



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E BIOQUÍMICA DE UMA PROTEASE DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262 COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA

Recife, 2024

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E BIOQUÍMICA DE UMA PROTEASE DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262 COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde

Orientador (a): Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientador (a): Thiago Pajeú Nascimento

Recife 2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Cardoso, Kethylen Barbara Barbosa.

Caracterização biofísica e bioquímica de uma protease de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 com atividade fibrinolítica para aplicação farmacêutica / Kethylen Barbara Barbosa Cardoso. - Recife, 2024.

69f.: il.

Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2024.

Orientação: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientação: Thiago Pajeú Nascimento.

1. Protease; 2. Enzima; 3. Caracterização. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo. II. Nascimento, Thiago Pajeú. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central
570

CDD

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA E BIOQUÍMICA DE UMA PROTEASE DE *Mucor subtilissimus* UCP 1262 COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA PARA APLICAÇÃO FARMACÊUTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia aplicada à saúde.

Aprovada em: 29/07/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Pedrosa Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Daniela de Araújo Viana Marques (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^ª. Dr^ª. Juanize Matias da Silva Batista (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não teria sido possível sem o apoio de pessoas especiais que estiveram ao meu lado ao longo dessa jornada.

Aos meus pais Keila e Antônio, agradeço por toda dedicação e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse alcançar meus objetivos. A minha família como um todo, pelo suporte, sou imensamente grata. A Itallo Amorim, pela presença constante e pelo apoio inestimável desde o início. Sua presença foi fundamental para manter minha motivação e determinação.

À minha orientadora Ana Porto pela orientação exemplar, paciência e insights valiosos que moldaram este trabalho e ao coorientador Thiago Pajeú pelo suporte técnico e científico crucial para o desenvolvimento deste estudo. Ao mentor Romero Brandão pela atenção, dedicação e suporte durante todo o desenvolvimento do trabalho.

A todos os alunos, professores e técnicos do LABTECBIO e da Universidade Federal Rural de Pernambuco, meu muito obrigado, por tornarem esse ambiente de trabalho um lugar incrível que pude conviver no dia a dia, ao longo desses 10 anos. A Universidade Federal de Pernambuco, ao LIKA e a todos os professores, funcionários e estudantes do programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, também ao secretário Fábio Costa, por sempre se apresentarem atenciosos e prestativos. A Universidade de Pernambuco, aos alunos e professores do LIBAS, pelo acolhimento e pelos momentos de aprendizado e compartilhamento de café que tornaram este processo mais leve. Agradeço especialmente à Profa. Daniela Viana, Profa. Raquel Bezerra, Prof. Vagne Oliveira e aos colegas: Kétura Rahmmá, Maria Eduarda, Anna Gabrielly, Juanize Matias, Raphael Andrade, Maria Clara e Luiz Lino. À CAPES por todo o suporte financeiro durante todo o doutorado, ao CNPq pela concessão de verba para o desenvolvimento do projeto.

Aos meus amigos pelo apoio mútuo e pela paciência de sempre: Erica Dias, Beatriz Simone, Laura Ramos, Gabi Nascimento e Mari Barbosa, obrigada por compreenderem meus momentos e por toda força. Aos sobreviventes: Beatriz Francielle, Alex Nascimento, Wibson, Steffane e Hellen pela presença em momentos impossíveis. Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental nesta jornada acadêmica e pessoal. Obrigado por fazerem parte deste capítulo importante da minha vida.

