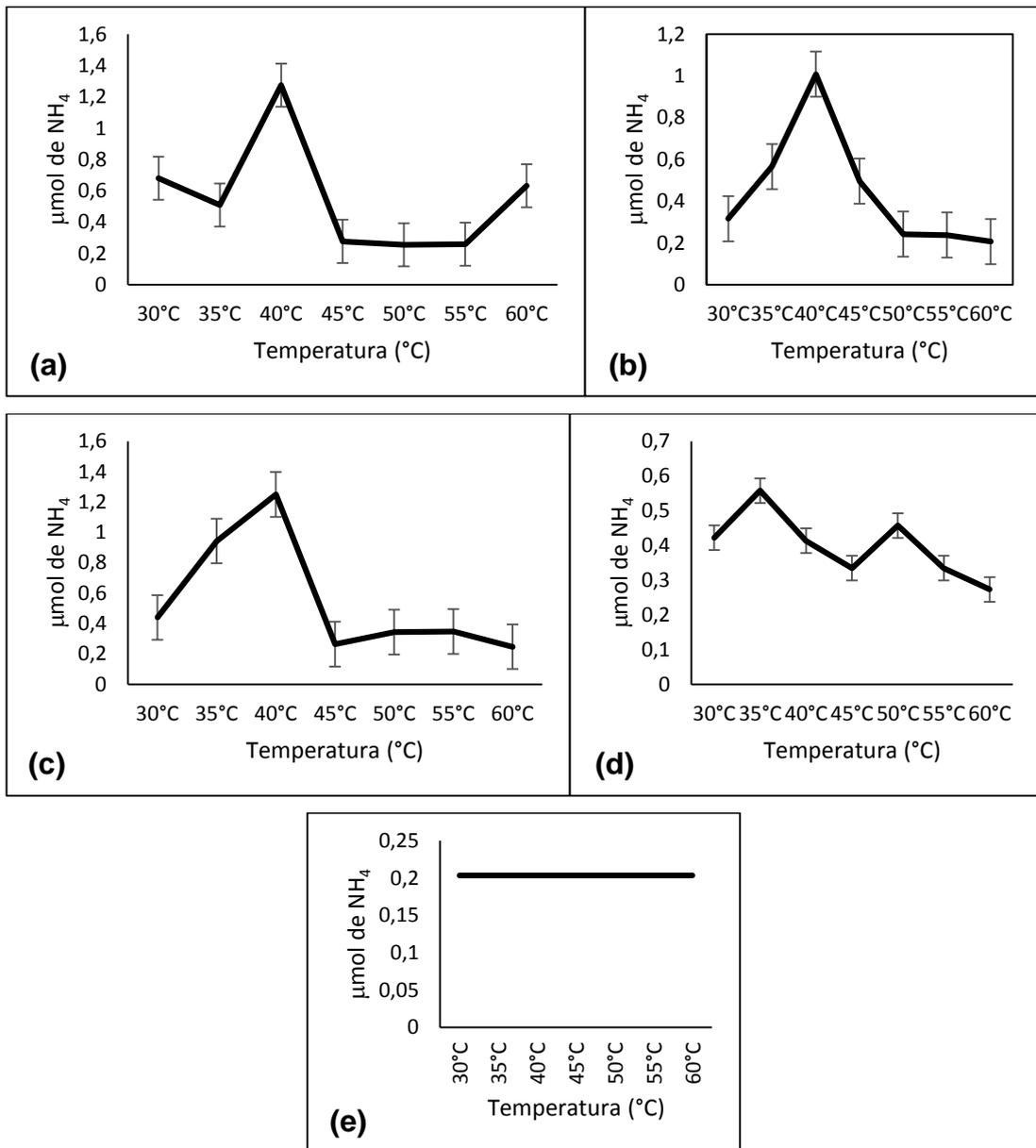


Figura 15. Gráficos demonstrando a produção de íons de amônia de cada uma das frações testadas, tendo a temperatura como variável: Extrato Bruto **(a)**; dialisado sobrenadante saturado a 60% **(b)**; dialisado precipitado saturado a 80% **(c)**; dialisado precipitado saturado a 60% **(d)** e dialisado sobrenadante saturado a 80% **(e)**.

A melhor atividade detectada foi sob a temperatura de 40°C tanto no extrato bruto da enzima quanto nas frações Sob 60 e DP 80 (Figura 15), indicando que a enzima produzida atua melhor sobre esta temperatura.

5.5.2 Otimização do pH

De acordo com os testes realizados variando o potencial hidrogeniônico da solução a 40°C (única testada para a otimização do pH), o extrato bruto bem como a fração DP 80 obtiveram melhores resultados sob o pH 8 (Figura 16); embora sob pH 7 o parcialmente purificado Sob 60 tenha tido melhores resultados. Em todas as frações selecionadas para estes testes, pouca ou nenhuma atividade enzimática foi detectada a pH inferior a 6 e igual ou superior a 10, para todos os extratos selecionados.

5.6 Caracterização do isolado

5.6.1 Caracterização morfológica

5.6.1.1 Macromorfologia

Após a etapa de triagem, foi realizada a caracterização do isolado com melhor atividade enzimática. Os testes de macromorfologia foram realizados de acordo com o protocolo de Shirling & Gottlieb (1966), analisando os morfologia das colônias sobre os meios do *International Streptomyces Project* (ISP) e a identificação taxonômica dos isolados foi realizada de acordo com protocolo descrito por Wink (2012). A morfoespécie apresentou possível produção de melanina (Tabela 3) e diferentes colorações nos diversos meios ISP testados (Tabela 4). A figura 17 mostra os diferentes meios em que a bactéria foi cultivada e a ausência de coloração produzida nos meios ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5 e ISP-7.

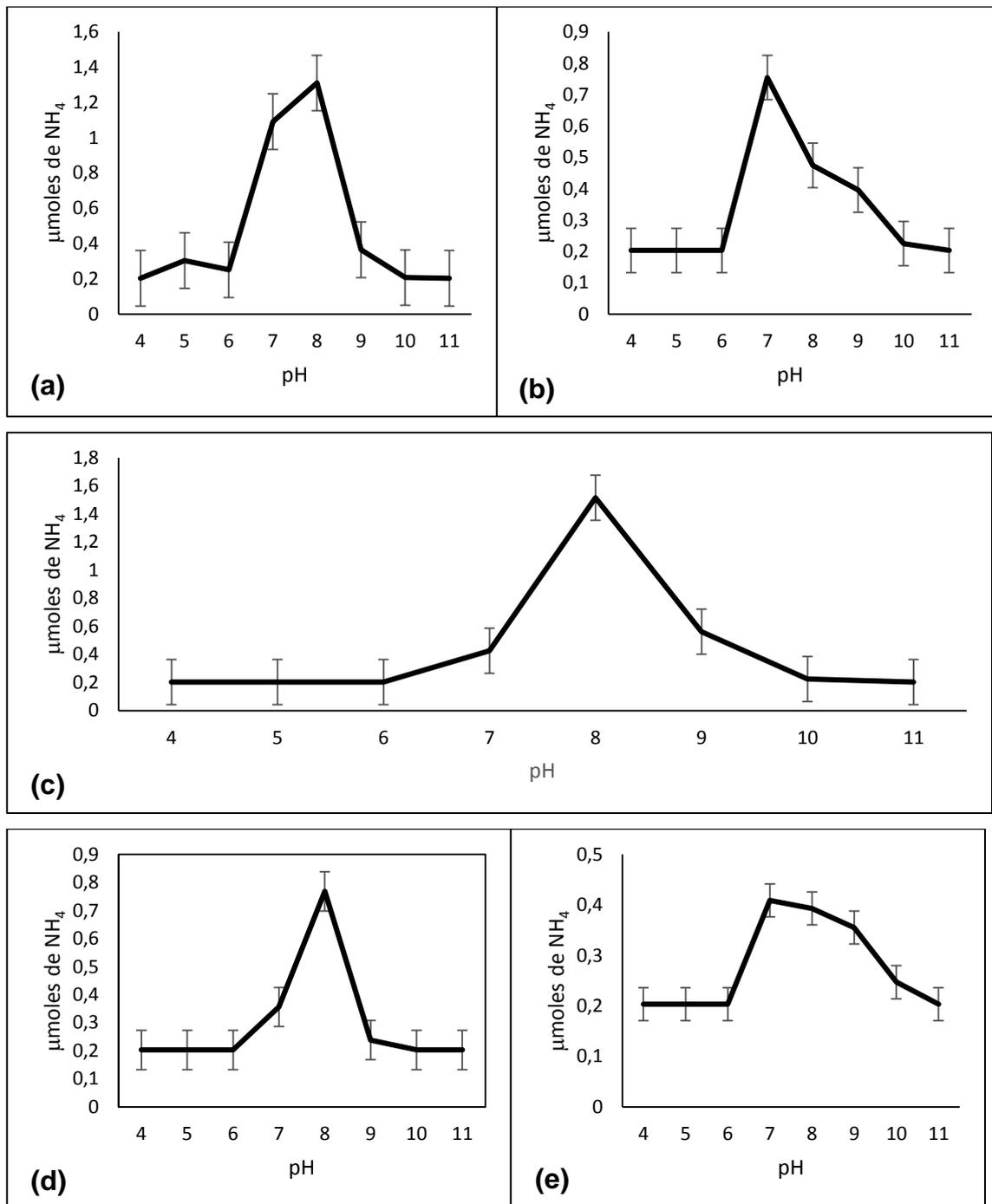


Figura 16. Gráficos demonstrando a produção de íons de amônia de cada uma das frações testadas, tendo o pH como variável: Extrato Bruto **(a)**; dialisado sobrenadante saturado a 60% **(b)**; dialisado precipitado saturado a 80% **(c)**; dialisado precipitado saturado a 60% **(d)** e dialisado sobrenadante saturado a 80% **(e)**.

