L-asparaginase microbiana com potencial antioxidante

Microbial L-asparaginase with antioxidant potential

Maria Luiza de Sousa Silva¹, Davi Bezerra Melquiades¹, Ícaro Romero de Melo Morais¹, Sarah Signe do Nascimento², Leonor Alves de Oliveira da Silva^{1*}

RESUMO

A leucemia linfóide aguda é um tipo de câncer com rápida progressão no qual suas células necessitam da L-asparagina, uma vez que não possuem a asparagina convertase como as células saudáveis. A L-asparaginase excretada por bactérias vêm sendo utilizada como suporte no tratamento com quimioterápicos com grande sucesso. O presente estudo investigou o potencial de diversos microrganismos produzirem a enzima, utilizando a metodologia de planejamento fatorial obteve um aumento em 4,5 na produção da enzima, caracterizou parcialmente o complexo enzimático detectando um pH ótimo correspondente 8,0 e temperatura ótima de 45°C, o complexo mostrou-se estável por 24h em uma ampla faixa de pH entre 3,0 a 8,0 manteve estável a temperaturas baixas de 35°C, apresentou atividade antioxidante frente aos radicais livres DPPH e ABTS apresentando IC₅₀ de 3,879 e 3,76 mg/mL aos respectivos radicais livres avaliados. O presente estudo demonstrou *Bacillus subtilis* com potencial para a produção de L-ASNase com atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*; Planejamento fatorial; DPPH; ABTS.

ABSTRACT

Acute lymphoid leukaemia is a type of cancer with rapid progression in which cells require L-asparagine, since they lack the asparagine convertase like healthy cells. The L-asparaginase excreted by bacteria has been used as a support in the treatment with chemotherapy with great success. The present study investigated the potential of several microorganisms to produce the enzyme, using the methodology of factorial planning, obtained an increase in 4.5 in the production of the enzyme, partially characterized the enzymatic complex detecting a corresponding optimum pH 8.0 and optimum temperature of 45°C, The complex showed to be stable for 24h in a wide range of pH between 3.0 to 8.0, kept stable at low temperatures of 35°C, showed antioxidant activity against free radicals DPPH and ABTS with IC₅₀ of 3.879 and 3.76 mg/mL to the respective free radicals evaluated. The present study demonstrated *Bacillus subtilis* with potential for the production of L-ASNase with antioxidant activity.

Keywords: *Bacillus subtilis*; Factorial planning; DPPH; ABTS.

¹ Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

*E-mail: laodls@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

INTRODUÇÃO

A enzima L-asparaginase (EC 3.5.1.1) é uma amidohidrolase que produz amônia e ácido L-aspártico a partir da hidrólise de L-asparagina (MAQSOOD et al, 2020). Essa enzima tem sido amplamente estudada devido às suas diversas aplicações, principalmente no uso terapêutico sendo administrada em tratamentos de leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crônica, leucemia mielomonocítica aguda, câncer de Hodgkin e câncer de mama (GUO et al., 2017; VALA et al., 2018; NIU et al., 2021). A L-asparaginase também é utilizada para minimizar a produção de acrilamida em alguns alimentos. A formação de acrilamida é proveniente de uma reação de Maillard em que açúcares redutores reagem com a L-asparagina encontrada em alimentos ricos em carboidratos, como a batata frita, pães e grãos que foram submetidos a altas temperaturas (FARAHAT; AMR; GALAL, 2020).

Diferente das doenças infecciosas em que são causadas por microrganismos externos, o câncer é uma patologia causada por um desarranjo das células saudáveis, as tornando extremamente difíceis de combater (HAUSMAN, 2019). Dos diferentes tipos de câncer, a leucemia se destaca sendo caracterizada pela perda de função dos glóbulos brancos, que sofrem mutação, alterando assim sua forma e função, e acabam substituindo as células saudáveis, destacando-se a leucemia linfóide aguda, por ter uma rápida progressão e atingir principalmente crianças, sendo responsável por uma alta taxa de mortalidade (IACOBUECCI e MULLIGHAN, 2017).