RESUMO

No setor biomédico, as proteases fibrinolíticas atuam diretamente no coágulo de fibrina ou como ativadoras do fibrinogênio e são capazes de manter o fluxo sanguíneo. Fungos filamentosos, especialmente *Mucor subtilissimus*, destacam-se na produção de protease com atividade fibrinolítica, sendo vantajosos por seu fácil cultivo, resistência ao estresse e alto rendimento enzimático. Esta tese tem como objetivo a caracterização e aplicação de protease fibrinolítica produzidas por *Mucor subtilissimus*. O primeiro capítulo revisa narrativamente o uso de enzimas fibrinolíticas no tratamento da trombose. Descrevendo a importância da realização de estudos sobre doenças cardiovasculares, especialmente a trombose, as diversas abordagens utilizadas e as vantagens do uso de enzimas fibrinolíticas, bem como seus principais mecanismos de ação. O segundo capítulo revisa sistematicamente a produção de proteases fibrinolíticas por fungos, analisando a literatura recente sobre métodos de produção, purificação e caracterização. A pesquisa foi conduzida nas bases ScienceDirect, PubMed e Scopus, utilizando como palavras-chave “(Fibrinolytic enzyme) OR (Fibrinolytic protease) AND (Fungal or Fungus or Fungi)”, delimitando período de 10 anos. Os resultados obtidos foram filtrados por critérios de seleção, sendo excluídos artigos de revisão e artigos fora do escopo do trabalho, os selecionados foram avaliados e pontuados segundo critérios pré-estabelecidos. Dentre os 21 artigos selecionados foram descritos 12 gêneros diferentes e o uso de fermentação submersa e a purificação de Serino proteases foram mais descritos. O capítulo também enfatiza uma maior representação de etapas de purificação e caracterização, indicando a necessidade de atenção ao cultivo e aplicação enzimática. O segundo capítulo realiza caracterização da protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* (MsFE), avaliando suas propriedades físico-químicas, impacto da radiação gama na atividade e estrutura, e análise de atividade fibrinogenolítica. As investigações incluíram: atividade fibrinogenolítica, efeitos de solventes e íons, raios gama, vida útil da enzima, espectroscopia no infravermelho (FTIR), CD, determinação de tempos de coagulação e cinética enzimática. Os principais resultados obtidos mostram que a protease manteve 90% de atividade em solventes orgânicos, o FTIR indicou grupos funcionais carbonila, ligações C=C em anéis aromáticos, aminas e haletos orgânicos, estudos espectroscópicos de dicroísmo circular indicaram que a estrutura secundária (folha β) da enzima permaneceu principalmente inalterada em pH 2.0–9.0, enquanto mudanças consideráveis foram observadas na estrutura terciária. A análise cinética revelou parâmetros alterados após a irradiação, inicialmente aumentou a atividade da enzima, mas diminuiu progressivamente além de 20 kGy, e íons metálicos, especialmente magnésio, aumentaram a atividade da enzima irradiada. Esses achados ressaltam a importância da enzima como alternativa na formulação de biofarmacos a serem empregados na indústria farmacêutica e biomédica. Este estudo destaca o potencial da radiação gama como um modulador para aprimorar a atividade fibrinolítica, sugerindo futuras aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Protease, Atividade fibrinolítica, enzima, Mucor, Caracterização enzimática

ABSTRACT

In the biomedical field, fibrinolytic proteases act directly on the fibrin clot or as fibrinogen activators and are capable of maintaining blood flow. Filamentous fungi, especially *Mucor subtilissimus*, stand out in the production of protease with fibrinolytic activity, being advantageous due to their easy cultivation, resistance to stress and high enzymatic yield. This thesis aims to characterize and apply fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus*. The first chapter narratively reviews the use of fibrinolytic enzymes in the treatment of thrombosis. Describing the importance of conducting studies on cardiovascular diseases, especially thrombosis, the various approaches used and the advantages of using fibrinolytic enzymes, as well as their main mechanisms of action. The second chapter systematically reviews the production of fibrinolytic proteases by fungi, analyzing the recent literature on production, purification and characterization methods. The research was conducted in the ScienceDirect, PubMed and Scopus databases, using as keywords “(Fibrinolytic enzyme) OR (Fibrinolytic protease) AND (Fungal or Fungus or Fungi)”, delimiting a period of 10 years. The results obtained were filtered by selection criteria, excluding review articles and articles outside the scope of the work, the selected ones were evaluated and scored according to previously established criteria. Among the 21 selected articles, 12 different genera were described and the use of submerged fermentation and the purification of serine proteases were most described. The chapter also emphasizes a greater representation of purification and characterization steps, indicating the need for attention to cultivation and enzymatic application. The second chapter characterizes the fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* (MsFE), evaluating its physicochemical properties, impact of gamma radiation on activity and structure, and analysis of fibrinogenolytic activity. The investigations included: fibrinogenolytic activity, solvent and ion effects, gamma rays, enzyme lifetime, FTIR, CD, determination of clotting times and enzyme kinetics. The main results obtained show that the protease maintained 90% activity in organic solvents, FTIR indicated carbonyl functional groups, C=C bonds in aromatic rings, amines and organic halides, circular dichroism spectroscopic studies indicated that the secondary structure (β -sheet) of the enzyme remained mainly unchanged at pH 2.0–9.0, while considerable changes were observed in the tertiary structure. Kinetic analysis revealed altered parameters after irradiation, initially increasing the enzyme activity, but progressively decreasing beyond 20 kGy, and metal ions, especially magnesium, increased the activity of the irradiated enzyme. These findings highlight the importance of the enzyme as an alternative in the formulation of biopharmaceuticals to be used in the pharmaceutical and biomedical industry. This study highlights the potential of gamma radiation as a modulator to enhance fibrinolytic activity, suggesting future biomedical applications.