Tabela 3. Produção de pigmento difusível relativo a melanina pelo isolado

ISP-6	ISP-7	Suter com tirosina	Suter sem tirosina
+	-	+	-

+ = positivo; - = negativo.

Tabela 4. Morfologia colonial dos isolados de actinobactérias nos meios específicos de caracterização taxonômica após 14 dias de cultivo a 30°C

Meios	Crescimento	Cor reversa	Micélio aéreo	Pigmento solúvel
ISP-2	B	Marrom bege (1011)	Telecinza 4 (7047)	N
ISP-3	B	Cinza cristal (7032)	Telecinza 4 (7047)	N
ISP-4	B	Marrom bege (1011)	Telecinza 4 (7047)	N
ISP-5	E	Marrom bege (1011)	N	N
ISP-6	B	Marrom claro (8007)	N	Marrom claro (8007)
ISP-7	B	Cinza bege (1019)	Telecinza 4 (7047)	N

B = Bom; E = Esparso; N = Nenhum.

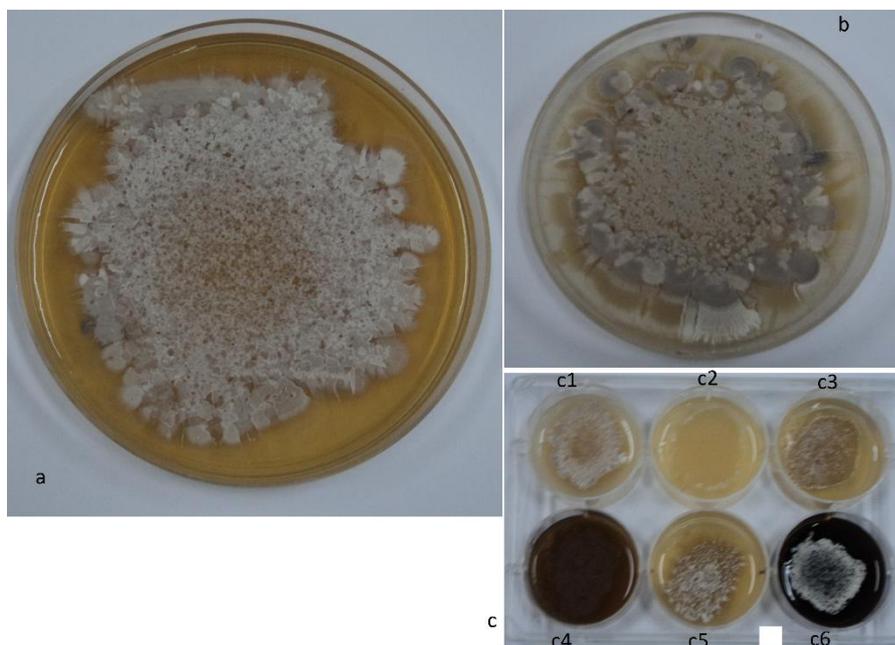


Figura 17. Morfoespécie inoculada nos meios ISP-2 (a), ISP-3 (b), ISP-4 (c1), ISP-5 (c2), ISP-6 (c4), ISP-7 (c5) e Suter sem a presença de tirosina (c3) e com a presença de tirosina (c6).

5.6.1.2 Micromorfologia

Após a realização da técnica de lamínula enterrada (item 4.9.1.2.1) não foi possível a visualização de esporângios, entretanto observou-se cadeia de esporos, isolados e fragmentação dos micélios. Em seguida comparou-se com o material de Miyadoh et al. (1997) para a classificação da morfologia. A superfície dos esporos apresentou-se lisa, sem ornamentação, sendo parcialmente flexíveis no arranjo micelial mesmos, foi classificada como *rectiflexibilis* (Figura 18). Com estes resultados, sugere-se que este isolado seja do gênero *Streptomyces*. Na realização da coloração de Gram, bem como por meio da técnica de Ryu, observou-se que a morfoespécie apresentou características de bactérias Gram-positivas.

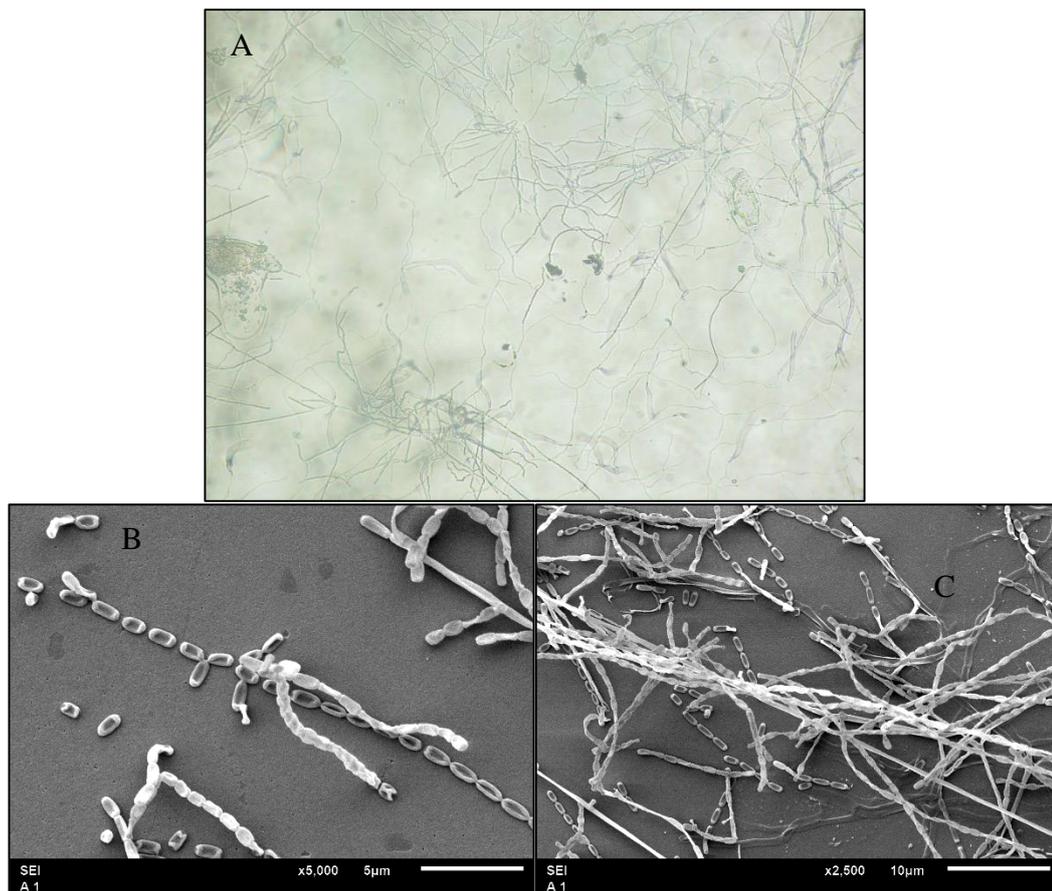


Figura 18. Cadeia de esporos vista em aumento de 1000X (A) em microscópio óptico; visualização de cadeia de esporos isolada (B) (aumento de 5.000X); visualização de várias cadeias de esporos (aumento de 2.500X) (C) da morfoespécie BC-A.1.

5.6.2 Caracterização fisiológica e bioquímica

Além da classificação pelos fenótipos produzidos pelo isolado, realizou-se também a caracterização fisiológica e bioquímica da morfoespécie. Para isso foi utilizada o painel da Microplaca™ GEN III (Biolog), testes manuais de tolerância e atividade enzimática da bactéria frente a diversos substratos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Testes enzimáticos e de resistência a diferentes condições do isolado BC-A.1

Características		Características	
Sensibilidade aos antimicrobianos		Testes de tolerância	
Ácido nalidíxico	+	pH 4,0	-
Aztreonam	+	pH 5,0	+++
Lincomicina	-	pH 7,0	+++
Minociclina	+	pH 9,0	+++
Rifamicina	+	pH 11,0	-
Troleandomicina	+	NaCl 0%	+++
Vancomicina	+	NaCl 2,5%	+++
Ácido fusídico	+	NaCl 5,0%	++
Testes enzimáticos e de degradação		NaCl 7,5%	±
Gelatina	+	NaCl 10,0%	-
Tween 20	+	Controles	
Tween 80	+	Positivo	+
DNA	+	Negativo	-
RNA	+	Sensibilidade a agentes químicos	
Uréia	+	Lactato de sódio 1,0%	+
Amido	+	D-serina	+
Redução de nitrato	-	Niaproof 4	-
Produção de catalase	+	Azul de tetrazólio	-
Ácido úrico	+	Violeta de tetrazólio	+
Esculina	+	Hidrocloreto de guanidina	+
		Cloreto de lítio	+
		Telurito de potássio	+
		Butirato de potássio	+
		Bromato de sódio	+

Para os testes enzimáticos e de degradação, de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio e sensibilidade a antimicrobianos e agentes químicos: + = presença de crescimento/positividade para o teste; - = ausência de crescimento/negatividade para o teste.

