



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus*
DPUA 1573 e *Aspergillus tamaritii* kita UCP 1279**

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Alencar, Viviane do Nascimento e Silva
Produção, purificação, caracterização e aplicação de proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e *Aspergillus tamarii* UCP 1279 / Viviane do Nascimento e Silva Alencar – 2023.

60 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite
Coorientadores: Ana Lúcia Figueiredo Porto e Thiago Pajeú Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2023.

Inclui referências e apêndice.

1. Enzimas 2. Trombose 3. *Aspergillus* I. Leite, Ana Cristina (orient.) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (coorient.) III. Nascimento, Thiago Pajeú (coorient.) IV. Título

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -166

VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus*
DPUA 1573 e *Aspergillus tamarii* UCP 1279**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em inovação terapêutica.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Recife

2023

VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus*
DPUA 1573 e *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutor em inovação terapêutica. **Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para Saúde.

Aprovado em: 29/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite. (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Pesquisadora Dra. Marlllyn Marques da Silva (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Pesquisadora Dra. Amanda Emmanuelle Sales Conniff (Examinadora Externa)
University of South Florida

DEDICATÓRIA

À Deus, meu esposo, minha filha e minha família que tanto me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me dado forças para superar todas as dificuldades que apareceram ao longo do caminho e me permitir chegar até os dias atuais com vida e saúde;

Ao meu esposo, Orestes e minha filhinha Nathália, por serem a base da minha vida, me apoiarem e servirem de inspiração para buscar sempre ser uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Aldeci Maria e Edvaldo, e meu irmão, Bruno e minha cunhada Sabrina por sempre me apoiarem em todas as situações e por vibrarem com minhas conquistas;

Aos meus familiares pelo estímulo que recebi ao longo da minha vida, pelo amor e carinho;

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Ana Cristina Lima Leite e meus coorientadores, Prof^a. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento pela acolhida, por todos os ensinamentos, atenção e por ter acreditado no meu potencial para realização deste trabalho,

Aos meus queridos colegas, Juanize, Maria Clara, Julianny, Jéssica, Pedro, Renata, Josué, Thiers, vocês se tornam especiais para mim e agradeço por todos os ensinamentos, apoio e por todos os momentos que compartilhamos;

A todos os alunos e professores do LABTECBIO pelos ensinamentos, acolhimento e parceria nos projetos;

Aos meus amigos do Laboratório Escola do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Simone, Márcia e Alex, pelo apoio incondicional, parceria e por todos os momentos maravilhosos que compartilhamos;

Aos colegas técnicos e docentes do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, em especial as professoras Dra. Ana Beatriz Sotero Siqueira e Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim por todo o apoio e compreensão;

A todos os meus colegas do curso de doutorado, em especial à Rafaela, Sandra, Fernanda e Widson, pelo companheirismo e por tornarem a rotina da pós-graduação mais leve;

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) por todo o apoio e ao secretário Paulo, pela prestatividade de sempre;

Ao CNPq e a FACEPE por todo o suporte financeiro para o desenvolvimento do projeto;

E a todos os outros que acreditam e contribuíram com minha jornada até o momento.

“Primeiro, diga a si mesmo o que você deveria ser; depois, faça o que tem de fazer.”
(EPICTETO, 2000)

RESUMO

A trombose se destaca como a principal causa subjacente do infarto agudo do miocárdio, do acidente vascular cerebral e do tromboembolismo venoso. É caracterizada pela formação ou desenvolvimento de um coágulo sanguíneo responsável por causar a obstrução e inflamação na parede do vaso. Proteases com atividades fibrinolíticas atuam na dissolução desses coágulos sanguíneos a partir da “quebra”, por hidrólise, da molécula de fibrina. Devido a esse potencial das enzimas fibrinolíticas, essas se tornaram alvos de diversas pesquisas. As enzimas de origem microbianas se tornam muito interessantes, já que proporcionam fácil manuseio, produtividade alta e menor custo de produção. O objetivo deste trabalho foi a produção, purificação, caracterização e avaliação do potencial fibrinolítico das proteases produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e produção e purificação das proteases produzidas *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279. A enzima fibrinolítica obtida do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi produzida por fermentação submersa utilizando farinha de maracujá à 0,5% como substrato, sendo verificado uma atividade proteásica de 33,70 U/mL e uma atividade fibrinolítica de 11,49 U/mL. A mesma enzima foi extraída utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Fosfato obtendo-se a melhor condição de extração com 17,5% de PEG 8000 g/mol, 15% de Fosfato (p/p) e pH 8,0. Nessa condição, a enzima particionou para a fase rica em PEG, tendo um coeficiente de partição de 7,33, um fator de purificação na fase PEG de 2,10 e uma recuperação de 57,49%. Já a enzima fibrinolítica obtida do *Aspergillus tamaraii* Kita UCP1279 foi produzida por fermentação em estado sólido utilizando 5g de farelo de trigo umedecido à 40%, sendo verificado uma atividade proteásica de 47,26 U/mL e uma atividade fibrinolítica de 25,49 U/mL. A enzima também foi extraída utilizando o SDFA PEG/Fosfato obtendo-se a melhor condição de extração com 12,5% de PEG 8000 g/mol, 15% de Fosfato (p/p) e pH 8,0. Nesta condição, a enzima particionou para a fase rica em sal, apresentando um coeficiente de partição de 0,06, um fator de purificação na fase Sal de 14,1 e uma recuperação de 487,2%. Quanto a caracterização bioquímica da protease fibrinolítica pré-purificada do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, verificou-se um aumento da atividade enzimática na presença de Fe²⁺ e diminuição na presença de β-Mercaptoetanol, fluoreto de fenilmetilsulfonila e ácido iodoacético, sendo caracterizada como uma serinoprotease. O pH ótimo foi de 7,0 e a temperatura ótima de 40 °C. Os achados da pesquisa evidenciam o potencial dos microrganismos *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e *Aspergillus tamaraii* Kita UCP1279 para a produção de enzimas fibrinolíticas, com possível aplicação para o tratamento da trombose, entretanto é necessário ainda a realização de estudos futuros visando suas aplicações *in vivo*.

Palavras-chaves: enzima fibrinolítica; *Streptomyces parvulus*; *Aspergillus tamaraii*; fermentação; extração, sistema de duas fases aquosas.

ABSTRACT

Thrombosis is the leading underlying cause of acute myocardial infarction, stroke and venous thromboembolism. It is characterized by the formation or development of a blood clot responsible for causing obstruction and inflammation in the vessel wall. Proteases with fibrinolytic activities dissolve these blood clots by hydrolysis of the fibrin fiber. Due to this potential of fibrinolytic enzymes, they have become targets of several studies. Enzymes of microbial origin become very interesting since they provide easy handling, high productivity and lower production cost. The objective of this work was the production, purification, characterization and evaluation of the fibrinolytic potential of the proteases produced by *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 and the production and purification of the proteases produced by *Aspergillus tamaris* kita UCP 1279. The fibrinolytic enzyme obtained from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 was produced by fermentation submerged using passion fruit flour at 0.5% as substrate, with a protease activity of 33.70 U/mL and a fibrinolytic activity of 11.49 U/mL. The same enzyme was extracted using an Aqueous Two-Phase System (ATPS) PEG/phosphate obtaining the best extraction condition with 17.5% PEG 8000 g/mol, 15% Phosphate (w/w) and pH 8.0. In this condition, the enzyme partitioned to the PEG-rich phase, having a partition coefficient of 7.33, a purification factor in the PEG phase of 2.10 fold and a recovery of 57.49%. The fibrinolytic enzyme obtained from *Aspergillus tamaris* kita UCP1279 was produced by solid-state fermentation using 5g of wheat bran moistened at 40%, with a protease activity of 47.26 U/mL and a fibrinolytic activity of 25.49 U/ mL. The enzyme was also extracted using ATPS PEG/Phosphate, obtaining the best extraction condition with 12.5% PEG 8000 g/mol, 15% Phosphate (w/w) and pH 8.0. In this condition, the enzyme partitioned to the salt-rich phase, presenting a partition coefficient of 0.06, a purification factor in the Salt phase of 14.1 fold and recovery of 487.2%. As for the biochemical characterization of the pre-purified fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, there was an increase in enzymatic activity in the presence of Fe²⁺ and a decrease in the presence of β-Mercaptoethanol, phenylmethylsulfonyl fluoride and iodoacetic acid, being characterized as a serine protease. The optimum pH was 7.0, and the optimum temperature was 40 °C. The research findings show the potential of the microorganisms *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 and *Aspergillus tamaris* kita UCP1279 for the production of fibrinolytic enzymes, with possible application for the treatment of thrombosis, however the results of future studies reaching their in vivo applications are still necessary.

Keywords: fibrinolytic enzyme; *Streptomyces parvulus*; *Aspergillus tamaris*; fermentation; extraction, aqueous two-phase system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do final da cascata da coagulação	18
Figura 2 – Molécula de Fibrinogênio. A – Representação esquemática da molécula de fibrinogênio; B – Representação da estrutura cristalográfica da molécula de fibrinogênio	19
Figura 3 – Ciclo de vida do gênero <i>Streptomyces</i>	25
Figura 4 – <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 em meio HT	27
Figura 5 – Estrutura morfológica básica do <i>Aspergillus</i>	27
Figura 6 – <i>Aspergillus tamarii kita</i> UCP 1279 em meio CZ	29
Figura 7 – Fermentação submersa do <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 em meio MS-2 modificado	32
Figura 8 – Esquema do crescimento fúngico na superfície de substratos sólidos	34
Figura 9 – Fermentação em estado sólido de <i>Aspergillus tamarii kita</i> UCP 1279 usando farelo de trigo como substrato	35
Quadro 1 – Comparação entre os métodos de Fermentação submersa (FSm) e Fermentação em estado sólido (FES)	36
Figura 10 – Sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato usado para a extração da enzima fibrinolítica produzida por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
DCV	Doenças cardiovasculares
DPUA	Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas
FES	Fermentação no estado sólido
F _{Sm}	Fermentação submersa
NADES	Solventes eutéticos naturais profundos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio - 1
PAI-2	Inibidor do ativador do plasminogênio - 2
PEG	Polietilenoglicol
pl	Ponto isoelétrico
r-tPA	Ativador de plasminogênio tecidual recombinante
scu-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase de cadeia única
SDFA	Sistemas de duas fases aquosas
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TDC	Trombólise dirigida por cateter
TEV	Tromboembolismo venoso
TNK-tPA	Tenecteplase
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
TT	Tempo de trombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
UCP	Universidade Católica de Pernambuco
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo Geral	15
1.1.2 Objetivos específicos	15
2 JUSTIFICATIVA	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA DO SISTEMA VASCULAR E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA	17
3.2 TROMBOSE	20
3.3 AGENTES FIBRINOLÍTICOS	22
3.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	23
3.4.1 Gênero <i>Streptomyces</i>	24
3.4.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	27
3.5 PROCESSO FERMENTATIVO	29
3.5.1 Fermentação submersa	31
3.5.2 Fermentação em estado sólido	33
3.6 PROCESSOS PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS: SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	36
3.7 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	40
PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM <i>STREPTOMYCES PARVULUS</i> BY POLYETHYLENE GLYCOL-PHOSPHATE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM.	42
PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR <i>ASPERGILLUS TAMARII</i> KITA UCP 1279 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO.	44
4 CONCLUSÃO GERAL	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE - Participações em capítulo de livro e congressos	57

1 INTRODUÇÃO

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causa de morte no mundo, anualmente, morrem mais pessoas por essas enfermidades do que por infecções das vias respiratórias, Alzheimer e outras demências e câncer. A formação de coágulos de fibrina está intimamente envolvida no desenvolvimento das DCV. (OMS, 2020; SHARMA et al., 2020).

Na cascata de coagulação sanguínea, o coágulo de fibrina é formado a partir do fibrinogênio pela ação proteolítica da trombina. Durante a fibrinólise, a fibrina é hidrolisada em produtos de degradação da fibrina pela ação da plasmina (EC3.4.21.7), que é gerada a partir do plasminogênio pela ação do ativador do plasminogênio. Em um estado patológico, a fibrina pode se acumular nos vasos sanguíneos, resultando em trombose. A trombose é uma grande preocupação para a saúde, pois pode levar a várias doenças graves, como embolia pulmonar, derrame e infarto do miocárdio (DENG et al., 2018).