Keywords: Protease, Fibrinolytic activity, enzyme, Mucor, Enzymatic characterization.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
ALPF	Área de Lise da Placa de Fibrina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
ATR	Reflexão Total Atenuada
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CM	Carboxi-metil
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DC	Dicroísmo Circular
DEAE	Dietilaminoetil
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido Etilenoglicol-bis (β -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetracético
EFP	Protease Fibrinolítica de <i>Euphausia superba</i>
FS	Fermentação Submersa
FES	Fermentação em Estado Sólido
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
IFA	Insumo Farmacêutico Ativo
kGy	Quilogray
MsFE	Protease Fibrinolítica de <i>Mucor subtilissimus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMSF	Fluoreto de metilsulfonil benzotriazol
PT	Tempo de Protrombina
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SBTI	Inibidor de Tripsina de Soja
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TF	Fator Tecidual
TCA	Ácido Tricloroacético
TPCK	Clorometilcetona Feniltioestereofenil
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Óbitos por doenças cardiovasculares no período de 2012 a 2022.....	14
Figura 2 - Representação esquemática da ativação da coagulação a partir de uma lesão vascular, mostrando a ativação plaquetária, conversão de protrombina em trombina, e fibrinogênio em fibrina, formação da rede de fibrina estabilizando o coágulo e ação da plasmina na fibrinólise.....	16
Figura 3 - Diferentes tratamentos para trombose: convencionais vs. proteases fibrinolíticas de origem microbiana.....	19
Figura 4 - Fluxograma representando os principais parâmetros de controle utilizados em Fermentação submersa e Fermentação em estado sólido de fungos filamentosos.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Potenciais Fontes Biotecnológicas de Proteases fibrinolíticas.....	18
--	-----------

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 Epidemia Silenciosa: A Ascensão das Doenças Cardiovasculares e Trombose.....	13
3.2 Abordagens Terapêuticas Convencionais e Novas Fronteiras no Tratamento Contra a Trombose e na Manutenção da Hemostasia.....	15
3.3 Explorando o Potencial dos Fungos Filamentosos na Produção de Proteases Fibrinolíticas.....	19
3.4 Aplicações Biotecnológicas de <i>Mucor subtilissimus</i>	23
3.5 Caracterização Físico-Química de Proteases Fibrinolíticas.....	23
3.5.1 Espectroscopia de Fluorescência.....	25
3.5.2 Dicroísmo Circular.....	25
3.5.3 Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier.....	26
3.6 Radiação Ionizante como Agente Modulador de Proteases.....	26
3.7 Desenvolvimento de Biofármacos: Desafios e Oportunidades na Indústria Farmacêutica.....	27
REFERÊNCIAS.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Enzimas Fibrinolíticas Microbianas como Abordagem Promissora para Distúrbios Tromboembólicos.....	39
4.2 Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes.....	41
4.3 Role of gamma radiation as an agent modulator of <i>Mucor subtilissimus</i> UCP1262 Fibrinolytic Enzyme (MsFE).....	42
5 CONCLUSÕES DA TESE.....	43
APÊNDICES.....	44
Artigos com Autoria Principal Submetidos e/ou Publicados.....	44
Capítulos de Livro.....	45
Artigos Publicados com Participação Colaborativa.....	46
Depósito de Patentes.....	51
Capítulos de Livro com Participação Colaborativa.....	57
Outras Publicações e Atividades.....	60

1 INTRODUÇÃO

A formação de coágulos de fibrina é uma parte fundamental do sistema hemostático, mas a dissolução destes coágulos através da fibrinólise é igualmente importante. No entanto, o desequilíbrio causado por algumas condições médicas pode resultar em falhas na dissolução dos coágulos, interrompendo o fluxo sanguíneo e causando graves problemas de saúde, como trombose, infarto do miocárdio, AVC e outras doenças cardiovasculares. Essas doenças afetam milhões de pessoas em todo o mundo, responsáveis por 30% das mortes (OMS, 2017), e o custo de tratamento, especialmente para a trombose, é alto. A trombólise enzimática é uma das principais formas de tratamento de trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A utilização de enzimas fibrinolíticas é considerada segura e eficaz para dissolver coágulos sanguíneos em pacientes com estas condições (Gurevitch *et al.*, 2018) e vem sendo amplamente estudado obtendo-se resultados positivos em termos de dissolução de coágulos e preservação dos tecidos circundantes (Liu *et al.*, 2019). Por esse motivo, é extremamente importante desenvolver agentes fibrinolíticos eficazes, funcionais e de baixo custo (Lin *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2018). Sendo assim, a perspectiva do mercado de biofármacos para proteases fibrinolíticas é extremamente promissora, especialmente com a crescente incidência de doenças cardiovasculares.