Para os testes de tolerância: ++ = presença de micélio vegetativo e micélio aéreo em desenvolvimento; +++ = ótimo desenvolvimento dos micélios vegetativo e aéreo; ± = crescimento escasso; - = ausência de crescimento.

Tabela 6. Testes de crescimento em diferentes fontes de carbono

Característica		Característica	
Crescimento em diferentes fontes de C e N		Crescimento em diferentes fontes de C e N	
Dextrina	+	Ácido α -cetobutírico	+
D-maltose	+	Ácido acetoacético	+
D-trealose	+	Ácido propiônico	+
D-celobiose	+	Ácido acético	+
Gentiobiose	+	3-metilglucose	+
Sacarose	+	D-fucose	+
D-turanose	+	L-fucose	+
Estaquiose	+	L-ramnose	+
D-rafinose	+	Inosina	+
α -D-lactose	+	D-sorbitol	+
D-melibiose	+	D-manitol	+
β -metil-D-glicosídeo	+	D-arabitol	+
D-salicina	+	Mio-inositol	+
N-acetil-D-glicosamina	+	Glicerol	+
N-acetil-D-manosamina	+	Glicose-6-PO ₄	+
N-acetil-D-galactosamina	+	D-Frutose-6-PO ₄	+
Ácido N-acetil neuramínico	+	Ácido D-aspártico	+
α -D-glucose	+	D-serina	-
D-manose	+	Gelatina	-
D-frutose	+	Glicil-L-prolina	+
D-galactose	+	L-alanina	+
L-serina	+	L-arginina	+
Pectina	+	Ácido L-aspártico	+
Ácido D-galacturônico	+	Ácido L-glutâmico	+
Ácido L-galactônico lactona	+	L-histidina	+
Ácido D-glucônico	+	Ácido L-piroglutâmico	+
Ácido D-glucorônico	+	Ácido D-sacárico	+
Glucoronamida	+	p-hidroxil-ácido fenilacético	+
Ácido mícico	+	Metilpiruvato	+
Ácido L-málico	+	Ácido D-láctico metil éster	+
Ácido bromo-succínico	+	Ácido L-láctico	+
Tween 40	+	Ácido cítrico	+
Ácido gama-aminobutírico	+	Ácido α -cetoglutárico	+
Ácido hidroxibutírico	+	Ácido quínico	+
Ácido D,L- β -hidroxibutírico	+	Ácido D-málico	+
Controle positivo	+	Controle negativo	-

Para os testes enzimáticos e de degradação, de crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio e sensibilidade a antimicrobianos e agentes químicos: + = presença de crescimento/positividade para o teste; – = ausência de crescimento/negatividade para o teste.

5.6.3 Caracterização molecular do isolado

A extração do DNA total foi realizada, entretanto não foi possível realizar purificação, sequenciamento e posterior análise no banco de dados *Genbank* por ferramentas de bioinformática, devido a problemas decorridos na padronização da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram empregadas metodologias clássicas de isolamento de micro-organismos, bioprospecção de compostos economicamente ativos e também para a caracterização do composto estudado bem como na tentativa de identificação da bactéria de interesse.

A coleta de solo foi realizada no final da estação chuvosa, fator que pode ter reduzido a quantidade de actinobactérias recuperadas pelo método selecionado. Várias foram as técnicas analisadas para a recuperação de amostras bacterianas raras (Palleroni 1976a, Hayakawa et al. 2004, Silva 2013), entretanto a adotada foi aquela descrita por Palleroni (1976a). Tal metodologia foi empregada por sua simplicidade e potencialidade de recuperar actinobactérias raras presentes nos solos, pertencentes ao *Genera Actinoplanetes*.

Zhang & Zhang (2011) reportaram diferentes métodos para recuperar gêneros raros de actinobactérias. Identificaram diversos gêneros em diferentes tipos de solos. Mesmo encontrando vários gêneros bacterianos, os autores identificaram, através de sua metodologia, a ubiquidade do gênero *Streptomyces*,

Os estudos de Silva e colaboradores (2013) comprovaram a prevalência de alguns gêneros de actinobactérias em solo de Cerrado. Dentre estes gêneros, destaca-se o *Streptomyces*, que obteve uma grande parcela de isolados. A coleta foi realizada no início de uma estação seca neste ambiente, possivelmente, influenciou no número de morfoespécies isoladas. Naquele estudo, onde foram realizadas coletas nas duas estações (chuvosa e seca) existentes no Bioma, verificou-se uma alta variação no número de espécies isoladas, dado que não pode ser comparado no presente estudo, uma vez que foi realizada apenas uma coleta.

Embora o procedimento de prospecção escolhido tenha sido descrito para a recuperação de *Actinoplanetes*, 19 espécies foram isoladas, mas não

foram realizados testes morfológicos, fenotípicos e moleculares em todas, apenas naquelas selecionadas para o teste secundário. A modificação (troca do agente quimioatrativo) realizada no método não explica o fato de *Actinoplanes* não terem sido recuperados, uma vez que a solução contida no capilar de ligação entre as câmaras foi a xilose, uma pentose pela qual estes organismos são atraídos. Apesar de não encontrar as espécies desejadas para o estudo, é importante verificar que o método é baseado em um comportamento dos esporos com motilidade (característica dos membros daquele *Genera*).

Um resultado importante de ser destacado é que o método obteve poucos organismos pertencentes a outros grupos taxonômicos, fato explicado pelo pré-tratamento empregado no solo. Possivelmente tal metodologia eliminou boa parte dos micróbios pertencentes aos demais táxons. Tal técnica eliminou outras espécies durante a secagem na estufa por 24-48 horas. Considerando este fato, esta etapa é indicada para o isolamento de actinobactérias raras, pelo fato de as mesmas serem mais resistentes que os demais organismos, no tocante à temperatura de pré-tratamento da amostra de solo.

Ao ser utilizada uma substância quimiotática (Palleroni 1976a) era esperado que houvessem mais bactérias raras no estudo realizado, uma vez que esse era um dos objetivos do presente trabalho. Estudo realizado no Cerrado com o objetivo de obter actinobactérias foram encontrados, em sua maioria, diferentes espécies do gênero *Streptomyces* (Silva et al. 2013b).

O teste rápido sugerido por Mahajan e colaboradores (2013) foi modificado para atender às necessidades nutricionais dos organismos estudados. O teste é simples de ser realizado, é considerado de fácil aplicabilidade e consiste na alteração de coloração do meio pela produção de amônia através da hidrólise da asparagina, como demonstrado nas figuras 7 e 12. Após a liberação do íon amônio, o meio, contendo vermelho de fenol (VF). A alcalinização no meio provoca a modificação na coloração vermelha do ágar para rosa, que foi de fácil visualização e medição para a obtenção do índice enzimático, resultado contrastante com o obtido pelos autores.

Diferentemente do que os autores reportam, o azul de bromotimol (BMB) utilizado nos testes de padronização da metodologia, não foi mais eficiente que o VF. Os halos gerados pelo primeiro, foram sempre significativamente menores que aqueles gerados pelo VF, podendo haver algum efeito citotóxico do BMB em

relação as cepas aqui estudadas, embora não haja relato na literatura de tal efeito. Assim como os autores relatam, BMB também foi de fácil visualização, nos testes de padronização da técnica. Com o BMB Mahajan e colaboradores (2013) o meio utilizado tinha um pH mais ácido que o FR, mas em seu relato, não discorrem sobre o motivo de tal diferença na acidez do meio de cultura.

Após a realização do teste de triagem da produção de enzima pelos organismos isolados, verificou-se que uma altíssima taxa (94%) desses microorganismos produziu a enzima de interesse. Muitos tiveram elevadas taxas de produção enzimática, entretanto a que se destacou foi a morfoespécie BC-A.1 que obteve um, surpreendente, IE médio de 4,1; em apenas três dias, comparando-se com as demais, as que se aproximaram da média desse isolado, necessitaram de cinco dias para a produção da enzima com efetiva ação catalítica. Desta forma selecionou-se esta bactéria para os testes que se seguiram.

O fato da maioria das morfoespécies apresentarem a atividade frente ao aminoácido não foi surpreendente, uma vez que estas bactérias são participantes essenciais no ciclo do nitrogênio, especialmente na etapa de amonificação que ocorre no solo, a partir da matéria orgânica depositada no solo (Waksman, 1927; Quirino et al., 2009).

Organismos do solo são importantes produtores de proteases, endoglucanases, pectinases e outras enzimas, antibióticos e inibidores enzimáticos com potenciais atrativos econômicos (Velho-Pereira & Kamat 2013). Nesta pesquisa elegeu-se apenas uma morfoespécie e uma das possíveis enzimas produzidas por tal organismo, para que fosse realizado um estudo desta molécula catalítica.

Verificou-se que a bactéria escolhida para os testes secundários provavelmente não pertencia ao grupo *Actinoplanes*. A morfoespécie foi parcialmente identificada após a triagem e os testes secundários com a enzima produzida e pelo fato de a produção deste catalisador ter sido tão elevada, deu-se continuidade ao estudo com o mesmo organismo.