Dentre os diversos tratamentos utilizados para a LLA, a utilização de asparaginase em conjunto com quimioterápicos mostra-se como uma das chaves para um tratamento de sucesso, desde 1963 os olhos do mundo se voltaram para essa perspectiva de tratamento (KATO e MANABE, 2018).

As formulações de L-asparaginase disponíveis compartilham do mesmo mecanismo de ação, atribuído a desaminação e diminuição dos níveis séricos de asparagina, uma vez que as células tumorais tem a asparagina como aminoácido essencial, ou seja, não são capazes de fornecer seu próprio suprimento (TERWILLIGER e ABDUL-HAY, 2017). Sendo assim, a injeção intravenosa de L-asparaginase nos pacientes com a LLA destrói a asparagina presente fora das células, provocando a perda do elemento fundamental para as células cancerígenas, resultando na deficiência de síntese proteica,

pela ausência da asparagina e consequentemente a apoptose (EGLER; AHUJA; MATLOUB, 2016).

Diversos organismos podem produzir a enzima L-asparaginase como as bactérias, algas, plantas e fungos e suas características físico-químicas variam dependendo da fonte produzida assim como os parâmetros cinéticos da enzima (EL-GENDY et al., 2021). As enzimas de fontes bacterianas são produzidas comercialmente a partir de duas espécies, a *Escherichia coli* recombinante e a *Erwinia chrysanthemi* (MUNNER, et al., 2020). As bactérias produzem L-asparaginases do tipo I (citosólica) e do tipo II (secretada) sendo a do tipo II a mais utilizada para fins farmacológicos no tratamento de LLA (MAGGI et al., 2021). Embora as L-asparaginases bacterianas sejam bastante utilizadas em tratamentos antitumorais, diversos efeitos colaterais podem acometer os pacientes tratados, incluindo pancreatite, hiperglicemia, trombose, hepatotoxicidade e células neoplásicas resistentes as L-asparaginases bacterianas dificultando o tratamento ou agravando o câncer (BARUCHEL et al., 2020).

Ao mesmo tempo em que as neoplasias preocupam os médicos, a ação dos radicais livres também pede atenção, principalmente por sua crescente associação com diversas enfermidades como é descrito por Silva et al. (2019), que traz essa ação potencializadora de estados patológicos como câncer, doenças degenerativas e cardiovasculares. Um dos aspectos que diferenciam as células cancerígenas das normais é sua capacidade de produzir uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio, possuindo assim uma maior dependência de um sistema de defesa antioxidante (PASSARI et al., 2017).

Na literatura alguns estudos tem identificado a presença L-asparaginases com atividades antioxidantes e antimicrobiana (RANI 2011; EL-GENDY et al., 2021). Tendo em vista a importância dessa enzima e as dificuldades terapêuticas frente a sensibilidade desenvolvida, o presente trabalho buscou selecionar microrganismos que produzam a L-asparaginase, e selecionar dentre estes o melhor produtor, além de avaliar as melhores condições para o cultivo e analisar as propriedades da enzima produzida, além da sua atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção inicial

A seleção inicial para produção de L-asparaginase foi realizada utilizando 5 fungos filamentosos e 2 bactérias previamente isolados pelo grupo de pesquisa do laboratório de microbiologia ambiental e industrial da Universidade Federal de

Pernambuco, esses foram reativados em placas de Petri contendo meio BDA (para os fungos) e BHI (para as bactérias) e incubados a 30°C por 5 dias. Posteriormente estes micro-organismos foram submetidos a testes semiquantitativo, em meio Czapek Dox modificado com adição de indicadores de pH, contendo 0,009% de vermelho fenol ou 0,007% de azul de bromotimol e asparagina a 1%. Os respectivos meios de culturas foram vertidos em 14 placas de petri, 7 com cada indicador e foram inoculados com os respectivos micro-organismos e posteriormente incubadas por 24 hrs a 30°C.