Atualmente, anticoagulantes são a principal forma de tratamento da trombose, mas eles possuem altos custos de produção e efeitos colaterais perigosos, como sangramento adverso, desconforto gastrointestinal, lesão hepática, entre outros. A alternativa é o uso de agentes fibrinolíticos, como a uroquinase, estreptoquinase e t-PA, eles também apresentam riscos de sangramento adverso e curta meia-vida, além de serem obtidos de fontes restritas (Ali; Bavisetty, 2020). As proteases com ação fibrinolítica são uma solução promissora, pois são capazes de dissolver coágulos com sucesso e manter o fluxo sanguíneo. Elas podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo microrganismos como bactérias, leveduras, microalgas e fungos filamentosos (Hazare *et al.*, 2024). Além disso, quando produzidas através de fermentação de microrganismos, o custo de produção é relativamente menor e existem vantagens adicionais, como distribuição cosmopolita e facilidade de produção em larga escala (Chen *et al.*, 2016).

Os fungos filamentosos destacam-se dentre as alternativas na produção de enzimas fibrinolíticas, uma vez que produzem proteases de forma extracelular (Da Silva Santana *et al.*, 2022) mostrando-se excelentes produtores de proteases fibrinolíticas (Nascimento *et al.*, 2020). Entretanto para o seu uso, estas enzimas fibrinolíticas necessitam de um alto grau de pureza, especificidade para evitar reações imunológicas e serem estáveis em condições fisiológicas (Xin *et al.*, 2018). Para isso, a avaliação das propriedades físico-químicas é fundamental no desenvolvimento de novos biofármacos, permitindo a identificação das características específicas de cada molécula, como a estabilidade, o ponto de fusão, a solubilidade e a atividade enzimática. Além disso, permite a compreensão da influência dessas propriedades na eficácia e segurança do fármaco (Ali *et al.*, 2022).

Em relação às proteases fibrinolíticas, a avaliação dessas propriedades é ainda mais importante. Isso porque, para que essas enzimas sejam eficazes como terapia trombolítica, é necessário que mantenham sua atividade enzimática e estabilidade ao longo do tempo. Adicionalmente, a compreensão dessas propriedades permite otimizar a eficácia e segurança dessas terapias, contribuindo para o avanço da medicina e para o bem-estar da população (Sharma *et al.*, 2021). Sendo assim faz-se indispensável o desenvolvimento de um biofármaco seguro e eficaz a partir de protease fibrinolítica produzida por fungos filamentosos, atendendo às demandas do mercado farmacêutico global, tanto na área da saúde humana quanto animal.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Identificar as características biofísicas e bioquímicas de protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262.

2.2 ESPECÍFICOS

- Obter a protease fibrinolítica;
- Compreender os efeitos da albumina sérica na atividade enzimática;
- Analisar a influência de solventes orgânicos na atividade enzimática;
- Avaliar os tempos de protrombina (PT) e de tromboplastina parcialmente ativada (aPTT) da protease fibrinolítica;
- Estimar a estrutura física da enzima a partir de técnicas de Dicroísmo circular (DC) e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Realizar ensaios de estabilidade enzimática;
- Analisar o efeito modulador da radiação gama na protease fibrinolítica;
- Realizar uma revisão sistemática avaliando a perspectiva de produção de enzimas fibrinolíticas por microrganismos e tendências na literatura e mercado.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