Ao analisar o gráfico demonstrado na figura 14, verificou-se que a quantidade de proteínas presente no extrato bruto é menor que aquela presente nas frações de DP 60, DP 80 e Sob. 60. Comparando-se com os estudos realizados desde meados do século XX, esses resultados são consistentes, uma

vez que a concentração de proteínas no extrato bruto tende a ser menor que nas frações parcialmente purificadas, onde as proteínas ficam mais concentradas devido ao tratamento com o sulfato de amônio (Dunlop & Roon 1975, Patro 2012).

Desde o século XX são pesquisadas fontes alternativas à produção da enzima L-asparaginase. Desde a sua descoberta, pensa-se nesta enzima para a aplicação na regressão de tumores no sangue, em especial a ALL. Entretanto, no início do século XXI, um composto tóxico foi detectado em mantimentos fritos, denominado acrilamida. Uma série de estudos foram desenvolvidos para a identificação da rota metabólica para formação do composto foi iniciada. Descobriu-se que essa substância era formada pela reação entre um açúcar redutor e um composto amínico (principalmente um aminoácido). Com isso, os pesquisadores tem sugerido tratar alguns alimentos com enzimas que hidrolisam estes aminoácidos, impedindo, assim, a formação da 2-propenamida (BROOME 1961, Mashburn & Wriston 1964, Wriston & Yellin 1973, Imada et al. 1973, Hendriksen et al. 2009a, Vinci et al. 2011).

Por aquelas aplicações, se faz necessária a prospecção por novas fontes produtoras de L-asparaginase, buscando também enzimas cada vez mais eficientes para a hidrólise de aminoácidos: ultrapurificadas, para sua utilização na indústria farmacêutica ou parcialmente purificadas, para seu uso na manufatura de alimentos.

No presente estudo, foram identificadas vários isolados produtores de uma enzima altamente eficiente, uma delas selecionada para os testes de caracterização parcial da enzima capaz de catalisar a quebra de aminoácidos e levar a produção de aproximadamente 1,5 μ mol de amônia (U)/mL por minuto, estando apenas parcialmente purificada. Posteriormente serão necessários estudos para a purificação e caracterização da proteína. Porém este estudo, já demonstra que a cepa escolhida tem uma grande potencialidade. Comparando-se a enzima produzida neste trabalho, com a purificada por El-sabbagh e colaboradores (2013), vê-se um resultado significativo, principalmente pela enzima produzida por esse grupo, ser também de actinobactéria.

DeJong (1972) realizou experimentos com uma cepa de *Streptomyces griseus* e obteve uma atividade máxima de 1,2U, inferior à encontrada no

presente estudo, como se percebe na figura 15a e 15c, que foi de aproximadamente 1,5U/ml.

O grupo de Sabbagh et al. (2013) observou uma especificidade de atividade enzimática (dividindo-se a atividade enzimática pela dosagem de proteínas presentes) no dialisado de 70% aproximadamente 44U/mg de proteína. Ao realizar o mesmo cálculo com a enzima produzida no presente estudo, encontrou-se um total aproximado de 58U/mg de proteína. Tal resultado é importante, entretanto, ressalta-se que a quantidade de enzimas produzidas pela cepa selecionada é bem inferior àquela produzida pelo outro grupo citado.

Obviamente seria necessário realizar uma ultrapurificação para que esta enzima fosse caracterizada, e fossem realizados estudos posteriores para a sua possível comprovação de eficácia no tratamento de ALL. Embora esta etapa não tenha sido cumprida, devido a fatores externos, a purificação parcial demonstrou a alta eficiência enzimática do composto produzido.

A caracterização da atividade hidrolítica, variando-se a temperatura apresentou uma elevada atividade a 40°C. Estes dados são consistentes com aqueles obtidos em outros estudos onde a melhor atividade enzimática foi obtida naquela temperatura. Vale ressaltar que em outras pesquisas a enzima foi completamente purificada, e posteriormente avaliada. Nestas investigações a fração parcialmente purificada, não foi testada frente as variáveis aqui testadas (Patro 2012, El-sabbagh et al. 2013).

Modificando-se o pH das soluções testadas com tampões previamente preparados e esterilizados, notou-se que a alcalinidade favorece a atividade catalítica da enzima, fato comprovado pela figura 15. Em pH 8,0 a enzima obteve uma melhora em sua atividade. Este resultado colabora com os dados obtidos com outros organismos produtores da enzima. Tal fato pode ser explicado pelo produto final da reação que tem como resultado a modificação do pH para alcalino.

Na literatura existe uma pequena variação para o ótimo de atuação da ionicidade medida, embora para os organismos possivelmente relacionados com aquele isolado neste trabalho, os dados sejam consistentes. Os pH de melhor atuação em *Bacillus* sp. tem é 7,0 (Moorthy et al. 2010); já a enzima produzida por *Saccharomyces cerevisiae* atua melhor em 6,0 (Dunlop & Roon 1975); 7,0 em uma cepa de *Penicillium* sp.; em *Kluyveromyces marxianus* YS-1, o pH de

maior atividade foi de 6,5 (Singh et al. 2007) e em uma cepa de *Streptomyces*, 8,0.

A asparaginase é extraída de diversos organismos como plantas (Aguilar 1995), fungos (Dunlop & Roon 1975, Patro 2012), bactérias não pertencentes ao grupo das actinobactérias presentes em coliformes (Bilimoria 1969) e de algumas espécies de actinobactérias, preferencialmente as do gênero *Streptomyces* (Usha et al., 2011; Sudhir et al., 2012). A importância da variação de asparaginases é necessária para a redução dos custos no tratamento de doenças como o câncer no sangue, bem como no pré-tratamento aplicado em *S. tuberosum* L., por exemplo, para evitar a formação de acrilamida. Nesse contexto, a enzima produzida pela bactéria isolada no presente estudo é uma excelente fonte deste catalisador natural.

Uma maior disponibilidade de enzimas para o tratamento da neoplasia é importante, já que os pacientes têm disponível no mercado apenas duas enzimas para esta finalidade, e em alguns casos, adiciona-se PEG para a redução da taxa de reações anafiláticas frente às enzimas presentes no mercado. Outras fontes deste catalisador reduziriam o custo do tratamento da ALL (Peterson & Ciegler 1969, Kumar et al. 2010, Jain et al. 2012).

Por outro lado, para o tratamento de alimentos existem também duas fontes de asparaginase, embora ambas sejam de fungos do gênero *Aspergillus*. Apesar da existência destas duas fontes enzimáticas comerciais para a indústria alimentícia, o processo de produção desse composto é caro e torna-se inviável quando o tratamento deve ser feito em uma grande quantidade de batatas (Hendriksen et al. 2009b).

Após a realização dos testes de fenotipagem, aventou-se a possibilidade de o isolado pertencer ao gênero *Streptomyces*. Seria necessário, para se identificar ao nível de espécie uma análise molecular; o que não foi possível, visto que, após, incansáveis tentativas de purificação do DNA total extraído, a etapa de purificação não foi pode ser realizada, inviabilizando a análise no *Genbank*.

Apesar de até a presente data não ter sido possível realizar a amplificação do segmento de rDNA 16S, esta etapa será cumprida posteriormente, com a finalidade de caracterização molecular do isolado. Também serão realizados experimentos futuros, afim de caracterizar melhor a

enzima produzida e posteriormente, por ferramentas de biologia molecular, realizar a produção em larga escala do catalisador.

7 CONCLUSÕES

- ✓ O isolamento clássico pelo método proposto por Paleroni (1976) foi eficaz, isolando dezenove possíveis espécies de actinobactérias com potenciais biotecnológicos a serem explorados.
- ✓ O isolado BC-A.1 obteve a melhor atividade de L-asparaginase, com índice enzimático médio de 4,1.
- ✓ A temperatura ótima de atuação da enzima parcialmente purificada é de 40°C e o pH ideal para este catalisador é 8.0.
- ✓ A morfoespécie selecionada para este estudo produz uma enzima bastante eficiente. Reduzida quantidade de enzimas nas frações isoladas resultou em atividade relativamente alta, quando comparada com outros estudos.
- ✓ Infelizmente não foi possível identificar a espécie do isolado. Porém testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos sugerem que esta bactéria seja do gênero *Streptomyces*.