A fermentação submersa estacionária foi conduzida em frascos Erlemeyer com capacidade 125mL contendo 20 mL de meio Czapek modificado com adição de 1% de asparagina, nesse meio foram adicionados dois blocos de gelose de 9mm de diâmetro obtidos na cultura previamente realizada em BDA e BHI, em seguida incubados por período de 72h a 30°C, em condição estacionária. Após esse período foram separados liquido contendo a enzima de interesse da biomassa através de filtragem e centrifugação (10000 rpm - 7min).

Determinação da atividade L-asparaginase

A taxa de hidrólise da L-asparagina foi determinada quantificando a amônia liberada usando o reagente de Nessler. 50 µl de extrato enzimático foi adicionado em 100 µl do substrato L-asparagina (0,04M) dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 7,2 (0,05M), incubada a 37 ° C por 30 min, após o período de incubação a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de ácido tricloacético 1,5 M. A amônia liberada no sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro por adição de 50 µl de reagente de Nessler em tubos contendo 50µl do complexo enzimático e 1000 µl de água destilada e incubados à temperatura ambiente por 5 min. A absorbância foi determinada a 450 nm e a atividade de asparaginase foi expressa como a quantidade de amônia liberada por mL por minuto nas condições padrões do ensaio. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação de Proteínas Totais

Determinação de proteínas totais foi realizada como descrito por Bradford (1976). Onde 100 µL de extrato foi adicionado a 100 µL de reagente de Bradford, em seguida foi adicionado 250 µL de água destilada deionizada. Após 15 minutos de incubação a

temperatura de 25°C foi efetuada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. As dosagens foram realizadas em triplicata.

Produção das enzimas hidrolíticas extracelulares

A fim de maximizar a produção da enzima L-asparaginase, foi adotado um planejamento fatorial 2^3 , para três variáveis independentes. O desenho experimental foi baseado no Statistica 7.0 (StatSoft Co., EUA). O planejamento fatorial completo foi usado para obter a combinação de valores para otimizar a resposta dentro da região dos espaços de observação tridimensionais, o que permite projetar um número mínimo de execuções experimentais (BADOEI-DALFARD, 2015, DA SILVA et al., 2020). As variáveis do tempo de incubação, quantidade de microrganismo e concentração do substrato indutor na produção dos complexos enzimáticos excretados pelo produtor previamente selecionados após a seleção inicial. A variável de cada constituinte nos níveis -1, 0 e +1 é apresentada na Tabela 1. A seleção dos níveis baixo, médio e alto para todas essas variáveis foi baseada em uma triagem prévia realiza em trabalhos anteriores. Um planejamento fatorial 2^3 utilizou 3 repetições no ponto central, levando ao número total de 11 experimentos. O comportamento do sistema atual foi descrito pela seguinte equação (1), que inclui todos os termos de interação, independentemente de sua significância:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (1)$$

Onde $\hat{y}$ é a resposta prevista, produção da enzima L-asparaginase; x_1 , x_2 e x_3 são variáveis independentes; b_0 é a constante do coeficiente para o termo de deslocamento; b_1 , b_2 e b_3 constituem a constante de coeficiente para efeitos lineares, e b_{12} , b_{13} , b_{23} e b_{123} são constantes de coeficiente para efeitos de interação. O modelo avalia o efeito de cada variável independente em uma resposta. As variáveis estudadas foram tempo de incubação (72-168h), quantidade de microrganismo (1 a 3 discos de 9 mm cada) e concentração do substrato indutor (0,5- 1,5%) na produção dos complexos enzimáticos excretados pelo produtor previamente selecionados. Os experimentos foram realizados com base na análise usando Statistical 7.0 (StatSoft Co., EUA) para estimar as respostas da variável dependente. O programa *Design Expert* versão 5.0 foi empregado para realizar a análise da variância (ANOVA) dos resultados obtidos, assim como para realizar os procedimentos de otimização gráfica e/ou numérica. O teste F (teste estatístico de Fisher), foi usado para demonstrar a importância do modelo empregado, como descrito por Santos et al. (2016), neste teste foram estudadas diferenças significativas entre as fontes de

variação nos resultados experimentais, quais sejam: a significância da regressão, a falta de ajuste e o coeficiente de determinação múltipla (R^2).