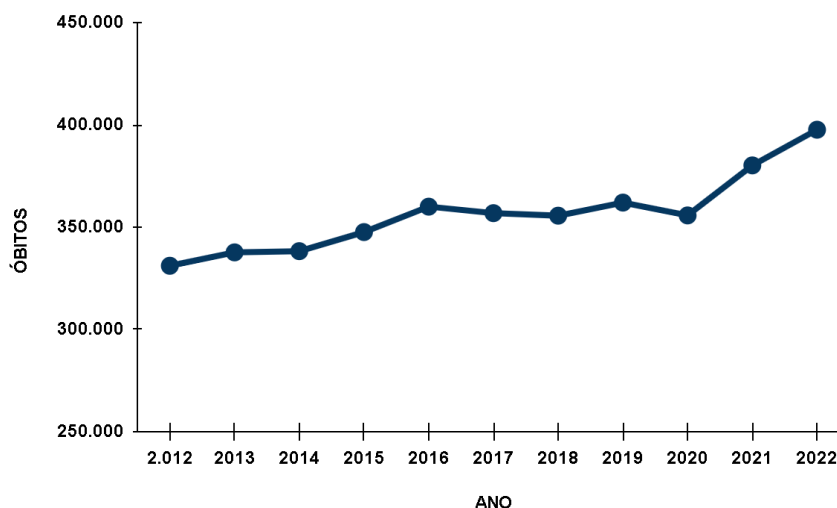
3.1 Epidemia Silenciosa: A Ascensão das Doenças Cardiovasculares e Trombose

Nos últimos anos, as doenças cardiovasculares e a trombose têm emergido como uma "epidemia silenciosa" globalmente preocupante. Se trata de uma série de condições que afetam o coração e os vasos sanguíneos, comprometendo uma carga significativa de saúde global com mais de 17 milhões de mortes anualmente (Blanco-Colio *et al.*, 2023). No entanto, é estimado que muitos casos dessas enfermidades permanecem não diagnosticados, ressaltando a urgência de uma melhor identificação, profilaxia e tratamento. Algumas doenças cardiovasculares comuns incluem a aterosclerose coronariana, que envolve o estreitamento ou bloqueio das artérias coronárias, causando dor no peito ou ataques cardíacos; hipertensão, também conhecida como pressão alta, que pode sobrecarregar o coração e os vasos sanguíneos; acidente vascular cerebral (AVC) que ocorre quando o fluxo sanguíneo para o cérebro é interrompido, causando danos cerebrais, além de insuficiência cardíaca, arritmias, trombose e doenças arteriais periféricas, cada uma com seu próprio conjunto de sintomas e complicações (De Sá *et al.*, 2023).

Diversos fatores podem influenciar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, esses fatores podem ser segmentados em modificáveis (como dietas não saudáveis, uso de tabaco e inatividade física), não modificáveis (como genética, idade e sexo) e ambientais (como poluição do ar, ambiente de trabalho e estresse) (Bovet *et al.*, 2023). Além disso, estudos afirmam que estas doenças afetam desproporcionalmente o estrato mais vulnerável da população, que tem grande dificuldade no acesso a cuidados de saúde de alta qualidade (Oliveira *et al.*, 2021). Assim, se trata de um problema de saúde pública mundial. Em países subdesenvolvidos de baixa e média renda, essas doenças podem ser responsáveis por até 80% dos óbitos (Vervoot *et al.*, 2022). Nos Estados Unidos da América, as doenças cardiovasculares também apresentam um índice significativo de óbitos, sendo que a cada três mortes, uma é causada por problemas cardiovasculares (Benjamin *et al.*, 2018). No Brasil a prevalência de doenças cardiovasculares aumentou cerca de 24% de 1990 até 2019 e são responsáveis por quase um terço das mortes registradas no país (Oliveira *et al.*, 2021). Segundo dados do DATASUS (2024), de 2012 a 2022 foram registradas cerca de 3.922.744 mortes atribuídas a algum tipo de doença cardiovascular, destas 46,75% ocorreram na região sudeste, 26,23% no nordeste, 15% no sul, 6,4% no Centro-Oeste e 5,2% no norte. Além dos fatores comuns, a pandemia de COVID-19 teve um impacto significativo no aumento dos casos de doenças cardiovasculares. A infecção pelo SARS-CoV-2 está associada a uma série de complicações cardíacas, como miocardite, arritmias e trombose venosa, que podem agravar condições preexistentes ou desencadear novas patologias cardiovasculares (Szypuła *et al.* 2024). Além disso, as medidas de isolamento social e a sobrecarga dos sistemas de saúde dificultaram o acesso a cuidados médicos regulares, levando a atrasos no diagnóstico e tratamento de doenças cardiovasculares (Song *et al.* 2024). Esses fatores contribuíram para o aumento da mortalidade cardiovascular durante a pandemia, especialmente entre os grupos mais vulneráveis e com menor acesso a serviços de saúde adequados.