REFERÊNCIAS

1. Abud AKS. Estudo do controle de Qualidade da Produção de L-Asparaginase por *Zymomonas mobilis*. Rio de Janeiro. [Tese de Doutorado em Engenharia - COOPE/UFRJ], 2005.
2. Agarwal A, Kumar S, Veeranki VD. Effect of chemical and physical parameters on the production of L-asparaginase from a newly isolated *Serratia marcescens* SK-07. *Lett Appl Microbiol* 52: 307–313, 2011
3. Aguiar LF. 1995. Estudo Molecular e Imunoquímico da Asparaginase de *Crotalaria*. São Paulo. [Tese de Doutorado em Microbiologia - IB/UNICAMP], 1995.
4. Alberto FL 2002. Avaliação do Transcriptoma da Leucemia Mielóide Crônica por ORESTES (*Open Reading Frame Expression Sequence Tags*). São Paulo. [Tese de Doutorado em Clínica médica - FCM/UNICAMP], 2002.
5. Aljewari HS, Nader MI, Alfaisal AHM, Weerapreeyakul N, Sahapat 2010. High Efficiency, Selectivity against Cancer Cell Line of Purified L-Asparaginase from Pathogenic *Escherichia coli*. *World Acad Sci Eng Technol* 4: 355–360.
6. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Toll. *J Mol Biol* 215: 403-410, 1990.
7. Alves GVA. Caracterização Hematológica e Imunofenotípica em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda Caracterização Hematológica e Imunofenotípica em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda. Rio Grande do Norte. [Tese de Doutorado em Biotecnologia da saúde - RENORBIO/UFRN], 2012.
8. Aly MM, Jastaniah S, Kuchari MG 2013. L-asparaginase from *Streptomyces* sp. isolated from the rhizosphere of a palm tree, its separation, purification and antitumor activity. *Int J Pharma Bio Sci* 4: 12–21.
9. Amena S, Vishalakshi N, Prabhakar M, Dayanand A, Lingappa K 2010. Production, purification and characterization of L-asparaginase from *Streptomyces gulbargensis*. *Brazilian J Microbiol* 41: 173–178.
10. Ariseto AP, Toledo MCDF 2006. Acrilamida em Alimentos: Uma Revisão. *Brazilian J Food Technol* 9: 123–134.
11. Atlas RM. Nitrate Agar. In Atlas RM (ed.), *Handbook of Microbiological Media*, CRC Press, Washington, 2010.

12. Azeredo LA. De, Freire DM., Soares RM., Leite SG., Coelho RR. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil. *Enzyme Microb Technol* 34: 354–358, 2004
13. Azuma MVP. Actinobactérias com potencial biotecnológico isoladas da região entre-marés da Ilha do Mel, PR, Brasil [Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Departamento de Patologia Básica - UFPR], 2011
14. Bain BJ. ACUTE LEUKAEMIA Cytology, Cytochemistry and the FAB Classification. In: Bain BJ. *Leukaemia Diagnosis*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2007.
15. Balagurunathan R, Radhakrishnan M, Somasundaram ST. L-glutaminase Producing Actinomycetes from Marine Sediments – Selective Isolation, Semi Quantitative Assay and Characterization of Potential Strain. *Aust. J. Basic Appl Sci* 4: 698–705, 2010.
16. Bayer C, Martin-Neto L, Mielniczuk J, Pavinato A, Dieckow J. Carbon sequestration in two Brazilian Cerrado soils under no-till. *Soil Tillage Res.* 86: 237–245, 2006.
17. Bilimoria MH. Conditions for the production of L-asparaginase 2 by coliform bacteria. *Appl. Microbiol* 18: 1025–1030, 1969.
18. Birch JM. Patterns of incidence of cancer in teenagers and young adults: implications for aetiology. In: Eden TOB, Barr RD, Bleyer A, Whiteson M, *Cancer Adolescent*, Blackwell Science, Oxford 2005
19. Bomfim GF. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de cupinzeiros da região da mata de cipó. [Dissertação de Mestrado em Biotecnologia – UEFS], 2010.
20. Bornscheuer UT. Evolving Enzymes for Biocatalysis. In: Timmis KN, McGenity T, Meer JR van der, Lorenzo V (Orgs.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer - Verlag Berlin Heidelberg, p. 2929–2938, 2010.
21. Bradford, MM. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2): 248-254, 1976.
22. Broome JD. Evidence that the L-Asparaginase Activity of Guinea Pig Serum is responsible for its Antilymphoma Effects. *Nature* 191: 1114–1115, 1961.
23. Bruzon G. Produção de glutaminase por *Zymomonas mobilis* PP4 na fermentação de glicose utilizando ferramentas estatísticas. [Dissertação de Mestrado – UEL], 2006.

24. Campbell HA, Mashburn LT. L-Asparaginase EC-2 from *Escherichia coli*. Some substrate specificity characteristics. *Biochemistry* 8: 3768–3775, 1969.
25. Campbell HA, Mashburn LT, Boyse EA, Old LJ. Two L-Asparaginases from *Escherichia coli* B. their separation, purification, and antitumor activity. *Biochemistry* 6: 721–730, 1967.
26. Canova SP 2009. Diversidade e bioprospecção de actinobactérias isoladas de manguezais. [Dissertação de Mestrado – ICB-IV/USP], 2009.
27. Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Sci Technol* 44: 793–810, 2011.
28. Carneiro MAC, Souza ED, Reis EF, Pereira HS, Azevedo WR. Atributos físicos, químicos e biológicos de solo de Cerrado sob diferentes sistemas de uso e manejo. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 33: 147–157, 2009.
29. Casotti JF, Neto DC, Bruzon G, Alessandro R, Machado M, Buzato JB, Antonia M, Colabone P. Uso de matérias primas da agroindústria – garapa e extrato de levedura – na produção de asparaginase por *Zymomonas mobilis* CP4 *Semin. Ciências Agrárias* 28: 653–658, 2007.
30. Castro OM, Prado H. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. *Sci. Agric.* 50: 212–219, 1993.
31. CDC. Occupational safety and health guideline for acrylamide. 1992. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/81-123/pdfs/0012-rev.pdf>. Acessado em: 25/03/2015.
32. Cerestiato JC. Câncer e meio ambiente. *Rev. Bras. Farmacol. e Bioquímica* 84: 55–60, 2003.
33. CETESB. Ficha de informação técnica: Acrilamida. 2014. Disponível em: <http://cloud.cnpqc.embrapa.br/wp-content/igu/fispq/laboratorios/Acrilamida.pdf>. Acessado em: 25/03/2015.
34. Cobaleda C, Sánchez-García I. B-cell acute lymphoblastic leukaemia: towards understanding its cellular origin. *BioEssays news Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 31: 600–609, 2009.
35. Conn VM, Walker AR, Franco CMM. Endophytic Actinobacteria Induce Defense Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 208–218, 2008.

36. Costa EP, Lins CV, Diniz CC, Melo IS, Araújo JM, Porto ALF. Actinobactérias isoladas da rizosfera de *Oiticica* e Caatingueira como produtoras de enzimas anti-tumorais. *In: Congresso Nacional de Ciências Biológicas. Anais do I Congresso Nacional Ciências Biológicas*, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2011.
37. Coutinho LM. O conceito de cerrado. *Rev. Bras. Botânica* 1: 17–23, 1978
38. Cruz MEM, Martins MB, Corvo ML, Gaspar MM, Oliveira EMM, Ferrara MA. Enzimas em medicamentos e diagnósticos. *In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo ML. Enzimas em Biotecnologia-Produção, Aplicações e Mercado*. Interciência. 2008.
39. DeJong PJ. L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 23: 1163–1164, 1972.
40. Deshpande N, Choubey P, Agashe M. Studies on optimization of growth parameters for L-asparaginase production by *Streptomyces ginsengisoli*. *Scientific World Journal*, 2014.
41. Dhale MA., Puttananjaiah MKH, Sukumaran UK, Govindaswamy V. Production of monascus purpureus pigments; influenced by amidase and acid protease activity. *J. Food Biochem.* 35: 1231–1241, 2011
42. Dharmaraj S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 2123–2139, 2010.
43. Dharmaraj S. Study of L-asparaginase production by *Streptomyces noursei* MTCC 10469, isolated from marine sponge *Callyspongia diffusa*. *Iran. J. Biotechnol.* 9: 102–108, 2011.
44. Dunlop PC, Roon RJ. L-Asparaginase of *Saccharomyces cerevisiae*: an extracellular Enzyme. *J Bacteriol* 122: 1017–1024, 1975.
45. Eiten G. The Cerrado Vegetation of Brazil. *Bot Rev* 38: 201–341, 1972
46. El-sabbagh SM, El-batanony NH, Salem TA. L-Asparaginase produced by *Streptomyces* strain isolated from egyptian soil: purification, characterization and evaluation of its anti-tumor. *African J Microbiol Res* 7: 5677–5686, 2013.
47. EMBRAPA. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. EMBRAPA, Rio de Janeiro. 2006.
48. Friedman M. Chemistry, *Biochemistry*, and safety of acrylamide. A review. *J Agric Food Chem* 51: 4504–4526, 2003.
49. Gao B, Gupta RS. Phylogenetic Framework and Molecular SigNature s for the Main Clades of the Phylum Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 66–112, 2012.

50. Gomes RC, Semêdo LT, Soares RM, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RR. Chitinolytic activity of actinomycetes from a Cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett Appl Microbiol* 30: 146–150, 2000.
51. Goodfellow M, Alderson G. Numerical taxonomy of Actinomadura and related actinomycetes. *J Gen Microbiol* 112: 95-111, 1979.
52. Goodfellow M, Williams ST, Mordaski M. Introduction to and importance of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M. *The Biology of Actinomycetes*, Academic Press, Londres, 1984.
53. Gottschalk LMF, Coelho RRR, Bon EP S. O papel dos fungos e dos actinomicetos na produção de etanol de biomassa lignocelulósica. In: Almeida JRM, Anais do Simpósio Microrganismos em Agroenergia da Prospecção aos Bioprocessos, EMBRAPA - Agroenergia, Brasília, 2013.
54. Green V, Stott D, Cruz J, Curi N. Tillage impacts on soil biological activity and aggregation in a Brazilian Cerrado Oxisol. *Soil Tillage Res.* 92: 114–121, 2007.
55. Grosswicz N, Halpern YS. Inhibition of L-asparaginase in Extracts of Mycobacterium phlei by D-asparagine. *Nature* 177: 623–624, 1956.
56. Gulati R, Saxena RK, Gupta R. A rapid plate assay for screening L - asparaginase producing. *Lett Appl Microbiol* 24: 23–26, 1997.
57. Hayakawa M, Yoshida Y, Iimura Y. Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the Streptomyces violaceusniger phenotypic cluster. *J Appl Microbiol* 96: 973–981, 2004.
58. Headon DR, Walsh G. The industrial production of enzymes. *Biotechnol. Adv.* 12: 635–646, 1994.
59. Hendriksen HV, Kornbrust BA, Ostergaard PR, Stringer MA. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from Aspergillus oryzae. *J Agric Food Chem* 57: 4168–4176, 2009.
60. Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser J, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM and Schrempf H. Genetic manipulations of Streptomyces: a Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
61. IBGE. Manual Técnico da Vegetação Brasileira. IBGE, Rio de Janeiro, 2012.
62. Imada A, Igarasi S, Nakahama K, Isono M. Asparaginase and glutaminase activities of micro-organisms. *J Gen Microbiol* 76: 85–99, 1973.