Tabela 1. Otimização da condição física para a produção de L-asparaginase por isolados *Bacillus subtilis*.

Variável	Parâmetro	Nível codificado		
		-1	0	+1
X ₁	Horas de cultivo	72	120	168
X ₂	Quantidade de micro-organismos (blocos de gelose de 9 mm)	1	2	3
X ₃	Concentração de L-asparagina, %	0,5	1,0	1,5

Fonte: Autoria própria.

Caracterização parcial do complexo enzimático

O complexo enzimático obtido nas melhores condições de produção pré-estabelecidos foi caracterizado quanto ao pH e temperatura ótima. Para avaliar o efeito do pH sobre a reação, os substratos reacionais foram preparados utilizando soluções o substrato 1% em diferentes pHs dentro da faixa 3,5-8,0, para tal preparo utilizou-se os tampões acetato de sódio (pH 3,5-5,5) e fosfato de sódio (pH 6,0-8,0) em concentração de 50mM. Posteriormente esses foram utilizados para a quantificação das enzimas. Após obter esse dado foram realizados testes para analisar a melhor temperatura a qual as enzimas em estudo iriam reagir com o substrato. Para tal análise o extrato enzimático foi adicionado a uma solução de substrato a 1% que mais se destacou na análise anterior, sendo esses incubados a diferentes temperaturas na faixa 30-80°C, realizando a quantificação enzimática em seguida.

Os resultados obtidos nos experimentos referentes aos fatores de caracterização enzimática foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e os efeitos considerados significativos para $p < 0,05$.

Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do complexo enzimático foi avaliada pelo método de captura de radicais livres 1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl (DPPH), conforme a metodologia descrita por ALVES et al., 2010. Para tal, 1,0 mL de diferentes concentrações do extrato aquoso (1,32, 2,65, 3,31, 5,3 e 7,2 mg/mL), adicionou-se 1,0 mL da solução etanólica de DPPH 0,02 % (p/v), recém preparada. Essa mistura foi agitada vigorosamente e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente (22 ± 2 °C), com ausência de luz. Para o controle, foram utilizados em cada tubo de ensaio 1,0 mL de

água Milli-Q acrescida de 1,0 mL da solução etanólica de DPPH. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 517 nm em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo 1650 PC). As análises foram realizadas em triplicatas, em três repetições. A redução na absorvância indica atividade sequestrante do radical DPPH. A porcentagem de descoloração foi calculada de acordo com a fórmula (2).

$$\% \text{ Inibição} = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{extr}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

(2)

Onde: Acont foi a absorvância do controle e Aextr a absorvância da amostra em solução

Os resultados de % I foram utilizados para determinar a IC₅₀, ou seja, a concentração necessária para obter 50 % do efeito antioxidante, após o equilíbrio da reação.

A avaliação da atividade antioxidante também foi realizada através do método do ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)], em que o princípio consiste na utilização do persulfato de potássio para oxidar o ABTS ao seu radical catiônico, de acordo com Anunciação et al. 2020, com modificações. A formação do radical foi efetuada a partir da mistura de ABTS 7 mM com persulfato de potássio 2,45 mM. Essa mistura foi armazenada ao abrigo de luz por 16h. Após esse tempo a solução foi diluída com etanol para obter absorvância de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm. Os extratos foram solubilizados em água para obtenção de soluções estoque na concentração de 47,69 mg/mL. Alíquotas dessas soluções foram diluídas a fim de se obter concentrações finais de 7,52, 6,81, 4,54, 2,27 e 1,13 mg/mL. Após adição de 30 µL das amostras, foram acrescentados 1500 µL do radical ABTS. Posteriormente incubada por 6 min, ao abrigo de luz e foi realizada a leitura das absorvâncias a 734 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A capacidade de sequestrar os radicais livres foi avaliada pela porcentagem de inibição do radical livre (% I) utilizando a fórmula 2 a IC₅₀ foram calculadas da forma descrita anteriormente para o método DPPH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na seleção semiquantitativa, seis dos sete microrganismos analisados apresentaram mudança na coloração do meio de cultura, saindo do amarelo para o rosa (vermelho fenol) ou azul (azul de bromotimol) (Figura 1). Essa mudança indica aumento