A trombose pode ser tratada com drogas trombolíticas, que dissolvem o coágulo sanguíneo pela ativação do plasminogênio. Uma variedade de agentes trombolíticos, como os ativadores do plasminogênio do tipo recombinante (alteplase, reteplase, tenecteplase), ativador do plasminogênio de origem bacteriana (estreptoquinase) e ativador do plasminogênio do tipo uroquinase têm sido extensivamente aplicados no tratamento da trombose (DENG et al., 2018).

Apesar de seu amplo uso, esses agentes fibrinolíticos apresentam deficiências importantes, incluindo meias-vidas curtas, alto custo, risco de reações alérgicas e complicações hemorrágicas (DEVARAJ; RAJENDER; HALAMI, 2018).

Portanto, permanece em aberto a busca de novos agentes trombolíticos capazes de superar a resistência à lise do coágulo, acelerar a recanalização vascular, reduzir os efeitos colaterais hemorrágicos e também possibilite menores custos de tratamento. Diante disso, existe inúmeras pesquisas sendo realizadas para o desenvolvimento de novos tipos de enzimas fibrinolíticas (SHARMA; OSMOLOVSKIY; SINGH, 2021).

Nos últimos anos, várias enzimas fibrinolíticas foram encontradas de microrganismos isolados de fontes alimentares, incluindo alimentos fermentados, como natto, iniciador de vinho de arroz fermentado, pasta de camarão fermentada, koji comercial, molho de peixe, além de plantas, animais marinhos, veneno de cobra, insetos, cogumelos, bactérias e fungos filamentosos (DENG et al., 2018; DURAIKANNU; CHANDRASEKARAN, 2018; SUN et al., 2016).

Nesse sentido, tanto as bactérias como os fungos têm um imenso potencial biotecnológico a ser ainda explorado, incluindo a capacidade de produzir enzimas fibrinolíticas, em especial os gêneros *Streptomyces* e *Aspergillus* (KOTB, 2013). Desta forma, esta pesquisa visa desenvolver proteases fibrinolíticas extraídas da bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e do fungo *Aspergillus tamaris* UCP 1279, com vistas a desenvolver no futuro um novo fármaco que não apresente alguns dos efeitos colaterais conhecidos dos fármacos trombolíticos atualmente disponíveis no mercado e que seja eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares como a trombose, além de contribuir para o fortalecimento do Pólo Farmacoquímico e de Biotecnologia do estado de Pernambuco.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir, purificar, caracterizar e avaliar o potencial fibrinolítico das proteases produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e produzir, purificar proteases produzidas *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279.

1.1.2 Objetivos específicos

- Produzir e extrair a protease fibrinolítica obtida pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573;
- Produzir e extrair a protease fibrinolítica obtida pelo *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279;
- Definir a melhor condição para purificação parcial das enzimas fibrinolíticas utilizando sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato de sódio por planejamento fatorial, analisando a influência das variáveis: pH, concentração do sal, massa molar e concentração do PEG;
- Caracterizar o perfil eletroforético da protease fibrinolítica utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma;
- Analisar o perfil cromatográfico utilizando cromatografia de gel filtração;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada quanto: ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e temperatura, substratos específicos, inibidores e efeito de íons;
- Determinar a atividade fibrinolítica, proteásica, fibrinogenolítica e amidolítica da enzima;

2 JUSTIFICATIVA

A trombose é uma das doenças cardiovasculares que mais causa mortalidade em todo o mundo. Diferentes agentes trombolíticos têm sido extensivamente utilizados para o tratamento terapêutico da trombose. Apesar do seu uso comum, a maioria desses agentes apresentam uma baixa especificidade pela fibrina, ocasionam reações adversas graves e possuem um custo elevado.

Os custos crescentes com as alternativas terapêuticas incorporadas nos sistemas de saúde exigem estratégias para garantir o acesso e a integralidade dos tratamentos.

Por isso há a necessidade de se investigar enzimas fibrinolíticas produzidas por novas fontes e utilizando-se de novas tecnologias, com vistas a alcançar a produção de medicamentos trombolíticos que sejam eficazes, seguros e com menores custos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA DO SISTEMA VASCULAR E COAGULAÇÃO SANGUÍNEA

Hemostasia é o processo fisiológico cujo principal objetivo é a manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue após uma lesão vascular, permitindo o reequilíbrio do sistema circulatório. Esse processo compreende interações complexas entre os vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação e o sistema fibrinolítico, os quais levam à formação do coágulo sanguíneo e posterior dissolução do mesmo após o reparo da lesão vascular (RODRIGUES, 2012).

In vivo, há um equilíbrio cuidadoso entre a coagulação, a conversão de fibrinogênio em fibrina, e a fibrinólise, a dissolução proteolítica do coágulo. O desequilíbrio em uma direção (prevalência de fibrinólise) pode levar ao sangramento, enquanto o desequilíbrio na direção oposta (prevalência de coagulação) pode causar trombose ou formação de um coágulo que pode bloquear o fluxo de sangue através de um vaso (WEISEL; LITVINOV, 2017).

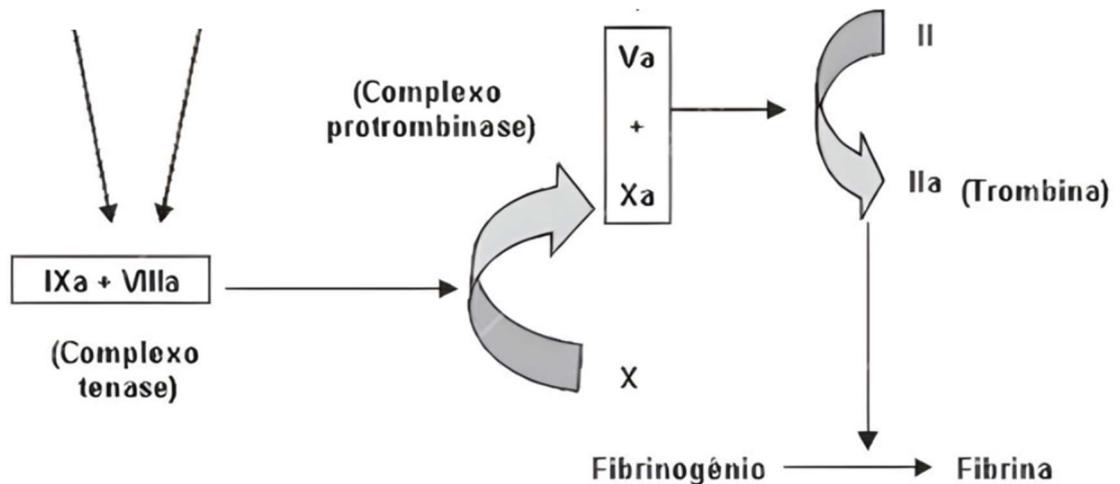
Com relação a coagulação sanguínea, o início do processo se dá, geralmente, após uma lesão no vaso sanguíneo, quando a integridade da camada endotelial é rompida, e a matriz subendotelial é exposta, havendo a ativação direta das plaquetas, com adesão e agregação destas, a chamada hemostasia primária (REPETTO; DE RE, 2017).

Posteriormente ocorre a hemostasia secundária, com a ativação da cascata de coagulação sanguínea, que se traduz em um sistema bem ajustado de enzimas que funcionam em conjunto com os elementos celulares (plaquetas e outras células sanguíneas). Os fatores (proteínas) da coagulação do sangue são em grande parte produzidos pelo fígado e secretados no sangue em suas formas inativas, sendo necessário sua clivagem para expressar as várias atividades enzimáticas (PRYZDIAL et al., 2018; TEN CATE; HACKENG; DE FRUTOS, 2017).

Ao final da cascata da coagulação, existe a formação do coágulo de fibrina, que encapsula e fortalece o trombo. Tradicionalmente, a hemostasia secundária é caracterizada por duas vias (extrínseca e intrínseca), ambas levando à formação de fibrina insolúvel. A Figura 1 demonstra o final das duas vias da hemostasia secundária

que levam à ativação do fator X, esse fator se combina com o fator V ativado na presença de cálcio e fosfolípido secretado pelas plaquetas para produzir a trombina, uma enzima que converte a forma solúvel fibrinogênio em fibrina insolúvel, esta se agrega ao tampão plaquetário dando resistência ao coágulo (REPETTO; DE RE, 2017).

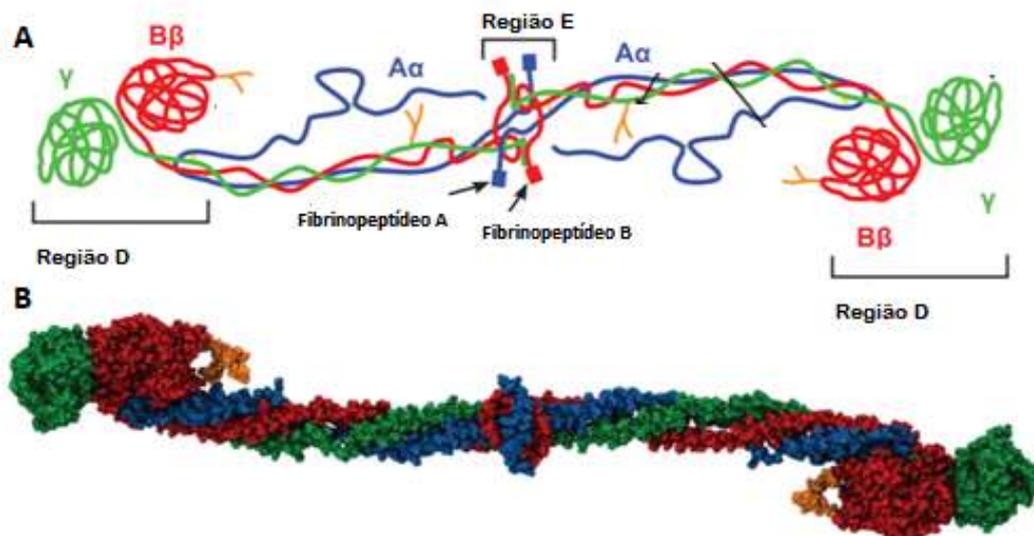
Figura 1 – Representação esquemática do final da cascata da coagulação.



Fonte: (FERREIRA et al., 2010).

O fibrinogênio é uma proteína solúvel de 340 kDa que circula no sangue em concentrações de 2 – 4mg/mL. Consiste em dois conjuntos de três cadeias polipeptídicas distintas ligadas por ponte dissulfeto ($A\alpha$, $B\beta$, and γ). É o principal alvo molecular da trombina, que o converte em monômeros de fibrina quando remove os fibrinopeptídeos A e B da porção N-terminal do fibrinogênio. Os monômeros resultantes são proteínas trinodular ligadas por pontes dissulfeto cujas as porções N-terminal e C-terminal se convergem nos nódulos E e D, respectivamente (Figura 2) (CHAPIN; HAJJAR, 2015).

Figura 2 – Molécula de Fibrinogênio. A – Representação esquemática da molécula de fibrinogênio; B – Representação da estrutura cristalográfica da molécula de fibrinogênio.



Fonte: Adaptado de (KÖHLER; SCHMID; SETTANNI, 2015).

Já na hemostasia terciária, os coágulos de fibrina são dissolvidos pelo sistema fibrinolítico, onde atuam uma série de reações enzimáticas com feedbacks positivos e negativos. O principal mecanismo da fibrinólise é ativação do zimogênio inativo plasminogênio para a serina protease plasmina, que digere o componente fibrina do trombo. O plasminogênio é sintetizado no fígado e circula no sangue, onde se incorpora ao trombo à medida que se forma, devido à sua afinidade pelos resíduos de lisina da fibrina. A degradação dos polímeros de fibrina pela plasmina resulta na liberação de um fragmento E e duas moléculas de fragmento D que são liberados como um dímero ligado covalentemente (dímero D) (MUKHOPADHYAY et al., 2019; VAZQUEZ-GARZA et al., 2017; WEISEL; LITVINOV, 2017).

A plasmina é a fibrinolisa primária e é ativada a partir do plasminogênio por qualquer uma das duas serina proteases primárias, ativador de plasminogênio tecidual (tPA) e ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA), que clivam proteoliticamente os resíduos Arg561-Val562 do plasminogênio. Enquanto o tPA é sintetizado e liberado pelas células endoteliais, o uPA é produzido por monócitos, macrófagos e epitélio urinário (CHAPIN; HAJJAR, 2015; MUKHOPADHYAY et al., 2019).