63. INCA. Estimativa 2014: *Incidência do Câncer no Brasil*. 2013. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>. Acesso em: 10/05/2015.
64. Jain R, Zaidi KU, Verma Y, Saxena P. L-Asparaginase: A Promising Enzyme for Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *People's J Sci Res* 5: 29–35, 2012.
65. Jaskólski M, Kozak M, Lubkowski J, Palm G, Wlodawer A. Structures of two highly homologous bacterial L -asparaginases: a case of enantiomorphous space groups. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 57: 369–377, 2001.
66. Jayaram HN, Ramakrishnan T, Vaidyanathan CS. L-Asparaginase from *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv and H37Ra. *Arch Biochem Biophys* 126(1): 165-174, 1968.
67. Joly S. Ocorrência de Actinomicetos com atividade proteolítica, em um solo cultivado. *An. da Esc. Super. Agric. Luiz Queiroz* 17: 103–117, 1960.
68. Jones KL. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol* 57: 141-145, 1949.
69. Kaldor JM, Day NE, Pettersson F, Clarke EA, Pedersen D, Mehnert W, Bell J, Host H, Prior P, Choi W, Kirn VP, Arslan A, Zarén B, Belch AR, Storm H, Kittlemann B, Fraser P, Stovall M. Leukemia following chemotherapy for ovarian cancer. *N Engl J Med* 322: 1–6, 1990.
70. Khamna S, Yokota A, Lumyong S. L-Asparaginase production by actinomycetes isolated from some thai medicinal plant rhizosphere soils isolation of actinomycetes morphological identification and screening for L-asparaginase production carbon and nitrogen sources on L- Determination of L-a. *Int J Integr Biol* 6: 22–26, 2009.
71. Kidd JG. Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. *J Exp Med* 98: 583–591, 1953.
72. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade* 1: 147–155, 2005.
73. Kornbrust BA, Stringer MA, Lange NEK, Hendriksen HV. Asparaginase – An Enzyme for Acrylamide Reduction in Food Products. In: Whitehurst RJ, Oor M van, *Enzymes Food Technology*. Blackwell Publishing Ltd., 2010.
74. Korn-Wendisch F, Kutzner, HJ. The Family Streptomycetaceae. In: Balowa A, Truper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH, *The Prokaryotes*. Springer, New York, 1992.
75. Kumar S, Dasu VV, Pakshirajan K. Localization and production of novel l-asparaginase from *Pectobacterium carotovorum* MTCC 1428. *Process Biochem*. 45: 223–229, 2010.

76. Kurapova a. I, Zenova GM, Sudnitsyn II, Kizilova a. K, Manucharova NA, Norovsuren Z, Zvyagintsev DG, Kurapova GM, Zenova II, Sudnitsyn AK, Kizilova N. Thermotolerant and thermophilic actinomycetes from soils of Mongolia desert steppe zone. *Microbiology* 81: 98–108, 2012.
77. Lechevalier MP, Lechevalier HA. Chemical Composition as a Criterion in the Classification of Aerobic Actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol* 20: 435–443, 1970.
78. Lineback D, Pariza MW, Coughlin J, Davies C, Kettlitz B, Robin LP, Schmidt D, Scimeca J, Stadler R, Zetterberg LA, Borzelleca J, Kim H, Saunders S. Acrylamide in Food *Counc Agric Sci Technol* 32: 1–16, 2006.
79. Lopes AS, Guilherme LRG. Solos sob cerrado: manejo da fertilidade para a produção agropecuária. ANDA, São Paulo. 1992.
80. Mahajan R V., Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of L-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 341: 122–126, 2013.
81. Maréchal P Le, Decottignies P, Marchand CH, Degrouard J, Jaillard D, Dulermo T, Froissard M, Smirnov A, Chapuis V, Virolle M-J. Comparative proteomic analysis of *Streptomyces lividans* Wild-Type and ppk mutant strains reveals the importance of storage lipids for antibiotic biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 79: 5907–5917, 2013.
82. Mashburn LT, Wriston JC. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase. *Biochem. Biophys. Res Commun* 12: 50–55, 1963.
83. Mashburn LT, Wriston JC. Tumor Inhibitory Effect of L-Asparaginase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 105: 450–453, 1964.
84. Melo FMP. Bioprospecção de actinobactérias rizosféricas de milho (*Zea mays* L.) com atividade antifúngica. [Tese de Doutorado em Biotecnologia – BUTANTAN/USP]. São paulo, 2009.
85. Mendonça RC, Felfili JM, Walter BMT, Júnior MCS, Rezende AV, Filgueiras TS, Nogueira PE. Flora vascular do bioma Cerrado. In: Sano SM, Almeida SP., *Cerrado, Ambiente e Flora*, EMBRAPA, Brasil, 1998.
86. IBAMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite: monitoramento do Bioma Cerrado 2009-2010. 2011.
87. Mohan GM, Charya MAS. Enzymatic Activity of Fresh Water Actinomycetes. *Int Res J Pharm* 3: 193–197, 2012.
88. Moorthy V, Ramalingam A, Sumantha A, Shankaranaya RT. Production, purification and characterisation of extracellular L-asparaginase from a soil isolate of *Bacillus* sp . *African J Microbiol Res* 4: 1862–1867, 2010.

89. Morfini GA, Burns MR, Stenoien DL, Brady ST. Axonal transport. In: Macklin WB, Rasband MN. *Basic Neurochemistry*. Elsevier Inc., Oxford, 2012.
90. Narta UK, Kanwar SS, Azmi W. Pharmacological and clinical evaluation of L-asparaginase in the treatment of leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 61: 208–221, 2007.
91. Neri VCC. Acrilamida em Alimentos: Formação Endógena e Riscos à Saúde. [Dissertação de Mestrado em Vigilância Sanitária – INCQS/FIOCRUZ]. Rio de Janeiro, 2004.
92. Neuman RE, McCoy TA. Dual Requirement of Walker Carcinosarcoma 256 in vitro for Asparagine and Glutamine. *Science* (80). 124: 124–125, 1956.
93. CDC. *NIOSH Skin Notation Profiles: Acrylamide*. 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2011-139/pdfs/2011-139.pdf>. Acessado em: 12/05/2015.
94. Nitzke JA, Biedrzycki A. Reação de Maillard. Disponível em: http://www.ufrgs.br/alimentus1/pao/fabricacao/fab_assamento_maillard02.htm. Acessado em 12/04/2015.
95. Norovsuren Z, Oborotov GV., Zenova GM, Aliev RA., Zvyagintsev DG. Haloalkaliphilic actinomycetes in soils of Mongolian desert steppes. *Biol Bull* 34: 417–422, 2007.
96. Nublát J. Hospital referência para o tratamento de câncer relata falta de remédio contra leucemia. *Folha São Paulo*. 2013a.
97. Nublát J. Remédio para leucemia aguda só tem estoque para seis meses. *Folha São Paulo*. 2013b.
98. Nublát J. Ministério Público cobra informações sobre falta de remédio contra leucemia. *Folha São Paulo*. 2013c.
99. Palleroni NJ. Chemotaxis in Actinoplanes. *Arch Microbiol* 110: 13–18. 1976a
100. Palleroni NJ. Chamber for Bacterial Chemotaxis Experiments. *Appl Environ Microbiol* 32: 729–731, 1976b.
101. Palleroni NJ. A Chemotactic Method for the Isolation of Actinoplanaceae. *Arch Microbiol* 5: 53–55, 1980.
102. Patro KR. Extraction, purification and characterization of L-asparaginase from *Penicillium* sp. by submerged fermentation. *Int J Biotechnol Mol Biol Res* 3: 30–34, 2012.