do pH causado pela hidrólise do substrato, neste caso, a L-asparagina, sendo um resultado positivo como observado no trabalho de Doriya e Kumar (2016) e Silva et al. (2020).

Figura 1 - Atividade de L-ASNase detectada pelo ensaio em placa após 24hrs. A mudança de cor no meio (amarelo a rosa) ao redor da colônia indica produção de enzima. (A) isolado mostrando produção de L-ASNase com indicador vermelho fenol; (B) isolado não produtor; (C) isolado mostrando produção de L-ASNase com indicador azul de bromotimol.

Fonte: Autoria própria.

Os seis microrganismos que apresentaram atividade nos ensaios qualitativos seguiram para a avaliação da capacidade de secretar a enzima de interesse, os resultados estão na Tabela 2, dentre todos o isolado T9, identificado como *Bacillus subtilis*, foi o que apresentou melhor atividade de L-asparaginase de $0,203 \pm 0,000$ U/mL sendo selecionado para as outras etapas.

No melhor produtor de L-asparaginase (T-9), utilizando método de Bradford (1976), foi realizada a determinação das proteínas totais do complexo enzimático excretado em meio líquido de fermentação e o resultado obtido foi de $87,68 \pm 0,11$ µg/mL.

Tabela 2 - Produção de L-asparaginase por microrganismos cedidos pelo laboratório de microbiologia ambiental e industrial da UFPE.

Microrganismo	Média U/ml
98	$0,055 \pm 0,001$
74	$0,063 \pm 0,001$
48	$0,054 \pm 0,001$
24	$0,062 \pm 0,001$
T19	$0,121 \pm 0,002$
T9	$0,203 \pm 0,000$

Fonte: Autoria própria.

Algumas espécies de *Bacillus subtilis* se mostram altamente promissoras como fontes alternativas de produção de complexos enzimáticos, em especial pelo alto nível de produção de L-asparaginase e por possuir estabilidade térmica e em condições adversas,

características encontradas principalmente quando as bactérias são isoladas de ambientes marinhos (GHASEMIAN et al., 2019).

O crescimento e produção enzimática de um microrganismo está altamente relacionada com os nutrientes disponíveis no meio de cultura e as condições utilizadas para a produção, como temperatura, pH, período de fermentação entre outros fatores (EL-HADI et al., 2019; SAHA E MAZUMDAR, 2019).

Erva et al. (2018) e Ameen et al. (2020) buscaram otimizar a produção do complexo enzimático por *Bacillus subtilis*, mas enquanto o primeiro trabalho fez uma análise de um fator por vez e com condições diferentes, tais quais pH, temperatura e enriquecimento de meio com extrato de carne, chegando a um resultado de $2,88 \pm 0,02$ U/mL, o segundo apontou um aumento de 24,6% na produção quando a produção foi feita em shaker a 150rpm.

Em busca de uma otimização na produção enzimática foi realizado um planejamento fatorial como feito por Santos et al. (2016), com 3 repetições no ponto central e utilizando as variáveis independentes: o tempo de incubação (h), quantidade de inóculo e concentração do substrato (%) e a matriz experimental está ilustrado pela Tabela 3. De acordo com as condições experimentais, o maior valor enzimático foi detectado no ensaio 1, com 24h de cultivo, contendo um disco de inóculo de *Bacillus subtilis* (9mm de diâmetro em meio BHI) e 0,5% de L-asparagina como substrato indutor, enquanto que o menor valor de L-asparaginase foi detectado no ensaio 8, na condição de 120h, 3 discos de inóculo e 1,5% de L-asparagina. Esses dados sugerem um aumento de 4,5 vezes no valor da atividade da L-asparaginase excretada por *Bacillus subtilis*.