Os ativadores de plasminogênio têm meia-vida excessivamente curta (4 - 8 minutos) devido à presença de altas concentrações de inibidores específicos, como o inibidor do ativador do plasminogênio - 1 (PAI-1) e o inibidor do ativador do plasminogênio - 2 (PAI-2), que atuam sobre os ativadores do plasminogênio tipo tecidual (t-PA) e tipo uroquinase (u-PA); e a α 2-antiplasmina, α 2-macroglobulina e α 1-antitripsina, que atuam diretamente sobre a plasmina formada. Esses inibidores são importantes na regulação da fibrinólise, atuam para prevenir um excesso de atividade da plasmina ou dos ativadores do plasminogênio (CHAPIN; HAJJAR, 2015; PRYZDIAL et al., 2018).

3.2 TROMBOSE

De acordo com a OMS, as doenças cardiovasculares (DCV) permanecem como a principal causa de morte em todo mundo. Elas representam 16% do total de mortes por todas as causas. No Brasil, as DCV representam, um total ainda maior, cerca de 30% dos óbitos. Mais pessoas morrem anualmente por essas doenças do que por qualquer outra causa. As doenças cardiovasculares matam duas vezes mais que todos os tipos de câncer, 2,5 vezes mais que todos os acidentes e mortes por violência e seis vezes mais que as infecções, incluídas as mortes por síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) (OMS, 2020; SOCERJ - SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2017).

Dentre as doenças cardiovasculares, destaca-se a trombose, que aparece como a principal causa subjacente do acidente vascular cerebral (AVC), do infarto agudo do miocárdio (síndrome coronariana aguda) e do tromboembolismo venoso (TEV). A trombose é caracterizada pela formação ou desenvolvimento de coágulos sanguíneos responsáveis por causar a obstrução e inflamação na parede do vaso (MUKHOPADHYAY et al., 2019; PRYZDIAL et al., 2018; WANG; WU; LIANG, 2011).

Dentre os principais fatores diretamente ligados à gênese da trombose está a tríade descrita por Virchow em 1856: estase sanguínea, lesão endotelial e estados de hipercoagulabilidade. O conhecimento do papel relativo de cada um desses fatores aumentou muito a compreensão do fenômeno trombótico, permitindo o diagnóstico e a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolver trombose. (COSTA;

FERREIRA, 2021; PREHL et al., 2018; SBACV SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E DE CIRURGIA VASCULAR, 2015).

A trombose é uma doença com uma taxa de mortalidade bastante significativa. Mesmo após terapia apropriada, existe um alto índice de recorrência, que pode causar complicações graves. A abordagem terapêutica inicial para a trombose tem por objetivo a estabilidade clínica e hemodinâmica. Dessa forma, é fundamental que a terapia medicamentosa seja administrada de forma precoce nos pacientes visando à prevenção de recorrência de eventos trombóticos. Convencionalmente, há quatro opções de tratamentos (CONITEC, 2018; GOKTAY; SENTURK, 2017).

Existe a terapia com fármacos antiagregantes plaquetários, que atuam na prevenção e tratamento da trombose, uma vez que as plaquetas exercem um papel importante na hemóstase, devido a liberação de fatores trombogênicos e ao fenômeno de adesão plaquetária, que iniciam o processo de coagulação sanguínea (AFONSO et al., 2016).

Como segunda opção, a terapia anticoagulante é a base do tratamento para a maioria dos pacientes, a anticoagulação inicial é realizada com infusão de heparina de baixo peso molecular, com heparina não fracionada ou anticoagulantes orais (SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

A terceira opção é a terapia trombolítica sistêmica, onde os agentes trombolíticos ativam o plasminogênio para formar plasmina, resultando na dissolução dos trombos. É utilizada nos pacientes hemodinamicamente instáveis, devendo a mesma ser instituída de forma precoce, preferencialmente nas primeiras 48 horas do evento trombótico. É marcadamente superior à terapia anticoagulante em termos de restabelecimento do fluxo sanguíneo venoso. Os agentes trombolíticos resolvem apenas os trombos com os quais entram em contato. Portanto, se a oclusão venosa for completa, esses agentes, muitas vezes, não penetram nos coágulos sanguíneos, podendo resultar em falha de tratamento (CONITEC, 2018; SARAIVA, 2011).

Por último, devido à eficácia limitada da terapia antitrombótica sistêmica, para o tratamento de alguns casos de trombose venosa profunda, existe ainda a opção de tratamento conhecida por trombólise dirigida por cateter (TDC), que foi desenvolvida por radiologistas intervencionistas em 1994. Nesse tratamento, o cateter é direcionado com o auxílio de um sistema de ultrassom para o local afetado para dissociar a matriz

de fibrina do trombo com o uso de agentes trombolíticos localmente, permitindo uma trombólise mais eficiente (BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018; GOKTAY; SENTURK, 2017; LI et al., 2018).

3.3 AGENTES FIBRINOLÍTICOS

Nos eventos trombolíticos com bloqueio de uma artéria importante por um coágulo sanguíneo existe a necessidade de um tratamento imediato e os agentes trombolíticos podem restaurar o fluxo sanguíneo antes que ocorram grandes danos ao paciente. Os fibrinolíticos pertencem a uma classe de medicamentos especializada em promover a lise da fibrina e a consequente dissolução do trombo. A sua aplicação nas diferentes síndromes cardiovasculares agudas alterou o curso natural do infarto agudo do miocárdio, da embolia pulmonar e do acidente vascular cerebral isquêmico agudo (WARDLAW et al., 2014).

Os fibrinolíticos são geralmente classificados quanto a sua geração e modo de ação. Em relação a sua geração, temos a primeira geração representada pela Estreptoquinase e a Uroquinase, que são ativadores sistêmicos por converterem o plasminogênio inativo em plasmina ativa na circulação. A principal representante dessa geração, a Estreptoquinase é uma proteína de cadeia polipeptídica simples, derivada de cultura de *Streptococcus* beta-hemolíticos, por ser uma proteína natural é capaz de causar reações alérgicas. Seu mecanismo de ação é indireto na formação de um complexo com o plasminogênio para a geração de plasmina (BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018; CONITEC, 2018).

A segunda geração de trombolíticos foi produzida com a ajuda da engenharia genética, é representada pelo ativador de plasminogênio tecidual recombinante (r-tPA) ou Alteplase e pelo ativador de plasminogênio tipo uroquinase de cadeia única (scu-PA) ou Prouroquinase. São fibrino-específico, não antigênicos, raramente causam reações alérgicas ou hipotensão arterial. Diferente da primeira geração, eles evitam uma depleção excessiva do fibrinogênio circulante e do plasminogênio (BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018; CONITEC, 2018).

A terceira geração é representada pela Tenecteplase (TNK-tPA), que foi desenvolvida por algumas modificações na molécula do r-tPA e que proporcionaram

aumento do tempo de meia-vida plasmática, maior resistência a inibidores naturais e alta afinidade à fibrina (BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018).

Já em relação ao modo de ação, os agentes trombolíticos são classificados em dois tipos: os que canalizam a ação direta do plasminogênio para catalisar a ativação, como a Estreptoquinase, a Uroquinase e os que são ativadores de plasminogênio tipo tecidual recombinante (r-tPA), que ativam o plasminogênio em plasmina ativa. Existem ainda a Nattoquinase, a Lumbroquinase de minhoca e Fibrolase de veneno de cobra que são enzimas semelhantes à plasmina (DIWAN et al., 2021; KOTB, 2013; MESHRAM et al., 2017).

Apesar do vasto conhecimento sobre a utilidade dos medicamentos trombolíticos, esses podem causar importantes efeitos colaterais, sendo uma das principais complicações o risco hemorrágico, devido especialmente a queda do fibrinogênio e outros fatores de coagulação, pois muitos deles apresentam baixa especificidade para fibrina. Além disso, alguns desses agentes causam sérias reações alérgicas. Outras limitações incluem a necessidade de múltiplas dosagens e o alto custo (BARUZZI; STEFANINI; MANZO, 2018; JOJI; SANTHIAGU; SALIM, 2019; KRISHNAMURTHY; BELUR; SUBRAMANYA, 2018; WARDLAW et al., 2014).

Devido a isso, há um ímpeto para identificar novos candidatos potenciais de agentes trombolíticos que apresentem meia-vida mais longa, maior especificidade para a fibrina, um índice terapêutico mais alto e menos reações alérgicas (ALJUAMILY; AL-ZAIDY, 2013; ANDRADE et al., 2018; FERNANDES et al., 2016; KRISHNAMURTHY; BELUR; SUBRAMANYA, 2018).

3.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

Estudos sobre substâncias com atividade fibrinolítica mostram uma infinidade de possíveis fontes para sua obtenção. Enzimas fibrinolíticas foram isoladas a partir de insetos (TIAN et al., 2015; WANG et al., 2012), poliquetas (WANG et al., 2011), veneno de cobra (KIM et al., 2014), cogumelos comestíveis ou medicinais (CHOI; KIM; KIM, 2018), minhocas (VERMA; PULICHERLA, 2017; YEON et al., 2017), plantas (DA SILVA et al., 2020; HAMED et al., 2020; KIM et al., 2015), microalgas (BARROS et al., 2020; SILVA et al., 2018) e microrganismos (BATISTA et al., 2017; DENG et al., 2018; NASCIMENTO et al., 2017).

Existe um grande destaque para o papel dos microrganismos na produção de enzimas fibrinolíticas, alguns produtores microbianos foram isolados de fontes não alimentares, enquanto outros foram isolados de diferentes alimentos fermentados de origem asiática como o natto, chungkook-jang, tempeh ou de tipos de cogumelos comestíveis como *Armillaria mella*, *Cordyceps militaris*, *Pleurotus eryngii* e *Paecilomyces tenuipes*, havendo um grande potencial para o desenvolvimento de alimentos funcionais para a prevenção de trombose e outras doenças relacionadas (KOTB, 2013).

As enzimas de fontes microbianas ganharam importância especial devido às propriedades benéficas, como alta especificidade ao substrato, baixo custo de produção, possibilidade de produzir uma grande gama de enzimas, efeitos colaterais reduzidos em comparação a enzimas de fontes sintéticas. Assim, as indústrias farmacêuticas e os programas de pesquisa tem tido cada vez mais interesse na triagem de novas fontes microbianas para a produção de enzimas fibrinolíticas (ALI et al., 2020; PAN et al., 2019).

Outras vantagens em se utilizar enzimas de origem microbiana está na possibilidade de otimização estatística no bioprocessamento fermentativo, utilização de meios simples e econômicos, baixo tempo de produção, facilidade de cultivo, uso de ferramentas de engenharia genética para o desenvolvimento de cepas para uma produção estável e de alto rendimento (ALI et al., 2020; SHARMA et al., 2020).

Existe um grande destaque para a produção de enzimas fibrinolítica por bactérias do gênero *Bacillus* sp. e *Streptomyces* sp. Destaca-se também a produção desse tipo de enzimas por fungos, principalmente os filamentosos, alguns gêneros conhecidos por produzirem enzimas fibrinolíticas são *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. *Rhizopus* sp. (KOTB, 2013; MESHRAM et al., 2017).

3.4.1 Gênero *Streptomyces*

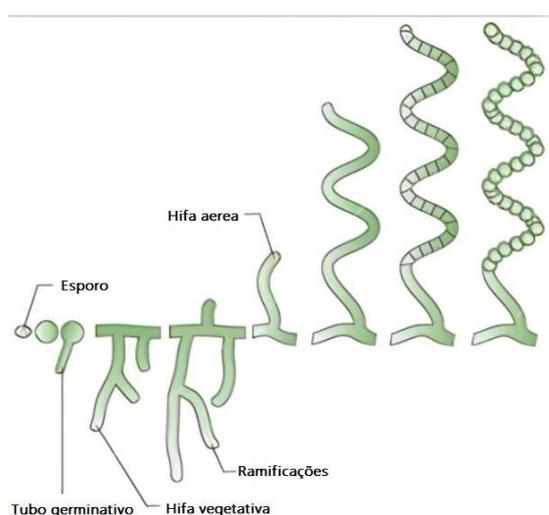
As bactérias e os fungos são bastante utilizados biotecnologicamente, destacando as actinobactérias do gênero *Streptomyces* e também os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* devido a capacidade que esses gêneros têm de produzir enzimas extracelulares, entre elas as proteases fibrinolíticas (OCHNEVA et al., 2019; SILVA et al., 2016).

O *Streptomyces* é um gênero de bactérias aeróbias gram-positivas, taxonomicamente o gênero pertence ao filo Actinobacteria, a ordem Actinomycetales e a família Streptomycetaceae (LAW et al., 2018). A família Streptomycetaceae inclui mais de 500 espécies que ocorrem no solo e na vegetação em decomposição, contribuindo em parte para o odor característico de terra. São saprófitas de solo comuns, por isso importantes na decomposição da matéria orgânica e na fertilidade do solo (BRITANNICA, 2022; HUGUET-TAPIA et al., 2016).