103. Pavinato PS, Merlin A, Rosolem CA. Phosphorus fractions in Brazilian Cerrado soils as affected by tillage. *Soil Tillage Res* 105: 149–155, 2009.
104. Peczyńska-czoch W, Mordarski M. Actinomycete Enzymes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M. *Actinomycetes Biotechnol.*, Harcourt Brace Jovanovich, London, 1988.
105. Pereira JC, Cristina M, Neves P, Nos R. Dinâmica das populações bacterianas em solos de cerrados. *Pesqui Agropecuária Bras* 34: 801–811, 1999.
106. Peterson RE, Ciegler A. L-asparaginase production by various bacteria. *Appl Microbiol* 17: 929–930, 1969.
107. Petinate SD, Branquinha MH, Coelho RR, Vermelho a B, Giovanni-De-Simone S. Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. *J Appl Microbiol* 87: 557–563, 1999.
108. Pieters R, Hunger SP, Boos J, Rizzari C, Silverman L, Baruchel A, Goekbuget N, Schrappe M, Pui C-H. L-asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia: a focus on *Erwinia* asparaginase. *Cancer* 117: 238–249, 2011.
109. Politzer, K; Bon, EPS. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação, IQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.
110. Poorani E, Saseetharan MK, Dhevagi P. L – asparaginase production and molecular identification of marine *Streptomyces* sp strain EPD 27. *Int J Integr Biol* 7: 150–155, 2009.
111. Pui C-H, Crist WM. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 124: 491–503, 1994.
112. Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Neto EL, Silva MRSS da, Bustamante MMC, Krüger RH. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiol Res* 164: 59–70, 2009.
113. Rodrigues K. Identificação, produção de antimicrobianos e complexos enzimáticos de isolados de actinomicetos. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRG]. Porto Alegre, 2006.
114. Roth G. Produção de L-asparaginase II recombinante de de *Erwinia carotovora* em cultivos de *Escherichia coli* em batelada alimentada. [Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular – PUC-RG]. Porto Alegre, 2011.

115. Ruggiero PGC, Batalha MA, Pivello VR, Meirelles ST. Soil-vegetation relationships in cerrado (Brazilian savanna) and semideciduous forest, Southeastern Brazil. *Plant Ecol* 160: 1–16, 2002.
116. Servin JA, Herbold CW, Skophammer RG, Lake JA. Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. *Mol Biol Evol* 25: 1–4, 2008.
117. Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627–662, 2001.
118. Shibao J, Bastos DHM. Produtos da reação de Maillard em alimentos: Implicações para a saúde. *Rev Nutr* 24: 895–904, 2011.
119. Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 16: 313-340, 1966.
120. Sierra G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek* 23: 15-22, 1957.
121. Silva MS. Identificação de actinobactérias em solos de cerrado mineiro durante estação de baixa pluviosidade. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola – UFLA]. Lavras, 2012.
122. Silva MS, Naves Sales A, Magalhães-Guedes KT, Ribeiro Dias D, Schwan RF. Brazilian Cerrado Soil Actinobacteria Ecology. *Biomed Res Int* 2013: 1–10, 2013.
123. Singh RS, Sooch BS, Puri M. Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1. *Bioresour Technol* 98: 2518–2525, 2007.
124. Soares AL, Guimarães GM, Polakiewicz B, Moraes Pitombo RN de, Abrahão-Neto J. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. *Int J Pharm* 237: 163–170, 2002.
125. Soru E, Zaharia O. Immunoenzymology of L-asparaginase from the BCG strain of *Mycobacterium bovis*. *Immunoch* 11: 791–795, 1974.
126. Souhami R, Tobias J. Non-Hodgkin's lymphomas. In: Souhami R, Tobias J, *Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005a.
127. Souhami R, Tobias J. Hodgkin's disease. In: Souhami R, Tobias J, *Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005b.

128. Souhami R, Tobias J. Biology of cancer. *In: Souhami R, Tobias J, Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005c.
129. Souhami R, Tobias J. Epidemiology, cure, treatment trials and screening. *In: Souhami R, Tobias J, Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005d.
130. Souhami R, Tobias J. Paediatric malignancies. *In: Souhami R, Tobias J, Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005e.
131. Souhami R, Tobias J. Leukaemia. *In: Souhami R, Tobias J, Cancer and Its Management*. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2005f.
132. Sudhir AP, Dave BR, Trivedi KA., Subramanian RB. Production and amplification of an L-asparaginase gene from actinomycete isolate *Streptomyces* ABR2. *Ann Microbiol* 62: 1609–1614, 2012.
133. Tagliaferro AC 2005. Análise Molecular da Diversidade Bacteriana de Solos do Cerrado Utilizando Bibliotecas de rDNA 16S - Uma Perspectiva Biotecnológica. [Dissertação de Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB]. Brasília, 2005.
134. Tareke E, Rydberg P, Karlsson P, Eriksson S, Törnqvist M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J Agric Food Chem* 50: 4998–5006, 2002.
135. Törnqvist M. Acrylamide in food: the discovery and its implications: a historical perspective. *Adv Exp Med Biol* 561: 1–19, 2005.
136. Torres JLR, Pereira MG, Andrioli I, Polidoro JC, Fabian AJ. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura em um solo de Cerrado. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 29: 609–618, 2005.
137. Treusch AH, Leininger S, Kietzin A, Schuster SC, Klenk HP, Schleper C. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* 7: 1985–1995, 2005.
138. Usha R, Mala KK, Venil CK, Palaniswamy M. Screening of Actinomycetes from Mangrove ecosystem for L-asparaginase Activity and optimization by response surface methodology. *Polish J Microbiol*: 213–221, 2011.
139. Van Soolingen D, Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 235: 196–205, 1994.
140. Velho-Pereira S, Kamat NM. Actinobacteriological research in India. *Indian J. Exp. Biol.* 51: 573–596, 2013.

141. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, Sinderen D. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495–548, 2007.
142. Veronez VA, Freitas BZ, Olegário MMM, Carvalho WM, Pascoli GVT, Thorga K, Garcia MV, Szabó MPJ. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysionomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Exp Appl Acarol* 50: 169–179, 2010.
143. Vieira JDG. Purificação e caracterização de uma α -amilase de *Streptomyces* sp. [Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Microbiologia) - ICB/UFG]. São Paulo, 1999.
144. Vinci RM, Mestdagh F, Poucke C Van, Kerkaert B, Muer N, Denon Q, Peteghem C, Meulenaer B. Implementation of acrylamide mitigation strategies on industrial production of French fries: Challenges and pitfalls. *J. Agric. Food Chem.* 59: 898–906, 2011.
145. Waksman SA. *Principles of Soil Microbiology*. Waverly Press, Baltimore, 1927.
146. Waksman SA. *The Actinomycetes Vol. 2*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1961.
147. Walter BMT. Fitofisionomias do bioma Cerrado: síntese terminológica e relações florísticas. Goiânia [Tese de Doutorado em Ecologia - ICB/UnB], 2006.
148. Wartenberg, D.; Groves, F. D.; Adelman, A. S. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. In: Estey, E. H.; Faderl, S. H.; Kantarjian, H. M. *Hematologic Malignancies: Acute Leukemias*. Springer Berlin Heidelberg. 2008.
149. Weid I, Paiva E, Nóbrega A, Elsas JD, Seldin L. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. *Res Microbiol* 151: 369–381, 2000.
150. Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EM, Sneath PH, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol* 129: 1743–1813, 1983.
151. Wink JM. Methods for the taxonomic description of actinobacteria. In Wink JM, Compendium of Actinobacteria [Internet], Braunschweig, p. 1-37, 2012. Disponível em: http://www.dsmz.de/fileadmin/Bereiche/Microbiology/Dateien/Bacterial_Noomenclature_uptodate/Actinomethods.pdf. Acesso em: 03/01/2014.
152. Wriston JC, Yellin TO. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 1973.

153. Zenova GM, Manucharova NA., Zvyagintsev DG. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types. *Eurasian Soil Sci* 44: 417–436, 2011.
154. Zhang J, Zhang L. Improvement of an Isolation Medium for Actinomycetes. *Mod. Appl. Sci.* 5: 124–127, 2011.
155. Zyzak D V., Sanders RA, Stojanovic M, Tallmadge DH, Eberhart BL, Ewald DK, Gruber DC, Morsch TR, Strothers MA, Rizzi GP, Villagran MD. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4782–4787, 2003.

ANEXOS

ANEXO I – Composição dos meios de cultura e soluções reagentes empregados

1.1 Anexo IA – Meios de cultura

Todos os meios de cultivo preparados no estudo foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Para alguns meios, detalhes especiais a respeito do preparo serão descritos imediatamente em seguida a composição química dos mesmos.

Ágar Amido-Caseína (AC) (Waksman 1961)

KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
Amido.....	10,0 g
Caseína.....	1,0 g
Ágar.....	15,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP-2) (Shirling & Gottlieb 1966)

Glicose.....	4,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Ágar.....	20,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar de triagem para produção de L-asparaginase (Mahajan et al. 2013)

L-asparagina.....	10,0 g
Dextrose.....	2,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄	0,05 g
Ágar.....	16,0 g
Vermelho de fenol.....	0,07 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Meio de indução da produção de L-asparaginase (El Sabbagh et al. 2013)

K ₂ HPO ₄	2,0 g
L-asparagina.....	6,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	1,0 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	1,0 g
Glucose.....	3,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Aveia (ISP-3) (Shirling & Gottlieb 1966)

Aveia.....	20,0 g
Solução de elementos-traço.....	1,0 mL
Ágar.....	18,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Preparo: Adicionar 20 g de aveia em 1.000mL de água destilada em cozer por 20 minutos. A mistura é filtrada em morim e o volume restaurado com água destilada para 1.000mL. Um volume de 1,0mL da solução de elementos-traço (abaixo) é acrescentado (esterilizada por filtração e armazenada em refrigerador), o pH ajustado para 7,0 com NaOH. Após o acréscimo de 18 g de ágar, o meio é autoclavado por 20 minutos a 121°C.