Tabela 3 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 associado à variável resposta da produção de L-asparaginase por *Bacillus subtilis*.

Ensaio	Tempo cultivo (h)	Inóculo	L-asparagina (%)	Atividade L-asparaginase (Abs 450 nm)
1	-1	-1	-1	0,125
2	+1	-1	-1	0,060
3	-1	+1	-1	0,083
4	+1	+1	-1	0,038
5	+1	-1	+1	0,105
6	+1	-1	+1	0,060
7	-1	+1	+1	0,110
8	+1	+1	+1	0,028
9	0	0	0	0,073
10	0	0	0	0,064
11	0	0	0	0,066

Fonte: Autoria própria.

Figura 2 – Gráfico de Pareto mostrando a significância de cada variável e suas interações.

Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 2, Gráfico de Pareto, podemos inferir que a maior produção do complexo enzimático foi obtida em baixo tempo de e não apresentou interação significativa na quantidade de inóculo e na concentração de substrato. Entretanto da Silva (2020), trabalhando com L-asparaginase de *Pseudomonas aeruginosa* detectou, por meio de delineamento experimental, uma interação significativa e crescente entre a concentração do substrato e a produção do complexo enzimático.

Assim, foi proposto um modelo de produção L-asparaginase de *Bacillus subtilis*, em sua forma reduzida, não incluindo coeficientes que não apresentaram significância (Equação 3).

$$\hat{y} = 0,073818 - 0,029625b1$$

(3)

As análises de variância revelaram que a regressão foi significativa ao nível de confiança de 95%. Nos ensaios, a linha de equação apresentou bom ajuste com coeficiente de correlação ($R-sqr$) = 0,93187 e MS residual = 0,0001517. Foi detectado pelos resultados da dosagem enzimática um aumento considerável na produção da enzima; nosso desenho experimental atendeu aos requisitos de um desenho linear.

Para a caracterização parcial foi utilizado o extrato bruto de L-asparaginase. Foram analisados os efeitos da temperatura e pH na atividade enzimática, a presente

enzima apresentou um pH ótimo de 8,0 e uma temperatura ótima aos 45°C, como mostram as figuras 3.

Figura 3- Ensaio de avaliação de temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) o extrato L-asparaginase excretado por *B. subtilis*.

Fonte: Autoria própria.

Segundo Bajar (2020), o pH é um parâmetro muito importante e crítico, pois afeta a atividade enzimática e uma mudança na faixa de atividade em pH da enzima pode levar a desnaturação enzimática e perda do produto desejado. Jia et al. (2013) estudando a estabilidade de sua enzima recombinante encontrou que ela se mantém estável nos pHs 6,0-9,0 e em relação a estabilidade em diferentes temperaturas a atividade no estudo apenas se manteve estável nas temperaturas -20°C a 0°C, resultado que difere grandemente do presente estudo, uma vez que em relação ao pH obteve um declínio considerável na atividade residual quando exposto ao pH 9, fato ilustrado pela Figura 4 e após uma hora de exposição a temperatura de 45°C a atividade residual caiu para 50%, como mostra a figura 5. As diferenças encontradas entre os valores eram significantes com $p > 0,05$.

Ao executar suas funções o corpo humano produz radicais livres, mas a ação da radiação e de outros fatores externos, como estilo de vida e alimentação também contribui para esse aumento, e esses radicais desempenham diferentes reações no metabolismo humano (COOPER, E. L. & MA, M. J., 2017). Mokrani e Madoni (2016) definiram antioxidante como as substâncias capazes de proteger o organismo do envelhecimento precoce e prevenir doenças através da captura de radicais livres.

Figura 4- Atividade enzimática quando incubada em diferentes pHs.