A cepa de *Streptomyces* foi descrita primeiramente por Ferdinand Cohn em 1875, que observando colônias que apresentavam crescimento ramificado, as denominou Streptotrix que significa “cabelo enrolado”. Mas a nome “Streptomyces” foi conferido por Selman Waksman em 1942, e significa “fungo enrolado”, o gênero se caracteriza por ter uma diferenciação morfológica complexa que se semelha à dos fungos (NERYS, 2015; SILVA, 2013).

A Figura 3 apresenta o ciclo de vida do gênero, que distingue-se por possuir hifas vegetativas bem desenvolvidas (entre 0,5 - 1,0 μm de diâmetro), que se ramificam em filamentos e formam uma rede de ramos aéreos chamada micélio que se transformam em uma cadeias de esporos reprodutivos (BRITANNICA, 2022; HWANG et al., 2014).

Figura 3. Ciclo de vida do gênero *Streptomyces*.



Fonte: (SILVA, 2013).

O gênero *Streptomyces* é altamente diferenciado, com grandes cromossomos lineares que codificam um arsenal de moléculas ativas e enzimas catabólicas, produz vários antibióticos e outros produtos naturais bioativos. O primeiro antibiótico produzido comercialmente pelo gênero foi a estreptomicina (de *S. griseus*), usado para o tratamento da tuberculose em meados da década de 1940. Outros antibióticos incluem: Cloranfenicol (de *S. venezuelae*), Ácido clavulânico (de *S. clavuligerus*), Rifampicina (*S. mediterranei*), Vancomicina (*S. orientalis*), Ivermectina (de *S. avermitilis*). Ele também está envolvido em uma ampla variedade de outros compostos bioativos, como imunossupressores, a exemplo do Tacrolimo (de *S. tsukubaensis*) e antineoplásicos como a Daunomicina (de *S. coeruleorubidus*) (FERRARI, 2018; HUGUET-TAPIA et al., 2016; ONAKA et al., 2011).

Em relação a produção de enzimas com atividade fibrinolítica, existem diversos relatos na literatura da produção pelo gênero *Streptomyces*, como *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 (DHAMODHARAN et al., 2019); *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1 (VERMA et al., 2018); *Streptomyces* sp. (CHITTE; DESHMUKH; KANEKAR, 2011; JU et al., 2012; MANDER et al., 2011; SILVA et al., 2013; SIMKHADA et al., 2010; SUN et al., 2016), *Streptomyces omiyaensis* (UESUGI et al., 2011), *Streptomyces violaceus* VITYGM (MOHANASRINIVASAN et al., 2016), *Streptomyces venezuelae* (NAVEENA et al., 2012).

A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi extraída de líquens da região amazônica, uma região que é sempre lembrada por sua rica biodiversidade, composta por uma variedade de espécies de plantas, animais, fungos e microrganismos. Devido a essa biodiversidade única, a Amazônia é um dos ecossistemas mais valiosos do planeta. Atualmente, os avanços da biotecnologia aumentaram a capacidade dos cientistas de avaliar efetivamente um número incontável de organismos e moléculas que existem nesse bioma que tem potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de alto valor agregado (BITTENCOURT; DE ALMEIDA RIOS, 2013).

A referida linhagem de *Streptomyces* já foi estudada em 2016 (SILVA et al., 2016) e em 2017 (BATISTA et al., 2017) sendo relatado uma ótima atividade fibrinolítica para o extrato bruto de fermentação. Na figura 4 observa-se a aparência de crescimento do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em meio Hickey-Tresner.

Figura 4 - *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em meio Hickey-Tresner.

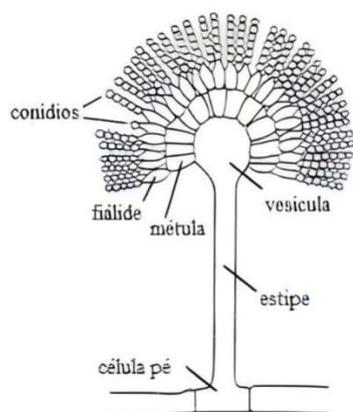


FONTE: A autora (2020)

3.4.2 Gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus*, é um gênero de fungos filamentosos que pertencem à família Trichocomaceae, a ordem Eurotiales e ao filo Ascomycota, esse filo é amplamente distribuído em mais de 250 espécies e são também saprofitos. O gênero foi descrito originalmente em 1729 pelo botânico e padre Antonio Micheli, que observando o fungo em um microscópio, achou a estrutura assexuada formadora de esporos semelhante a um aspergillum, que é um instrumento para borrifar água benta, e nomeou o gênero de acordo (DA SILVA et al., 2015; GIBBONS; ROKAS, 2013). A Figura 5 ilustra a estrutura morfológica básica do gênero.

Figura 5 - Estrutura morfológica básica do *Aspergillus*.



Fonte: (BATT; TORTORELLO, 2014)

O gênero se destaca por serem fungos ubíquos e anemófilos, classificado como um dos microrganismos mais abundantes, são mundialmente distribuídos, podendo ser isolados do solo, ar, água, alimentos, plantas, material em decomposição e superfícies. Muitas espécies, como o *A. fumigatus* e o *A. flavus*, são oportunistas e causam patologias, tanto para humanos como para outros animais; outras espécies, no entanto, apresentam importância biotecnológica, sendo úteis na indústria de alimentos, na produção de detergentes e também no melhoramento ambiental e na área da saúde (ALBUQUERQUE, 2016; DA SILVA et al., 2015; MESQUITA-ROCHA, 2019; PRADO et al., 2017).

A primeira exploração humana conhecida de *Aspergillus* para fins biotecnológicos foi para a transformação de arroz, soja e outros alimentos vegetais para melhorar a palatabilidade e torná-los disponíveis para posterior fermentação por leveduras e bactérias. Acredita-se que tenha se originado na China há cerca de 2.000 anos, a domesticação de *Aspergillus* para a produção de alimentos. Posteriormente, fermentações de alimentos de forma semelhante foram adotados na Indonésia, Japão, Coreia e outras partes da Ásia (BAKER; BENNETT, 2008).

A utilização do *Aspergillus* visando a área farmacêutica se dá pela capacidade do gênero em secretar uma variedade de compostos químicos ativos, esses compostos incluem antibióticos, micotoxinas, imunossupressores e agentes redutores de colesterol. O *Aspergillus terreus* produz Lovastatina, um agente redutor de colesterol, o *A. alliaceus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* produzem Asperlicina, Equinocandina B e Fumagilina que são usados como antifúngico, inibidor da angiogênese e antiparasitário. (PRADO et al., 2017).

O gênero também é conhecido na fabricação de outros produtos de interesse comercial como a enzima amilase (*A. niger* e *A. oryzae*), lipases (*A. niger* e *A. fumigatus*), molho shoyu, onde o *A. soyae* e *A. oryzae* atuam na fermentação da soja e do trigo e o saquê, onde o *A. oryzae* atua na fermentação do arroz (CRUZ et al., 2011; REINEHR et al., 2014; ROSA et al., 2009).

O uso do gênero para a produção de enzimas fibrinolíticas ainda não é muito difundido, havendo alguns relatos na literatura com o uso de *Aspergillus ochraceus* (BATOMUNKUEVA; EGOROV, 2001) e *Aspergillus oryzae* (FLYNN et al., 1994).

O *Aspergillus tamarii* UCP 1279 foi isolado do solo semiárido da Caatinga no Estado de Pernambuco. A Caatinga é um ecossistema exclusivo do Brasil que abriga muitas espécies endêmicas de plantas, animais e microrganismos. Este solo é pobre em nutrientes minerais e orgânicos e com baixa atividade de água. Devido às suas características ambientais, apresenta organismos resistentes a condições extremas. Conseqüentemente, em situações de estresse, muitos organismos respondem com aumento da produção de enzimas, que podem ter alto potencial biotecnológico a ser explorado (CORREIA, 2017).

O *Aspergillus tamarii* UCP 1279 já foi estudado em 2020 (AMARAL et al., 2020) quanto a produção de proteases, mas sem averiguação do potencial fibrinolítico dessas proteases (CORREIA, 2017). A Figura 6 demonstra a aparência do crescimento do fungo *Aspergillus tamarii* UCP 1279 em meio CZ.

Figura 6 - *Aspergillus tamarii* UCP 1279 em meio CZ.



FONTE: A autora (2021)

3.5 PROCESSO FERMENTATIVO

A tecnologia da fermentação compreende a condução de processos biológicos em escala industrial, fazendo a ligação entre a biologia, a microbiologia e engenharia química, sendo que a obtenção produtos de interesse com o uso da microbiologia antecede a Era Cristã; e há milhares de anos, sem saber da existência dos microrganismos, fabricava-se pão, vinho, cerveja, leite fermentado, queijos e outros. A tecnologia da fermentação iniciou-se com Pasteur em 1857 e hoje abrange diversas áreas como tratamento de resíduos, obtenção de alimentos e rações,

proteínas, enzimas, vitaminas, hormônios, antibióticos, solventes orgânicos, ácidos, polímeros, soros e vacinas (EMBRAPA, 2011).

O processo fermentativo industrial consiste em várias etapas que são divididas em: tratamentos iniciais, também denominado “*upstream processing*” ou processo a montante, que são operações de pré-tratamento da matéria-prima. São processos que antecedem a operação no reator e cuja finalidade é colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações no reator se desenvolvam em condições ótimas; e os tratamentos finais, também denominado “*downstream processing*” ou processo a jusante que são operações para a obtenção do produto, as etapas que ocorrem após a fermentação e que englobam a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, bem como o tratamento dos resíduos formados (BORZANI, 2001; MEYER; HOBISCH; KARA, 2022; MONTEIRO; SILVA, 2009).

O início do processo fermentativo começa com a escolha do agente biológico adequado, levando em consideração que cada cepa microbiana difere na eficiência de produção de enzimas, dependendo principalmente de sua capacidade de fermentação e de suas características nutricionais, fisiológicas e genéticas. Por isso, planejar um meio apropriado para máxima produção é de fundamental importância, uma vez que a composição do meio desempenha um papel importante na produção de metabólitos primários e secundários, afetando significativamente o rendimento e a taxa de produção da enzima (DEEPAK et al., 2010; DURAIKANNU; CHANDRASEKARAN, 2018).

Componentes do meio, como fontes de carbono, fontes de nitrogênio, minerais e as condições de fermentação, como temperatura, pH, agitação, aeração e tempo de incubação, afetam significativamente a fisiologia, o padrão de produção e o rendimento dos metabólitos e, portanto, precisam ser otimizados (BOSSA et al., 2019; TANEJA et al., 2017).

Além da otimização visando a produção máxima de enzimas, a otimização dos meios é considerada importante para redução de custos, uma vez que o custo de produção ainda é um grande obstáculo na produção de enzimas em escala industrial. Conseqüentemente, a busca por novos meios otimizados para aumentar o rendimento e agregar economia ao processo, está em voga (TANEJA et al., 2017).

Ultimamente a aplicação de resíduos agroindustriais tem sido vista como forma de minimizar o custo de produção de enzimas, além de valorizar os resíduos agroindustriais no intuito de diminuir a poluição ambiental. Muitos estudos foram realizados com a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas, como torta de óleo de gergelim, casca de amendoim, bagaço de maçã, resíduos de damasco e romã, resíduos de peixes e farelo de trigo (SCHALCHLI et al., 2016; VIJAYARAGHAVAN et al., 2016, 2019).

Existem dois tipos básicos de processos fermentativos usados para produção de enzimas: a fermentação submersa (FSm) e a fermentação em estado sólido (FES) (OLIVEIRA et al., 2012).

3.5.1 Fermentação submersa

A fermentação submersa (FSm) é um processo que disponibiliza os nutrientes para o microrganismo em meio líquido. Nutrientes como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons) ficam dissolvidos em água ou em soluções tampões, tornando-se facilmente acessíveis para utilização pelos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2012).

A fermentação em condições submersas é a mais utilizada industrialmente, principalmente devido a um processo de obtenção do produto mais simples em comparação com a fermentação em estado sólido. Além de possibilitar manter um ambiente mais homogêneo, com agitação e mistura de substratos de forma adequada, facilidade de controlar o nível de umidade, oxigênio dissolvido, nível de pH, nível de aeração e um monitoramento adequado do crescimento microbiano (SRIVASTAVA et al., 2019).