- *Solução de elementos-traço* (para os meios ISP-3, 4, 5 e 7):

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0.1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	18,0 g
H ₂ O.....	100 mL

Ágar Amido-Sais Inorgânicos (ISP-4) (Shirling & Gottlieb 1966)

Solução I:

Amido solúvel.....	10,0 g
H ₂ O.....	500 mL

Solução II:

K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	1,0 g
NaCl.....	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g
CaCO ₃	2,0 g
Solução de elementos-traço.....	1,0 mL
H ₂ O.....	500 mL
pH.....	7,2 ± 0,2
Ágar.....	20,0 g

Preparo: À massa de amido, acrescentar uma pequena quantidade de água destilada para produção de uma pasta. Em seguida, adicionar água destilada para completar um volume de 500 mL. As soluções I e II são misturadas e o ágar é então adicionado.

Ágar Glicerol-Asparagina (ISP-5) (Shirling & Gottlieb 1966)

L-asparagina.....	1,0 g
Glicerol.....	10,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
Solução de elementos-traço.....	1,0 mL
Ágar.....	20,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Ferro-Extrato de Levedura-Peptona (ISP-6) (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Peptona.....	15,0 g
Proteose peptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Citrato de amônio férrico.....	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Tiosulfato de sódio.....	0,08 g
Ágar.....	20,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Tirosina (ISP-7) modificado (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Glicerol.....	15,0 g
L-tirosina.....	0,5 g
L-asparagina.....	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl.....	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g
Solução de elementos-traço.....	1,0 mL
Ágar.....	20,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Caldo 5006 modificado (Wink 2012)

Sacarose.....	3,0 g
Glicose.....	15,0 g
Extrato de malte.....	1,0 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
TSB.....	5,0 g
NaCl.....	0,01 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,01 g

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Meio basal de tolerância ao NaCl (Wink 2012)

Peptona caseína.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Ágar.....	18,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Preparo: Adiciona-se as seguintes concentrações de NaCl: 0%, 2,5%, 5,0%, 7,5% e 10,0%, anterior ao ajuste de pH. Após o acréscimo de 18 g de ágar, o meio é autoclavado por 20 minutos a 121°C.

Ágar Bennet's modificado (MBA) (Jones 1949)

Extrato de levedura.....	1,0 g
Extrato de carne.....	0,8 g
Bacto-casitona.....	2,0 g
Glicose.....	10,0 g
Ágar.....	18,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Meio para determinação da atividade proteolítica (Vieira 1999)

Solução I:

Caldo Nutriente.....	1,0 g
Glicose.....	0,8 g
Ágar.....	15,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL

Solução II:

Leite desnatado.....	15 mL
H ₂ O.....	1.000 mL

Preparo: As duas soluções são autoclavadas separadamente e depois reunidas assepticamente.

Meio de Sierra (Sierra 1957)

Solução I:

Peptona.....10,0 g
NaCl..... 5,0 g
CaCl₂. H₂O..... 0,1 g
H₂O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Solução II:

Tween 80..... 0,1 g
H₂O..... 1.000 mL

Preparo: As duas soluções são autoclavadas separadamente e depois reunidas assepticamente.

Ágar Triptona (Goodfellow & Alderson 1979)

Triptona.....20,0 g
NaCl..... 5,0 g
Ácido ribonucleico..... 3,0 g
Ágar.....15,0 g
H₂O..... 1.000 mL
pH.....7,3

Ágar Uréia (Korn-Wendisch & Kutzner 1992)

Peptona.....1,0 g
Glicose..... 1,0 g
NaCl..... 5,0 g
KH₂PO₄..... 2,0 g
Vermelho de fenol..... 0,0012 g
Ágar..... 15,0 g
H₂O..... 1.000 mL
pH..... 7,2 ± 0,2

Preparo: A uréia é acrescentada depois da autoclavagem do meio basal na concentração de 1,0% (m/v), já esterilizada por filtração.

Meio para determinação da hidrólise de ácido úrico (Vieira 1999)

Glicose.....	1,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Ácido úrico.....	5,0 g
Ágar.....	18,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Esculina (Williams et al. 1983)

Esculina.....	1,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
Citrato de amônio ferroso.....	0,5 g
Ágar.....	7,5 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

Ágar Nitrato modificado (Atlas 2005)

Peptona.....	10,0 g
Extrato de carne.....	3,0 g
Extrato de levedura.....	2,0 g
NaCl.....	5,0 g
Ágar.....	6,0 g
H ₂ O.....	1.000 mL
pH.....	7,2 ± 0,2

1.2 Anexo IB – Soluções reagentes e tampões

Solução de lugol (para revelação do teste de hidrólise de amido)

Iodo.....	5,0 g
Iodeto de potássio.....	10,0 g
H ₂ O.....	100 mL

Preparo: Os reagentes são solubilizados em 10 mL de água destilada e depois o volume é completado para 100 mL.

Reativos Griess-Ilosvay (para o teste de redução do nitrato)

I

Ácido sulfanílico.....	8,0 g
Ácido acético 5M.....	1.000 mL

II

Alfa naftilamina.....	5,0 g
Ácido acético 5M.....	1.000 mL

Tampão EDTA (0,5 M; pH 8,0)

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)	18,612 g
H ₂ O.....	80 mL*

Preparo: A solução deve ter o pH ajustado com aproximadamente 2,2 g de lentilhas de NaOH. No final, o volume é ajustado até 100 mL* com água destilada.

Tampão Tris-EDTA (TE)

Tris-HCl (pH 7,6).....	10 mM
EDTA (pH 8,0).....	1,0 mM
pH.....	7,5

NaCl (5 M)

NaCl.....	29,2 g
H ₂ O ultrapura.....	100 mL

Preparo: Solubilizar o NaCl em 70 mL de água. Após completar volume para 100 mL.

Soluções de lise alcalina (Sambrook & Russel 2001)

Solução I

Tris-HCl (pH 7,4).....	150 mM
EDTA (pH 8,0).....	10 mM

Solução II

NaOH.....	200 mM
SDS.....	1,0 % (m/v)

Solução III

Acetato de sódio.....	3,0 M
Ácido acético glacial (pH 5,0).....	2,0 M

Preparo: Acrescentar 80% do volume de água ultrapura ao acetato de sódio. Após solubilização, ajustar o pH com ácido acético glacial até completar o volume.

Tampão de amostra

Azul de bromofenol.....	0,5%
Glicerol.....	50%
EDTA (pH 8,0).....	100 mM

Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5X

Trizma base.....	10 mM
Ácido bórico.....	90 mM
EDTA (pH 8,0).....	1,0 mM

Tampão Tris/Acetato/EDTA (TAE) 50X*

Trizma base.....	242 g
Ácido acético glacial.....	57,1 mL
EDTA (0,5 M; pH 8,0).....	100 mL
H ₂ O destilada.....	1.000 mL

*Concentração de uso: 0,5 a 1,0X.

Tampão Tris-HCl* 0,05M

Tris hidroximetilaminometano..... 6,057g
Água 1000mL

Solução HCl (0,05M)

Preparo: Acrescentar 10% do volume de água destilada ao Tris hidroximetilaminometano previamente pesado. Após solubilização, ajustar o pH com solução de ácido clorídrico 0,05M ao pH desejado, em seguida completar para o volume de 1000mL. Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

Tampão Fosfato* 0,05M

Preparar 25 mL de solução aquosa de K_2HPO_4 a (0,05 M) e 25 mL de solução aquosa de KH_2PO_4 (0,5 M); numa placa com agitação, colocar um copo de vidro de 500 mL com uma barra magnética no interior e misturar, no copo de vidro, 25 mL da solução aquosa de KH_2PO_4 (0,5 M) e ajustar o pH com solução aquosa de K_2HPO_4 (0,5 M); acrescentar 400 mL de água destilada, sempre com agitação, e confirmar o pH da solução com o medidor de pH devidamente calibrado. Passar a solução para um balão de 500 mL e perfazer o volume com água destilada.

Reagente de Nessler (Utilizado para o ensaio de liberação de amônia)

- **Solução de iodeto de mercúrio**

KI..... 10g
Água destilada deionizada..... 10mL

- **Solução aquosa saturada de cloreto de mercúrio-II**

Cloreto de mercúrio-II.....11g
Água destilada deionizada..... 100mL

Preparo: o bicloreto de mercúrio dissolvendo em água destilada quente. Aqueça em banho Maria até dissolver o sal, após o resfriamento filtre e estoque em recipiente de vidro com tampa esmerilhada.

- **Solução de hidróxido de potássio**

KOH.....30g
Água destilada deionizada..... 60mL

Preparo: dissolver o KI em água, em seguida adicionar lentamente solução saturada de HgCl_2 até o surgimento de um precipitado vermelho insolúvel. Posteriormente adicionar a solução de KOH e depois adicionar mais 1mL da solução saturada de HgCl_2 , em seguida, completar o volume para 200mL. Deixar a solução incubada *overnight* a temperatura ambiente e retirar apenas o líquido límpido, e descartar devidamente o precipitado. Para testar a solução adicionar 2mL do reagente em 100mL de uma solução de cloreto de amônio em água ultra-pura na proporção de 1:300.000, a reação deve produzir uma coloração marrom-amarelada imediatamente.