Fonte: Autoria própria.

Figura 5 – Atividade enzimática quando incubada em diferentes temperaturas

Fonte: Autoria própria.

O presente estudo encontrou um IC_{50} de 3,88 mg/mL com um R^2 de 98,87% quando submetido ao teste do DPPH e detectou valores IC_{50} de 3,78 mg/mL com um R^2 de 98,0 % quando submetido ao teste com ABTS. A L-asparaginase já havia sido descrita com potencial antioxidante, tanto quando excretada por fungos, quanto excretada por bactérias. Quando comparamos o resultado encontrado na enzima excretada por *Bacillus halotolerans* pelo método DPPH apresentou um IC_{50} com valor de 64,07 mg/mL, demonstrando uma maior eficiência do organismo utilizado no presente estudo (EL-FAKHARANY et al., 2020).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou *Bacillus subtilis* com potencial para a produção de L-ASNase com atividade antioxidante, no estudo de produção utilizando a metodologia por planejamento fatorial foi possível obter um complexo enzimático 4,5 mais ativo utilizando baixa concentração de inóculo, baixa quantidade de substrato com 24 horas de cultivo em meio líquido sem agitação, tornando deste modo uma produção enzimática mais barata e estável em uma ampla faixa de pHs, sendo favorável para ser explorada como um potente agente anti-cancerígeno. Portanto, continuar a explorar o potencial biotecnológico de novas fontes microbianas para produção da L-ASNase é uma tendência positiva que poderá originar medicamentos com maior eficiência no tratamento de doenças como a LLA.

REFERÊNCIAS

- AMEEN, F.; ALSHEHRI, W. A.; Al-Enazi, N. M.; Almansob, A. L-Asparaginase activity analysis, ansZ gene identification and anticancer activity of a new *Bacillus subtilis* isolated from sponges of the Red Sea. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 84, n. 12, p. 2576-2584, 2020.
- BADDOEI-DALFARD, A. Purification and characterization of l-asparaginase from *Pseudomonas aeruginosa* strain SN004: production optimization by statistical methods. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 388-397, 2015.
- BAJAR, S.; SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. **Applied Water Science**, v. 10, n. 6, p. 1-9, 2020.
- BARUCHEL, André et al. Increasing completion of asparaginase treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL): summary of an expert panel discussion. **ESMO open**. v. 5, n. 5, p. e000977, 2020.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- COOPER, E. L.; MA, M. J. Alzheimer Disease: Clues from traditional and complementary medicine. **Journal of traditional and complementary medicine**, v. 7, n. 4, p. 380-385, 2017.
- DORIYA, K.; KUMAR, D. S. Isolation and screening of L-asparaginase free of glutaminase and urease from fungal sp. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 2016.
- EGLER, R. A.; AHUJA, S. P.; MATLOUB, Yousif. L-asparaginase in the treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 7, n. 2, p. 62, 2016.
- EL-FAKHARANY, E.; ORABI, H.; ABDELKHALEK, E.; SIDKEY, N. Purification and biotechnological applications of L-asparaginase from newly isolated *Bacillus halotolerans*

OHEM18 as antitumor and antioxidant agent. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-13, 2020.

EL-GENDY M. M. A. A. et al. Production, purification, characterization, antioxidant and antiproliferative activities of extracellular L-asparaginase produced by *Fusarium equiseti* AHMF4. **Saudi Journal of Biological Sciences**. 28, 2540–254, 2021.

EL-HADI, A. A.; AHMED, H. M.; HAMZAWY, R. A. Optimization and characterization of l-asparaginase production by a novel isolated streptomyces spp. strain. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 2, p. 111, 2019.

ERVA, R. R.; VENKATESWARULU, T. C.; PAGALA, B. Multi level statistical optimization of l-asparaginase from *Bacillus subtilis* VUVD001. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2018.

FARAHAT, M. G.; AMR, D.; GALAL, A. Molecular cloning, structural modeling and characterization of a novel glutaminase-free L-asparaginase from *Cobetia amphilecti* AMI6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 685-695, 2020.