Outras vantagens do método de fermentação submersa são: maior facilidade no manejo, processo de fermentação relativamente rápido, escalonamento mais fácil, maior produtividade, facilidade de trabalhar com maiores volume de meio, facilidade na absorção de nutrientes e na excreção de metabólitos pela massa de microrganismo ficar totalmente submersa no meio. (GMOSER et al., 2019).

Esse tipo de fermentação é executado em fermentadores que podem ser equipados com agitadores, dispositivos de aeração para introdução de ar estéril e com camisas e serpentinas para o controle de temperatura. É realizada em lotes ou em

modo contínuo de operação. É um processo de fermentação altamente eficiente para muitas espécies de bactérias e algumas espécies de fungos. (JOHN et al., 2020; MONTEIRO; SILVA, 2009).

A FSm é muito utilizada para a produção de enzimas fibrinolíticas, temos o exemplo de (TANEJA et al., 2017) que produziram enzimas fibrinolíticas a partir da cepa de *Serratia* sp. KG-2-1 com meio líquido contendo (% p/v): dextrose 1,0, peptona 0,5, extrato de levedura 0,5, K_2HPO_4 0,1, KH_2PO_4 0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02, pH 7,2.; e também (D'SOUZA; BHATTACHARYA; DAS, 2020) que produziram enzimas fibrinolíticas a partir da cepa de *Bacillus cereus* S46 com meio líquido contendo caseína 10 g/L; K_2HPO_4 , 2,5 g/L; $NaHCO_3$, 1,0 g/L; $MnCl_2$, 0,02 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/L; $C_2H_3NaO_2$, 1,0 g/L, e $FeSO_4 \cdot 6H_2O$, 0,02 g/L; pH 7,0. Na figura 7 observa-se a fermentação submersa da bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em meio MS-2 modificado.

Entretanto a FSm não é tão econômica quanto a fermentação em estado sólido no que tange a infraestrutura requerida, uma vez que existe a necessidade de equipamentos grandes e sofisticados. Um estudo comparativo envolvendo a produção de biodiesel revelou que o investimento de capital necessário para a FSm foi 78% superior ao do modelo em estado sólido (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

Figura 7 – Fermentação submersa do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 em meio MS-2 modificado.



FONTE: A autora (2020)

3.5.2 Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como uma forma de cultura microbiana que se desenvolve em substratos sólidos naturais ou suportes inertes que tem capacidade de absorver água em um ambiente sem água livre ou com um conteúdo muito baixo de água livre. É um tipo de fermentação heterogênea trifásica (sólido-líquido-gás), em que os microrganismos crescem na superfície de substrato sólido poroso com umidade suficiente para manter o crescimento e metabolismo microbiano (DIAZ et al., 2016; ZHANG; WANG; CHEN, 2017).

Como a absorção de água é essencial para este processo, utiliza-se substratos fibrosos, que podem ou não fornecer nutrientes para o microrganismo. A água presente nesses sistemas encontra-se complexada a esses substratos fibrosos (matriz sólida) ou como uma fina camada absorvida na superfície dessas partículas. Em geral, nesses processos o teor de umidade varia entre 30 - 85% e a atividade de água típica vai de 0,40 - 0,90, mimetizando condições encontradas na natureza (CASTRO; PEREIRA JR, 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

O percentual adequado de água no bioprocesso é de extrema importância, uma vez que ela desempenha diversas funções, tais como, a difusão de nutrientes no meio reacional, a absorção destes pelos agentes microbianos, a remoção de metabólitos, a manutenção da função e estabilidade de estruturas biológicas, como proteínas, nucleotídeos e carboidratos, e a conservação da permeabilidade da membrana plasmática dos microrganismos (CASTRO; PEREIRA JR, 2010).

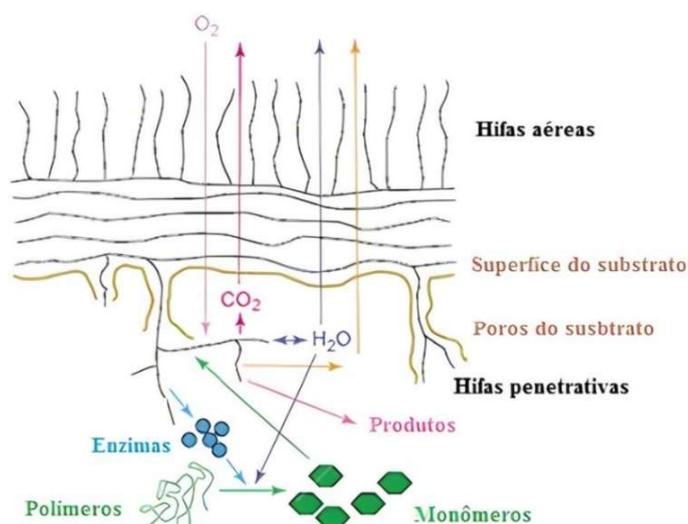
A FES é um método que apresenta diversas vantagens, como fácil transporte gasoso, menor consumo de água, alta produtividade volumétrica com alta concentração de produtos, maior rendimento, possibilidade de uso de resíduos celulósicos, como os resíduos agroindustriais, uso de fermentadores menores, menor necessidade de energia, menor produção de efluentes (MESHRAM et al., 2017; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; SRIVASTAVA et al., 2019).

A possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais na FES é uma grande vantagem desse método de fermentação, uma vez que o Brasil é um grande produtor agrícola, havendo grande geração desse tipo de resíduo, sendo então um alternativa bastante viável e econômica para o aproveitamento desses para a geração

substâncias de interesse econômico, como enzimas e outros produtos biotecnológicos (BOSSA et al., 2019; MARZO et al., 2019; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016).

A FES é muito empregada para a produção de enzimas industriais de origem fúngica, principalmente fungos filamentosos, devido à capacidade desse tipo de fungo de colonizar os espaços interparticulares das matrizes sólidas do substrato e produzir diversos metabólitos secundários que visam hidrolisar o substrato. A Figura 8 esquematiza um crescimento fúngico na superfície de substratos sólidos (MESHRAM et al., 2017; RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; SRIVASTAVA et al., 2019).

Figura 8. Esquema do crescimento fúngico na superfície de substratos sólidos.



Fonte: (HÖLKER; LENZ, 2005).

Contudo, a FES possui como desvantagem uma maior dificuldade na padronização dos processos. Do ponto de vista da transferência de calor, a condutividade térmica do gás (fase móvel do método) é muito menor do que a da água, por isso é mais difícil conseguir o controle adequado da temperatura, o que pode vir a desnaturar as enzimas que são produzidas no reator, como alternativa, pode-se realizar uma aeração no bioprocessamento, no entanto essa medida pode levar à perda de água devido à evaporação (RAVINDRAN; JAISWAL, 2016; ZHANG; WANG; CHEN, 2017). O Quadro 1 resume as vantagens e desvantagens dos métodos de fermentação submersa e em estado sólido.

Existe diversos relatos na literatura do uso da FES com diferentes tipos de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas fibrinolíticas. (VIJAYARAGHAVAN et al., 2017, 2019; VIJAYARAGHAVAN; PRAKASH VINCENT, 2014, 2015) utilizaram casca de banana, casca de grama verde, farelo de arroz, farelo de trigo e esterco de vaca; (BIJI et al., 2016) utilizaram resíduos de peixe e esterco de vaca; (MESHARAM et al., 2017) utilizaram farelo de arroz; (NASCIMENTO et al., 2015) utilizaram casca de maracujá, sabugo de milho, casca de mandioca, soja, semente de acerola, farelo de trigo e polpa cítrica. A Figura 9 demonstra a fermentação em estado sólido do *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279 usando farelo de trigo como substrato.

Figura 9 – Fermentação em estado sólido de *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279 usando farelo de trigo como substrato.



FONTE: A autora (2021)

Quadro 1 – Comparação entre os métodos de Fermentação submersa (FSm) e Fermentação em estado sólido (FES).

FSm	FES
<i>Vantagens</i>	
Maior facilidade de controle dos processos	Alta produtividade volumétrica com alta concentração de produtos
Facilidade na absorção de nutrientes e na excreção de metabólitos	Maior possibilidade de uso de resíduos agroindustriais
Escalonamento mais fácil	Menor consumo de água
Obtenção do produto mais simples	Menor necessidade de energia
Processo de fermentação relativamente rápido	Uso de fermentadores menores
Altamente eficiente para muitas espécies de bactérias e algumas espécies de fungos	Muito empregada para a produção de enzimas industriais de origem fúngica
	Menor produção de efluentes
<i>Desvantagens</i>	
Necessidade de equipamentos maiores e sofisticados	Maior dificuldade na padronização dos processos
Maior produção de efluentes	Maior dificuldade no controle da temperatura
Maior necessidade de energia	

FONTE: (SCHMIDELL et al., 2002)

3.6 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS: SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

A recuperação do produto de interesse é a segunda fase dos bioprocessos, também conhecida como processamento a jusante, compreende a separação e purificação do produto. O fato do produto ser excretado pelo microrganismo ou se encontrar intracelularmente, o tamanho do próprio bioprocessos e o valor estimado do produto são fatores que influenciam bastante essa etapa (JOHN et al., 2020; MONTEIRO; SILVA, 2009).

A sequência de operações pelas quais o meio contendo a substância a ser recuperada deve passar para obtenção de um produto de alta pureza contém, basicamente, quatro etapas: eliminação do material insolúvel, isolamento primário, purificação e isolamento do produto final. A eliminação do material insolúvel se dá por filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação. O isolamento primário se dá pela extração por solventes, precipitação e ultracentrifugação. O processo de purificação destina-se a remoção de impurezas bem como na concentração da biomolécula. A etapa final, o isolamento do produto final, compreende a formulação do bioproduto ou comercialização direta. As operações incluem centrifugação e subsequente secagem de um produto cristalizado, liofilizado ou seco por spray drying (MONTEIRO; SILVA, 2009; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Há um interesse considerável no desenvolvimento de processos de downstream mais eficientes para a recuperação e purificação de produtos biológicos. A necessidade de se estabelecer métodos seletivos e escalonáveis para a recuperação desses produtos resultou na implementação de diversas estratégias de bioengenharia nessa área, com melhorias em sistemas de extração líquido-líquido, dispositivos de filtração e estratégias de cromatografia, com vistas a tentativas de redução de etapas e conseqüente redução de custos, uma vez que os processos de purificação são responsáveis por até 80% dos custos totais dos bioprocessos (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017; RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Em relação aos processos de purificação de enzimas fibrinolíticas observamos na literatura que grande parte dos trabalhos utilizam inicialmente meios de precipitação e posteriormente etapas de cromatografias, sendo muito utilizado a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de filtração em gel (NARASIMHAN et al., 2018; SALUNKE; KHARAT, 2019; YEON et al., 2017), havendo um destaque também para a utilização do sistemas de duas fases aquosas como método de purificação inicial (ALI et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2016).

Nesse contexto, o Sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma técnica de fracionamento líquido-líquido que envolve a construção de sistemas de extração que podem ser formados por dois polímeros, um polímero e um sal, um líquido iônico e um sal ou ainda um álcool de baixo peso molecular e um sal, que misturados acima

de uma concentração limite, possibilita a formação de duas fases imiscíveis (IQBAL et al., 2016; RUIZ-RUIZ et al., 2012).

Esse processo foi descoberto acidentalmente por Martinus Willem Beijerinck em 1896, enquanto misturava soluções aquosas de amido e gelatina. No entanto, sua aplicação real foi descoberta por Per-Åke Albertsson em meados da década de 50. Desde então, o SDFA tem sido usado para uma variedade de propósitos, como para a recuperação e purificação de muitos produtos biológicos, incluindo proteínas, enzimas, material genético, células e organelas (ASENJO; ANDREWS, 2011; IQBAL et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2018).

Os métodos tradicionais de separação, muitas vezes, utilizam condições extremas, como altas temperaturas e pressão, grande consumo de produtos químicos e alto consumo de energia. O SDFA se apresenta como uma alternativa interessante a extração de produtos biológicos, como as enzimas, pois consegue preservar a atividade enzimática e manter a estabilidade das biomoléculas, uma vez que trabalha com condições não desnaturantes, tem alta biocompatibilidade, fácil escalonamento, além de ter baixo consumo de energia, o que gera menos impactos para o meio ambiente. A técnica, em muitos casos, possibilita um isolamento em etapa única, permitindo a purificação simultânea da moléculas alvo e a remoção de contaminantes, resultando portanto em menor tempo de processamento (ASENJO; ANDREWS, 2011; DANIELSSON; ALBERTSSON, 2013; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

O SDFA explora a incompatibilidade entre soluções aquosas, sendo que o sucesso do método depende da capacidade de manipular os parâmetros do sistema (composição das fases) de modo a obter coeficientes de partição apropriados. Sendo o coeficiente de partição a razão da concentração de uma espécie química ou de soluto entre dois meios em equilíbrio, objetiva-se conseguir uma maior concentração da biomolécula em uma das fases, de modo a obter uma maior seletividade na separação da proteína alvo (ASENJO; ANDREWS, 2011; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Apesar do mecanismo exato de partição ainda não ser completamente compreendido, sabe-se que o particionamento do produto biológico entre as duas fases tem uma forte dependência das propriedades de superfície das proteínas a serem extraídas e da composição do próprio sistema de duas fases. As propriedades

das biomoléculas incluem variáveis como: hidrofobicidade, conformação molecular, massa molecular, concentração da proteína, carga elétrica líquida e ponto isoelétrico (pI). Já a composição do sistema inclui: o peso molecular e concentração de polímero formador da fase, o tipo e concentração do sal formador da fase oposta, a relação de volume entre as fases, pH e temperatura (ASENJO; ANDREWS, 2011; TEIXEIRA et al., 2018; TORRES-ACOSTA et al., 2019).

Nesse sentido, a proteína alvo e os contaminantes irão interagir com as moléculas circundantes dentro de cada fase do sistema por meio de várias interações de natureza químicas e físicas, como ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals, iônicas, hidrofóbicas, etc. O efeito líquido dessas interações será diferente em cada uma das fases e, portanto, a proteína alvo irá particionar preferencialmente para uma das fases (ASENJO; ANDREWS, 2012; NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017; RUIZ-RUIZ et al., 2012).

As propriedades de particionamento podem ser exploradas individualmente ou em conjunto para conseguir uma separação eficaz de uma proteína particular, pode-se alterar o peso molecular dos polímeros, o pH, a temperatura, o tipo de sal, a força iônica da fase sal, adicionando um sal adicional, como NaCl ou ainda adicionar aos polímeros grupos hidrofóbicos ou grupos químicos que promovam uma bioafinidade específica com a proteína alvo, aumentando a seletividade e o grau de purificação (ASENJO; ANDREWS, 2011, 2012; DANIELSSON; ALBERTSSON, 2013).

No que tange ao uso do SDFa para purificação de enzimas fibrinolíticas (RATHNASAMY et al., 2020) utilizaram SDFa formado por solventes eutéticos naturais profundos (NADES) e sulfato de sódio para purificar proteases fibrinolíticas produzidas por *Bacillus cereus* alcançando um fator de purificação de 3,97; (SILVA et al., 2013) utilizaram SDFa formado por sais de fosfato e polietilenoglicol para purificar proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces* sp. DPUA 1576 obtendo um fator de purificação de 1,51; (DA SILVA et al., 2020) utilizaram SDFa formado por polietilenoglicol e fosfato de sódio para purificar proteases fibrinolíticas produzidas a partir de sementes de *Gliricidia sepium* obtendo um fator de purificação de 8,11; (ALI et al., 2014) utilizaram SDFa formado por polietilenoglicol e sais de fosfato para purificar enzimas fibrinolíticas produzidas por *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc

obtendo um fator de purificação de 7,01; (NASCIMENTO et al., 2016) utilizaram SDFa formado por polietilenoglicol e sulfato de sódio para purificar enzimas fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 obtendo um fator de purificação de 10,0. A figura 10 apresenta o sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato usado para a extração da enzima fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

Figura 10 – Sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato usado para a extração da enzima fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.



FONTE: A autora (2020)

Embora a manipulação dos parâmetros do sistema possa favorecer o particionamento seletivo do produto de interesse para uma fase particular, em muitos casos, a especificidade não é alta o bastante para alcançar a separação completa entre o produto e contaminantes. Sendo necessário que se proceda etapas subsequentes de purificação (RUIZ-RUIZ et al., 2012).

3.7 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

As enzimas são catalisadores altamente eficazes, alcançando acelerações de taxas muito grandes e com alta especificidade. São amplamente utilizadas em indústrias, pesquisas científicas e diagnósticos clínicos (ARCUS; MULHOLLAND, 2020).

O processo de catálise por uma enzima é influenciado pela natureza do meio, pelo substrato, concentração da enzima, temperatura, pH e presença de ativadores e inibidores, já a especificidade das enzimas é devido a afinidade estereoquímica e química para com o substrato (ARCUS; MULHOLLAND, 2020).

Em se tratando de temperatura, observa-se que o perfil de temperatura versus atividade de uma enzima mostra que a atividade aumenta com o aumento da temperatura até atingir um valor máximo, essa temperatura é conhecida como temperatura ótima e é fixada para cada enzima, entretanto se a temperatura ultrapassar além da temperatura ótima, a atividade da enzima diminui abruptamente, devido a um processo de desnaturação da enzima. O mesmo acontece com relação ao pH, uma enzima também tem um valor de pH definido no qual sua atividade catalítica é máxima, este valor é conhecido como o pH ideal, já em pH de valores extremos, a atividade catalítica é completamente perdida devido à desnaturação da proteína (ARSALAN; YOUNUS, 2018).

Outro fator importante que influencia a atividade enzimática é a presença de cofatores, que são componentes não-proteicos necessários para a atividade catalítica de algumas enzimas. Os cofatores podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas, muitas delas derivadas de vitaminas do complexo B. Vale destacar também o papel dos inibidores, que podem inibir a ação catalítica de uma enzima por ocuparem temporariamente seu sítio ativo por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou alterar a conformação espacial da enzima, impedindo sua união ao substrato (inibidor não competitivo) (ARSALAN; YOUNUS, 2018).

Devido a interferência dos fatores anteriormente citados na ação enzimática, o perfil de comportamento de determinada enzima frente a estes fatores é muito utilizado para a caracterização bioquímica de enzimas, visando principalmente uma futura aplicação terapêutica da biomolécula.

Além da caracterização bioquímica das enzimas, os testes de caracterização funcional *in vitro*, possibilitam conhecer de forma pormenorizada o mecanismo de ação das enzimas, bem como sua possível toxicidade farmacológica antes de testar a eficácia de um candidato à fármaco *in vivo*. Para isso, é necessário coletar o máximo de informações em testes *in vitro*, pois são ambientes controlados nos quais cada processo biológico pode ser estudado isoladamente (PRADILLO et al., 2022).

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM
STREPTOMYCES PARVULUS BY POLYETHYLENE GLYCOL-PHOSPHATE
AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM**

Artigo publicado pela revista Anais da Academia Brasileira de Ciências em 2021.





An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 4): e20210335 DOI 10.1590/0001-376520210210335
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

HEALTH SCIENCES

Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system

VIVIANE N.S. ALENCAR, MARIA CLARA DO NASCIMENTO, JULYANNE V. DOS SANTOS FERREIRA, JUANIZE M. DA SILVA BATISTA, MARCIA N.C. DA CUNHA, JÉSSICA M. DO NASCIMENTO, RENATA V. DA SILVA SOBRAL, MILENA T.T. DO COUTO, THIAGO P. NASCIMENTO, ROMERO M.P.B. COSTA, ANA LÚCIA F. PORTO & ANA CRISTINA L. LEITE

Abstract: Fibrinolytic proteases are a promising alternative in the pharmaceutical industry, they are used in the treatment of cardiovascular diseases, especially thrombosis. Microorganisms are the most interesting source of fibrinolytic proteases. The aim of this study was the production of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, the recovery of the protease by aqueous two-phase system and partial biochemical characterization of the enzyme. The aqueous two-phase system was performed according to a 2⁴-full factorial design using polyethylene glycol molar mass, polyethylene glycol concentration, citrate concentration and pH as independent variables. It was analyzed the effect of different ions, surfactants, inhibitors, pH and temperature on enzyme activity. The best conditions for purifying the enzyme were 17.5% polyethylene glycol 8,000, 15% Phosphate and pH 8.0, it was obtained a partition coefficient of 7.33, a yield of 57.49% and a purification factor of 2.10-fold. There was an increase in enzyme activity in the presence of Fe²⁺ and a decrease in the presence of β-Mercaptoethanol, phenylmethylsulfonyl fluoride and Iodoacetic acid. The optimum pH was 7.0 and the optimum temperature was 40 °C. The purified protease exhibited a molecular mass of 41 kDa. The fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* proved to be a viable option for the development of a possible drug with fibrinolytic action.

Key words: Actinomycetes, protease, fibrinolysis, thrombolytic.

INTRODUCTION

Thrombosis is a cardiovascular disease with the highest morbidity and mortality worldwide. It is caused by unbalanced formation and accumulation of blood clots that block the normal flow blood (Preston et al. 2019). These clots are formed from conversion of fibrinogen to fibrin due to the proteolytic action of thrombin (Kattula et al. 2017). Current therapies against the formation of clots include antiplatelet drugs, anticoagulants and thrombolytic agents, however, several of these drugs promote haemorrhagic side-effects and exhibit high cost. Thus, a drug with the ability to quickly remove blood clots and restore blood flow is of paramount importance to the effective treatment

An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 4)

ALENCAR, V. N. S. et al. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1–17, 2021.

**PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR
ASPERGILLUS TAMARII KITA UCP 1279 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS
FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO**

Capítulo de livro publicado no livro *Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia* da Editora Atena em 2020.



CAPÍTULO 12

PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *ASPERGILLUS TAMARII* KITA UCP 1279 ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG-FOSFATO

Data de aceite: 01/10/2020

Data de submissão: 20/08/2020

Viviane do Nascimento e Silva Alencar

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6780280958206384>

María Clara do Nascimento

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/5929405825655717>

Julyanne Victória dos Santos Ferrelra

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/8901230412759036>

Márcia Nieves Carneiro da Cunha

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/5717867430918774>

Juanize Matias da Silva Batista

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6699725036732885>

Thiago Pajeú Nascimento

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/6243710241063546>

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Universidade de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/1797280118220965>

Ana Lucla Figuelredo Porto

Universidade Federal Rural de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/4989617783837981>

Ana Cristina Lima Leite

Universidade Federal de Pernambuco
Recife – Pernambuco
<http://lattes.cnpq.br/8115160528911145>

RESUMO: A fibrina é uma proteína estrutural responsável pela formação de coágulos sanguíneos. Entretanto uma desregulação nesse processo pode provocar acúmulo de coágulos na corrente sanguínea, desencadeando doenças graves como embolia pulmonar, trombose e acidente vascular cerebral. Proteases com atividade fibrinolítica atuam na dissolução desses coágulos sanguíneos a partir da “quebra”, por hidrólise, da molécula de fibrina. Devido a esse potencial das enzimas fibrinolíticas, essas se tornaram alvos de diversas pesquisas de aplicação. As enzimas de origem microbianas se tornam muito interessantes, já que proporcionam fácil manuseio, produtividade alta e baixo custo de produção. No bioprocessamento para a produção dessas enzimas os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) constituem-se em uma técnica que pode, com uma única etapa, clarificar, extrair, pré-purificar e concentrar a amostra. O SDFA frequentemente é composto por polímeros e sais, que quando suas concentrações estão acima da curva de equilíbrio resulta na formação de duas fases imiscíveis, as quais podem ser utilizadas para separar os contaminantes do composto de

ALENCAR, V. DO N. E S. et al. Partição de proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamaris kita* UCP 1279 através do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. In: NETO, B. R. DA S. (Ed.). **Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena, 2020. p. 118–129.

4 CONCLUSÃO GERAL

As enzimas fibrinolíticas oriundas do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e do *Aspergillus tamarii kita* UCP1279 foram produzidas utilizando como substratos resíduos agroindustriais, o que proporciona um meio mais econômico para a obtenção de produtos biotecnológicos.

Nas fermentações foram obtidas enzimas fibrinolíticas com boa atividade proteásica e também boa atividade fibrinolítica, sendo verificado maiores valores para a enzima fibrinolítica produzida pelo *Aspergillus tamarii kita* UCP1279, entretanto a produção de proteínas por esse microrganismo também foi maior, o que ocasionou uma menor atividade específica (0,19 U/mg) quando comparado a enzima produzida pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (6,6 U/mg).

As enzimas foram pré-purificadas utilizando o SDFA PEG/Fosfato obtendo-se para o *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 um coeficiente de partição de 7,33 e um fator de purificação na fase PEG de 2,10, o que enseja a necessidade de pesquisas futuras que visem adicionar outras etapas de purificação para possibilitem aumentar o grau de concentração desta enzima, já em relação a enzima do *Aspergillus tamarii Kita* UCP1279 o SDFA PEG/Fosfato se mostrou um excelente método de extração com coeficiente de partição de 0,06 e fator de purificação na fase Sal de 14,1.