GHASEMIAN, A. et al. Bacterial L-asparaginases for cancer therapy: Current knowledge and future perspectives. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 19271-19279, 2019.

GUO, Jingxu et al. Structure and function of the thermostable L-asparaginase from *Thermococcus kodakarensis*. **Acta Crystallographica Section D: Structural Biology**. v. 73, n. 11, p. 889-895, 2017.

HAUSMAN, D. M. What is cancer?. **Perspectives in biology and medicine**, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019.

IACOBUCCI, I.; MULLIGHAN, C. G. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 9, p. 975, 2017.

JIA, M.; XU, M.; HE, B.; RAO, Z. Cloning, expression, and characterization of L-asparaginase from a newly isolated *Bacillus subtilis* B11–06. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9428-9434, 2013.

KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatrics International**, v. 60, n. 1, p. 4-12, 2018.

MAGGI, Maristella et al. Revealing *Escherichia coli* type II l-asparaginase active site flexible loop in its open, ligand-free conformation. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

MAQSOOD, B.; BASIT, A.; KHURSHID, M.; BASHIR, Q. Characterization of a thermostable, allosteric L-asparaginase from *Anoxybacillus flavithermus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 584-592, 2020.

MOKRANI, A.; MADANI, K. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. **Separation and Purification Technology**, v. 162, p. 68-76, 2016.

MUNEER, F. et al. Microbial L-asparaginase: purification, characterization and applications. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 5, p. 967-981, 2020.

NIU, JIAFENG et al. Non-classical secretion of a type I L-asparaginase in *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**., v. 180, p. 677-683, 2021.

PASSARI, Ajit Kumar et al. Insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-17, 2017.

RANI, S.A., LALITHA, S., PRAVESH, B.V. In vitro antioxidant and anti-cancer activity of L-asparaginase from *Aspergillus flavus* (KUFS 20). **Asian J. Pharm. Clin. Res.**, 4 (2), 174–177, 2011.

RAWAL, R.; DAVE, B. P. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 41-46, 2018.

SAHA, S. P.; MAZUMDAR, D. Optimization of process parameter for alpha-amylase produced by *Bacillus cereus* amy3 using one factor at a time (OFAT) and central composite rotatable (CCRD) design based response surface methodology (RSM). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, p. 101168, 2019.

SANTOS, T. C. D. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes by *Aspergillus niger* and *Rhizopus* sp. by solid state fermentation of prickly pear. **Revista Caatinga**, v. 29, p. 222-233, 2016.

SILVA I.L.; SILVA W. O.; SILVA L. A. O., COELHO L. C. B. B. An Experimental Design of L-Asparaginase Excreted by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from *Poincianella pyramidalis* Rhizosphere. In book: **Current Strategies in Biotechnology and Bioresource Technology**. Vol. 3 Dr. M. V. N. L. Chaitanya, (Editor) (pp.14-26), 2020.

SILVA, T.H. et al. Screening for the production of multiples enzymes hydrolytic by bacteria from polluted urban stream in Recife/Pernambuco, **Brazil**. **International Journal of Current Research**, v. 11, n. 2, p. 1463-1467, 2019.

SILVA, W. O.; NASCIMENTO, S. S.; SILVA, L. A. O.; GUSMÃO, N. B. *Trichoderma hamatum* urm 8207: potential producer of antitumoral enzyme lasparaginase. **Revista Sodebras**, v. 15, n. 173, p. 35-40, 2020.

TERWILLIGER, T; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.1-2, 2017.

VALA, ANJANA K. et al. Characterization of L-asparaginase from marine-derived *Aspergillus niger* AKV-MKBU, its antiproliferative activity and bench scale production using industrial waste. **International journal of biological macromolecules**.v. 108, p. 41-46, 2018.

Recebido em: 08/03/2022

Aprovado em: 05/03/2022

Publicado em: 03/02/2022