A enzima fibrinolítica do *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi caracterizada, verificando-se que a mesma apresentava peso molecular e classe enzimática compatível com outros achados de estudos sobre enzimas fibrinolíticas. O pH e temperatura ótima da enzima foram muito próximos das condições fisiológicas humanas de pH e temperatura.

Esses achados evidenciam o potencial do microrganismo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 para a produção de enzimas fibrinolíticas, com possível aplicação para o tratamento da trombose, entretanto é necessário ainda a realização de estudos futuros visando suas aplicações *in vivo*.

Os estudos iniciais com a produção de enzimas fibrinolíticas pelo *Aspergillus tamarii kita* UCP1279 e o êxito na extração de mesma pelo SDFA também demonstram o potencial desse microrganismo, entretanto necessita-se ainda de maiores estudos de caracterização e aplicação da referida enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, A. et al. A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 12, n. 3, p. 170–179, 2016.
- AL-JUAMILY, E. F.; AL-ZAIDY, B. H. Purification and Characterization of Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus lichniformis* B4. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**, v. 2, n. 5, p. 256–266, 2013.
- ALBUQUERQUE, K. K. DA S. A. **Extração em sistemas de duas fases aquosas (PEG/Citrato), caracterização e aplicação da tanase de *Aspergillus* sp. SIS 25 em chá verde (*Camellia sinensis*)**. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.
- ALI, M. A. M. et al. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1498–1517, 2020.
- ALI, M. S. et al. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359–366, 2014.
- AMARAL, Y. M. S. et al. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2020.
- ANDRADE, M. V. S. et al. Avaliação da Intensidade de Sangramento de Procedimentos Odontológicos em Pacientes Anticoagulados com Varfarina ou Dabigatrana. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 3, p. 394–399, 2018.
- ARCUS, V. L.; MULHOLLAND, A. J. Temperature , Dynamics , and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. p. 163–182, 2020.
- ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1833–1847, 2018.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, n. September 2011, p. 1–10, 2012.
- BAKER, S. E.; BENNETT, J. W. Genomics of the *Aspergilli*. **The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology, and Research Methods**, p. 3–13, 2008.
- BARROS, P. D. S. DE et al. Fibrinolytic enzyme from *Arthrospira platensis* cultivated in medium culture supplemented with corn steep liquor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3446–3453, 2020.
- BARUZZI, A. C. DO; STEFANINI, E.; MANZO, G. Fibrinolíticos: indicações e

tratamento das complicações hemorrágicas TT - Fibrinolytics: indications and treatment of hemorrhagic complications. **Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 421–427, 2018.

BATISTA, J. M. S. et al. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p. 123–129, 2017.

BATOMUNKUEVA, B. P.; EGOROV, N. S. Isolation, purification, and separation of the complex preparation of extracellular proteinases with fibrinolytic and anticoagulant properties from *Aspergillus ochraceus* 513. **Mikrobiologiya**, v. 70, n. 5, p. 602–606, 2001.

BATT, C. A.; TORTORELLO, M. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. New York: Academic Press, 2014.

BIJI, G. D. et al. Bio-prospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND5 in solid state fermentation. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2016.

BITTENCOURT, D.; DE ALMEIDA RIOS, S. Biotechnology and the sustainable use of Amazon biodiversity. In: **Amazon: Biodiversity Conservation, Economic Development and Human Impact**. [s.l: s.n.]. p. 155–172.

BORZANI, W. Processo Biotecnológico industrial genérico. In: BORZANI, W. et al. (Eds.). **Biotecnologia Industrial**. 1ª edição ed. São Paulo: Blucher, 2001. p. 249–251.

BOSSA, L. F. et al. Resíduos agroindustriais para produção de produtos biotecnológicos. In: **Agroecologia: caminho de preservação do meio ambiente**. [s.l: s.n.]. p. 9–25.

BRITANNICA, T. E. OF E. **Streptomyces**. Disponível em: <<https://www.britannica.com/science/Streptomyces>>. Acesso em: 18 maio. 2023.

CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, n. 1, p. 17–24, 2015.

CHITTE, R. R.; DESHMUKH, S. V.; KANEKAR, P. P. Production, purification, and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from thermophilic streptomyces sp. MCMB-379. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 5–6, p. 1406–1413, 2011.

CHOI, J. H.; KIM, K. J.; KIM, S. Purification and antithrombotic potential of a fibrinolytic enzyme from shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 1, p. 47–59, 2018.

CONITEC. **Alteplase para tratamento da embolia pulmonar aguda** Brasília, 2018. Disponível em: <<http://conitec.gov.br/es-es/decisoes-sobre-incorporacoes>>

CORREIA, P. C. **Produção, purificação e aplicação de proteases produzidas por fungos filamentosos isolados de solos da caatinga de Pernambuco.** [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

COSTA, M. T.; FERREIRA, G. M. Trombose venosa profunda relacionada ao ciclo gravídico-puerperal e alterações fisiopatológicas com o advento do COVID-19 Deep venous thrombosis related to the pregnancy-puerperal cycle and physiopathological changes with the advent of COVID-19 Trombosis . v. 2021, p. 1–10, 2021.

CRUZ, E. A. et al. Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Unopar Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 245–249, 2011.

D'SOUZA, D. H.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A. Fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* S46: Purification, characterization, and evaluation of its in vitro thrombolytic potential. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 661–668, 2020.

DA SILVA, A. V. et al. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, n. May, p. 1–11, 2020.

DA SILVA, F. C. et al. Taxonomia Polifásica Para Identificação De *Aspergillus* Seção Flavi: Uma Revisão. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.

DANIELSSON, R.; ALBERTSSON, P. Å. Aqueous polymer two-phase systems and their use in fragmentation and separation of biological membranes for the purpose of mapping the membrane structure. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 43, n. 5, p. 512–525, 2013.

DEEPAK, V. et al. Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 47, n. 6, p. 297–304, 2010.

DENG, Y. et al. A dual-function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1338–1343, 2018.

DEVARAJ, Y.; RAJENDER, S. K.; HALAMI, P. M. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Bacillus amyloliquefaciens* MCC2606 and analysis of fibrin degradation product by MS/MS. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 172–180, 2018.

DHAMODHARAN, D. et al. Novel fibrinolytic protease producing *Streptomyces radiopugnans* VITSD8 from Marine Sponges. **Marine Drugs**, v. 17, n. 3, 2019.

DIAZ, A. B. et al. Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 22, p. 9555–9566, 2016.

DIWAN, D. et al. Thrombolytic enzymes of microbial origin: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 1–21, 2021.

DURAIKANNU, D.; CHANDRASEKARAN, S. D. Optimization and modeling studies on the production of a new fibrinolytic protease using *Streptomyces*

- radiopugnans_VITSD8. **Frontiers in Biology**, v. 13, n. 1, p. 70–77, 2018.
- EMBRAPA. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011.
- EPICTETO. **A arte de viver: o manual clássico de virtude, felicidade e sabedoria**. Rio de Janeiro: Sextante, 2000.
- FERNANDES, J. C. DOS S. F. et al. Os novos anticoagulantes no tratamento do tromboembolismo venoso. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 42, n. 2, p. 146–154, 2016.
- FERRARI, W. M. C. DA S. **Recuperação e purificação de tacrolimo proveniente de Streptomyces tsukubaensis**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2018.
- FERREIRA, C. N. et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 5, p. 416–421, 2010.
- FLYNN, G. et al. Encapsulation of the thrombolytic enzyme, brinase, in photosensitized erythrocytes: a novel thrombolytic system based on photodynamic activation. **J Photochem Photobiol B**, v. 26, n. 2, p. 193–196, 1994.
- GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the Aspergillus genome. **Trends Microbiol**, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2013.
- GMOSER, R. et al. Combining submerged and solid state fermentation to convert waste bread into protein and pigment using the edible filamentous fungus *N. intermedia*. **Waste Management**, v. 97, p. 63–70, 2019.
- GOKTAY, A. Y.; SENTURK, C. Endovascular treatment of thrombosis and embolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 906, p. 195–213, 2017.
- HAMED, M. B. et al. A contradictory action of procoagulant ficin by a fibrinolytic serine protease from Egyptian *Ficus carica* latex. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00492, 2020.
- HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.
- HUGUET-TAPIA, J. C. et al. Genome content and phylogenomics reveal both ancestral and lateral evolutionary pathways in plant-pathogenic *Streptomyces* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 7, p. 2146–2155, 2016.
- HWANG, K. S. et al. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 255–268, 2014.
- IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.
- JOHN, J. et al. Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 1086–1099, 2020.

JOJI, K.; SANTHIAGU, A.; SALIM, N. Computational modeling of culture media for enhanced production of fibrinolytic enzyme from marine bacterium *Fictibacillus* sp. strain SKA27 and in vitro evaluation of fibrinolytic activity. **3 Biotech**, v. 9, n. 9, 2019.

JU, X. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. XZNUM 00004. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 2479–2486, 2012.

KIM, D. W. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1159–1167, 2015.

KIM, J.-Y. et al. Isolation and Characterization of a 32-kDa Fibrinolytic Enzyme (FE-32kDa) from *Gloydius blomhoffii siniticus* Venom. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 17, n. 1, p. 44–50, 2014.

KÖHLER, S.; SCHMID, F.; SETTANNI, G. The Internal Dynamics of Fibrinogen and Its Implications for Coagulation and Adsorption. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 9, 2015.

KOTB, E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6647–6665, 2013.

KRISHNAMURTHY, A.; BELUR, P. D.; SUBRAMANYA, S. B. Methods available to assess therapeutic potential of fibrinolytic enzymes of microbial origin: a review. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 9, n. 1, 2018.

LAW, J. W. et al. Progress in Microbes and Molecular Biology Taxonomic and Characterization Methods of *Streptomyces*: A Review. p. 1–13, 2018.

LI, W. et al. Catheter-directed thrombolysis for patients with acute lower extremity deep vein thrombosis: a meta-analysis. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 26, p. e2990, 2018.

MANDER, P. et al. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1449–1455, 2011.

MARZO, C. et al. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. **Waste Management and Research**, v. 37, n. 2, p. 149–156, 2019.

MESHARAM, V. et al. Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1496–1512, 2017.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: aspectos gerais e importância na medicina contemporânea *Aspergillus fumigatus*: general aspects and importance in contemporary medicine. **J Health Sci Inst**, v. 37, n. 2, p. 169–73, 2019.

MEYER, L. E.; HOBISCH, M.; KARA, S. Process intensification in continuous flow biocatalysis by up and downstream processing strategies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 78, n. i, p. 102835, 2022.

MOHANASRINIVASAN, V. . et al. In vitro thrombolytic potential of actinoprotease from marine *Streptomyces violaceus* VITYGM. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 14, p. 120–124, 2016.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. DO N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MUKHOPADHYAY, S. et al. Fibrinolysis and inflammation in venous thrombus resolution. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUN, p. 1–14, 2019.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 931–957, 2017.

NARASIMHAN, M. K. et al. Purification, biochemical, and thermal properties of fibrinolytic enzyme secreted by *Bacillus cereus* SRM-001. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 34–42, 2018.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 03, n. 03, p. 81–91, 2015.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1025, p. 16–24, 2016.

NASCIMENTO, T. P. et al. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 8, p. 1209–1219, 2017.

NAVEENA, B. et al. Enhanced production of thrombinase by *Streptomyces venezuelae*: Kinetic studies on growth and enzyme production of mutant strain. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 417–424, 2012.

NERYS, L. L. DE A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e anticâncer de metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp.** UFPEDA 3407. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

OCHNEVA, A. et al. Usage of vermiculite as promising carrier for solid-state fermentation for fibrinolytic enzymes production by *Aspergillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 305, n. 2019, p. S52, 2019.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Comparação Entre Três Bioprocessos Para a Produção De Enzimas Proteolíticas Utilizando Resíduos Agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 2, p. 822–831, 2012.

OMS. **OMS revela principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo entre 2000 e 2019.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/9-12-2020-oms-rev>>.

ONAKA, H. et al. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 400–406, 2011.

- PAN, S. et al. Non-sterile submerged fermentation of fibrinolytic enzyme by marine bacillus subtilis harboring antibacterial activity with starvation strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–13, 2019.
- PRADILLO, J. M. et al. Del laboratorio a la clínica en el ictus isquémico agudo. Modelos experimentales in vitro e in vivo. **Revista de neurologia**, v. 75, n. 9, p. 283–293, 2022.
- PRADO, F. B. et al. Produção de compostos bioativos por Aspergillus mantidos sob duas condições de preservação Production of bioactive compounds by Aspergillus kept under two preservation conditions. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 12, n. 1, p. 37–47, 2017.
- PREHL, V. B. et al. ETIOPATOGENIA E DIAGNÓSTICO DA TROMBOSE VENOSA PROFUNDA NA GESTAÇÃO : REVISÃO DE LITERATURA ETIOPATHOGENESIS AND DIAGNOSIS OF DEEP VENOUS THROMBOSIS IN PREGNANCY: A LITERATURE REVIEW. v. 5, n. 4, p. 51–55, 2018.
- PRYZDIAL, E. L. G. et al. Blood coagulation dissected. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 57, n. 4, p. 449–457, 2018.
- RATHNASAMY, S. K. et al. One-pot simultaneous production and sustainable purification of fibrinolytic protease from Bacillus cereus using natural deep eutectic solvents. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2020.
- RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: A review. **Bioengineering**, v. 3, n. 4, 2016.
- REINEHR, C. O. et al. Production of lipases with Aspergillus niger and Aspergillus fumigatus through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. . **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.
- REPETTO, O.; DE RE, V. Coagulation and fibrinolysis in gastric cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1404, n. 1, p. 27–48, 2017.
- RODRIGUES, E. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218–233, 2012.
- ROSA, A. M. et al. Alimentos fermentados à base de soja (Glycine max (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 454–462, 2009.
- RUIZ-RUIZ, F. et al. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. **Journal of Chromatography A**, v. 1244, p. 1–13, 2012.
- SALUNKE, A. S.; KHARAT, A. S. Data on isolation and purification of fibrinolytic enzyme from Pseudomonas baetica SUHU25. **Data in Brief**, v. 26, p. 104369, 2019.
- SARAIVA, N. C. Tratamento trombolítico do acidente vascular cerebral isquémico. p. 1–25, 2011.
- SBACV SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANGIOLOGIA E DE CIRURGIA VASCULAR. **Trombose Venosa Profunda Diagnóstico E Tratamento**. São Paulo: Projeto

Diretrizes SBACV, 2015. v. 28

SBC SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. **Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia**. Rio de Janeiro: Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2013. v. 101

SCHALCHLI, H. . et al. Production of ligninolytic enzymes and some diffusible antifungal compounds by white-rot fungi using potato solid wastes as the sole nutrient source. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2002.

SHARMA, C. et al. Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020.

SHARMA, C.; OSMOLOVSKIY, A.; SINGH, R. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: Production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, 2021.

SILVA, J. M. DA. **Produção de biomoléculas de interesse veterinário por *Streptomyces* spp.** [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52–57, 2013.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 323–332, 2016.

SILVA, P. E. DA C. E. et al. In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, n. January, p. 524–529, 2018.

SIMKHADA, J. R. et al. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 88–93, 2010.

SOCERJ - SOCIEDADE DE CARDIOLOGIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Manual de Prevenção Cardiovascular**. 1. ed. São Paulo: Planmark, 2017. v. 1

SRIVASTAVA, N. et al. Solid-state fermentation strategy for microbial metabolites production: An overview. In: GUPTA, V.; PANDEY, A. (Eds.). . **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Secondary Metabolites Biochemistry and Applications**. 1. ed. Amesterdã: Elsevier B.V., 2019. p. 345–354.

SUN, Z. et al. A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 346–354, 2016.

TANEJA, K. et al. Production, purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Serratia* sp. KG-2-1 using optimized media. **3 Biotech**, v. 7, n. 3, p. 1–15, 2017.

TEIXEIRA, A. G. et al. Emerging Biotechnology Applications of Aqueous Two-Phase Systems. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 6, p. 1–19, 2018.

TEN CATE, H.; HACKENG, T. M.; DE FRUTOS, P. G. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 7, p. 1265–1271, 2017.

TIAN, Z. et al. Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme, PSLTro01, from a medicinal animal *Porcellio scaber* Latreille. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 536–546, 2015.

TORRES-ACOSTA, M. A. et al. Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: Challenges and Opportunities. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2019.

UESUGI, Y. et al. Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 7–12, 2011.

VAZQUEZ-GARZA, E. et al. Venous thromboembolism: thrombosis, inflammation, and immunothrombosis for clinicians. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 44, n. 3, p. 377–385, 2017.

VERMA, M. K.; PULICHERLA, K. K. Broad substrate affinity and catalytic diversity of fibrinolytic enzyme from *Pheretima posthumous*—Purification and molecular characterization study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 1011–1021, 2017.

VERMA, P. et al. Fibrinolytic Protease from Marine *Streptomyces rubiginosus* VITPSS1. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 44–55, 2018.

VIJAYARAGHAVAN, P. et al. Cow dung is a novel feedstock for fibrinolytic enzyme production from newly isolated *Bacillus* sp. IND7 and its application in in vitro clot lysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. MAR, p. 1–14, 2016.

VIJAYARAGHAVAN, P. et al. Novel sequential screening and enhanced production of fibrinolytic enzyme by *Bacillus* sp. IND12 using response surface methodology in solid-state fermentation. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

VIJAYARAGHAVAN, P. et al. Enhanced production of fibrinolytic enzyme by a new *Xanthomonas oryzae* IND3 using low-cost culture medium by response surface methodology. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 217–224, 2019.

VIJAYARAGHAVAN, P.; PRAKASH VINCENT, S. G. Statistical optimization of fibrinolytic enzyme production using agroresidues by *Bacillus cereus* IND1 and its thrombolytic activity in vitro. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

VIJAYARAGHAVAN, P.; PRAKASH VINCENT, S. G. A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium, *Shewanella* sp. IND20. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 135–142, 2015.

WANG, S. et al. A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 18–25, 2011.

WANG, S. L.; WU, Y. Y.; LIANG, T. W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 196–202, 2011.

WANG, Y. et al. Proteomics and transcriptome analysis coupled with pharmacological test reveals the diversity of anti-thrombosis proteins from the medicinal insect, *Eupolyphaga sinensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 8, p. 537–544, 2012.

WARDLAW, J. M. et al. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 7, 2014.

WEISEL, J. W.; LITVINOV, R. I. **Fibrin formation, structure and properties**. 1. ed. New York: Springer, Cham, 2017.

YEON, S. J. et al. Purification of serine protease from polychaeta, *Lumbrineris nipponica*, and assessment of its fibrinolytic activity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 6, p. 494–501, 2017.

ZHANG, Y.; WANG, L.; CHEN, H. Correlations of medium physical properties and process performance in solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 165, p. 65–73, 2017.

APÊNDICE

PARTICIPAÇÃO EM CAPÍTULO DE LIVRO:

FERREIRA, JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS; CARDOSO, KETHYLEN BÁRBARA BARBOSA; SANTOS, AMANDA LUCENA DOS ; ALENCAR, **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA** ; NASCIMENTO, MARIA CLARA DO ; CUNHA, MARCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA ; BATISTA, JUANIZE MATIAS DA SILVA ; COSTA, ROMERO PEDROSA BRANDÃO ; NASCIMENTO, THIAGO PAJEÚ ; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO. PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus tamaritii* UCP 1279 ISOLADO DA CAATINGA UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS. Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia. 1ed.: Atena Editora, 2020, v. , p. 130-139. DOI: 10.22533/at.ed.747201711 ISBN: 978-65-5706-574-7

PARTICIPAÇÃO EM TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:

VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR; JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA; THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO; MARCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA; ANA CRISTINA LIMA LEITE. RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS: UMA ALTERNATIVA PROMISSORA E SUSTENTÁVEL NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR MICRORGANISMOS. In: I CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA - CIAGRO 2020 - Ciência, Tecnologia e Inovação: do campo à mesa, 2020. In: Anais I CIAGRO 2020, 2020. DOI: 10.31692/ICIAGRO.2020.0478

MARIA CLARA DO NASCIMENTO; **ALENCAR, V. N. S.**; BATISTA, J. M. S. ; NASCIMENTO, T. P. ; PORTO, A. L. F.. PRODUÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PELO GÊNERO *Streptomyces*: UMA BREVE REVISÃO SISTEMÁTICA. In: II Semana Científica do Agreste Pernambucano, 2020, Garanhuns. Anais 2020 - II Semana Científica do Agreste Pernambucano, 2020. v. 2. p. 2227-2230.

NASCIMENTO, M. C.; FERREIRA, J. V. S. ; **ALENCAR, V. N. S.** ; CUNHA, M. N. C. ; BATISTA, J. M. S. ; NASCIMENTO, T. P. PARTIÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Aspergillus tamaritii* ATRAVÉS DO SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/FOSFATO. In: V ENCONTRO PERNAMBUCANO DE MICOLOGIA, 2019, Recife. LIVRO DE RESUMOS DO V ENCONTRO PERNAMBUCANO DE MICOLOGIA. Recife: Editora Universitária UFPE, 2019. p. 179-181

PARTICIPAÇÃO EM RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:

VIVIANE ALENCAR, MARIA CLARA NASCIMENTO, JULYANNE SANTOS, JUANIZE BATISTA, MÁRCIA CUNHA, THIAGO NASCIMENTO, ANA LEITE, ANA PORTO. PRODUCTION AND PARTITIONING OF PROTEASE FROM *Aspergillus tamaritii* *kita* UCP 1279 USING TWO-PHASE SYSTEMS. In: Biopartitioning & Purification Conference, 2019, Guarujá – SP. Anais BPP 2019, 2019.

NASCIMENTO, M. C.; **ALENCAR, V. N. S.** ; CUNHA, M. N. C. ; CONNIFF, A. E. S. ; BATISTA, J. M. S. ; PORTO, A. L. F. ; NASCIMENTO, T. P. . SCREENING OF SUBSTRATES FOR PROTEASE PRODUCTION FROM *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió - AL. Anais 30º Congresso Brasileiro Microbiologia CBM 2019, 2019.

JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA, MARIA CLARA DO NASCIMENTO, **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR**, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO E JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES PRODUZIDAS POR *Aspergillus tamaritii* *kita* UCP 1279. In: I Simpósio de Proteínas Bioativas da UFPE, 2019, Recife – PE. Anais do I SIMPROT 2019, 2019.

MARIA CLARA DO NASCIMENTO, JULYANNE VICTÓRIA DOS SANTOS FERREIRA, **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR**, MARCIA NIEVES

CARNEIRO DA CUNHA; BATISTA, JUANIZE MATIAS DA SILVA, ANA CRISTINA LIMA LEITE, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO. PARTIÇÃO DE PROTASES POR SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO (PEG-FOSFATO) PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. In: II Curso de Inverno em Biociências, 2019, Recife – PE. Anais do II Curso de Inverno em Biociências, 2019, 2019.

M.C. do NASCIMENTO, **V.N.S. ALENCAR**, T.P. NASCIMENTO, J.M.S. BARBOSA, R.M.P.B. COSTA, A.C.L. LEITE, A.L.F. PORTO. PURIFICAÇÃO PARCIAL E INFLUÊNCIA DE ÍONS E AGENTES TENSOATIVOS SOBRE PROTEASES DE ORIGEM FÚNGICA. In: 6º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2020, Recife – PE. Anais do 6º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 6º EBIT 2020, 2020.

MARIA CLARA DO NASCIMENTO, **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR**, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO, JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. In: II Simpósio de Proteínas Bioativas da UFPE, 2020, Recife – PE. Anais do II SIMPROT 2020, 2020.

VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR, JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO, RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL, JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO E ANA CRISTINA LIMA LEITE. AVALIAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA QUANTO A INFLUÊNCIA SOBRE OS TEMPOS DE COAGULAÇÃO E ATIVIDADE HEMOLÍTICA. In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023. Recife- PE.

RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL, BRUNO VINÍCIUS BARROS REGUEIRA, JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO, **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR**, ANÍBIA VICENTE SILVA, JOSÉ DE PAULA OLIVEIRA, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO,

THIAGO PAJÉU NASCIMENTO e ANA CRISTINA LIMA LEITE. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA OBTIDA POR *Bacillus megaterium* ISOLADA DA CANA DE AÇÚCAR. In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023. Recife- PE.

JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO; RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL; **VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR**; MARLLYN MARQUES SILVA; JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA; GALBA MARIA CAMPOS-TAKAKI; ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO; ANA CRISTINA LIMA LEITE. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE UMA PROTEASE FIBRINOLÍTICA OBTIDA POR UM FUNGO ISOLADO DA CAATINGA. In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023. Recife- PE.