Estes dados também corroboram com a noção de que as dimensões continentais do Brasil impulsionam a desigualdade de oferta de tratamento, o que torna ainda mais imperativo o desenvolvimento e validação de estratégias para o tratamento destes distúrbios (Lucas *et al.*, 2022). Na Figura 1 pode-se observar com mais detalhes os registros ao longo dos últimos anos relatados.

Figura 1. Óbitos por doenças cardiovasculares no período de 2012 a 2022.



Fonte: a autora, baseado em dados do DATASUS (2024)

Dentro destas, a trombose é uma das complicações mais graves e pode levar a infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) ou embolia pulmonar (De Sá *et al.*, 2023). A trombose pode ocorrer em qualquer parte do corpo, mas quando afeta o coração ou os vasos sanguíneos, pode levar a um infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (AVC) ou embolia pulmonar (Weyand, Shavit e Ginsburg, 2023). Se trata de uma condição médica na qual um coágulo de sangue se forma dentro de uma veia ou artéria. O coágulo de sangue pode obstruir o fluxo de sangue e interromper o suprimento de oxigênio para o tecido circundante, o que pode levar a danos graves ou até mesmo a morte. Fatores de risco para a trombose incluem idade avançada, imobilidade prolongada, histórico familiar de trombose, uso de anticoncepcionais orais e alguns tipos de cirurgia (Feller, Conell e Ariëns, 2021).

A manutenção da integridade vascular é crítica para todos os organismos superiores e requer um equilíbrio delicado entre pró e anticoagulantes para evitar trombose patológica ou hemorragia. A coagulação sanguínea é controlada por uma série de fatores proteicos, incluindo trombina, fibrinogênio e fibrina. Quando há danos na parede dos vasos sanguíneos, esses fatores se ativam e iniciam a coagulação. A trombina converte o fibrinogênio em fibrina, que é um material fibroso que forma uma rede para segurar os coágulos de sangue juntos (Camera *et al.*, 2021). Deficiências de hemostasia primária, como no caso do fator de von Willebrand e plaquetas, ou secundária, que ocorre na cascata de coagulação, podem levar a sangramentos anormais. Por outro lado, a deficiência de anticoagulantes naturais, como as proteínas C, S e antitrombina, predispõe à trombose. Além disso, distúrbios da fibrinólise, a cascata proteolítica que leva à dissolução dos coágulos de fibrina, também podem contribuir para a formação de trombose (Wang *et al.*, 2022). Entre esses distúrbios estão a deficiência de inibidores da fibrinólise, como o plasminogênio e o inibidor do ativador do plasminogênio, que podem aumentar a atividade fibrinolítica e levar à hiperfibrinólise, favorecendo o desenvolvimento de trombose. Em contrapartida, a diminuição da atividade fibrinolítica pode levar à resistência à fibrinólise e à trombose (Pyeritz, Korf e Grody, 2019). Esses fatos reforçam a necessidade de

medidas preventivas e de tratamentos eficazes para doenças cardiovasculares. Entre esses tratamentos, destacam-se os biofármacos à base de protease com ação fibrinolítica, que podem ser utilizados no tratamento de trombose

3.2 Abordagens Terapêuticas Convencionais e Novas Fronteiras no Tratamento Contra a Trombose e na Manutenção da Hemostasia

A trombose é um processo biológico em mamíferos que mantém a integridade da superfície, limita a perda de fluido e auxilia na destruição de patógenos, mas também pode causar oclusão vascular e danos aos tecidos. É caracterizada pela formação ou desenvolvimento de um coágulo sanguíneo (trombo) responsável por causar inflamação na parede do vaso (Lang *et al.*, 2014). Na manutenção da hemostasia, esse trombo desempenha importante papel, sendo um dos produtos temporários da cascata de coagulação.

A cascata de coagulação é dividida em formação de fibrina, função plaquetária, fibrinólise e anticoagulantes naturais (Wang *et al.*, 2021). O processo de formação de fibrina neste processo consiste em uma série de reações enzimáticas projetadas para amplificar o efeito do trauma inicial na formação de um tampão. O fibrinogênio é uma proteína plasmática solúvel sintetizada no fígado e composta por três pares de cadeias polipeptídicas: A α , B β e γ (Litnov *et al.*, 2021). Durante a lesão vascular, o sistema de coagulação é ativado, resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina, que é insolúvel e forma uma rede tridimensional que estabiliza o coágulo sanguíneo (Tanaka e Davie, 2008).

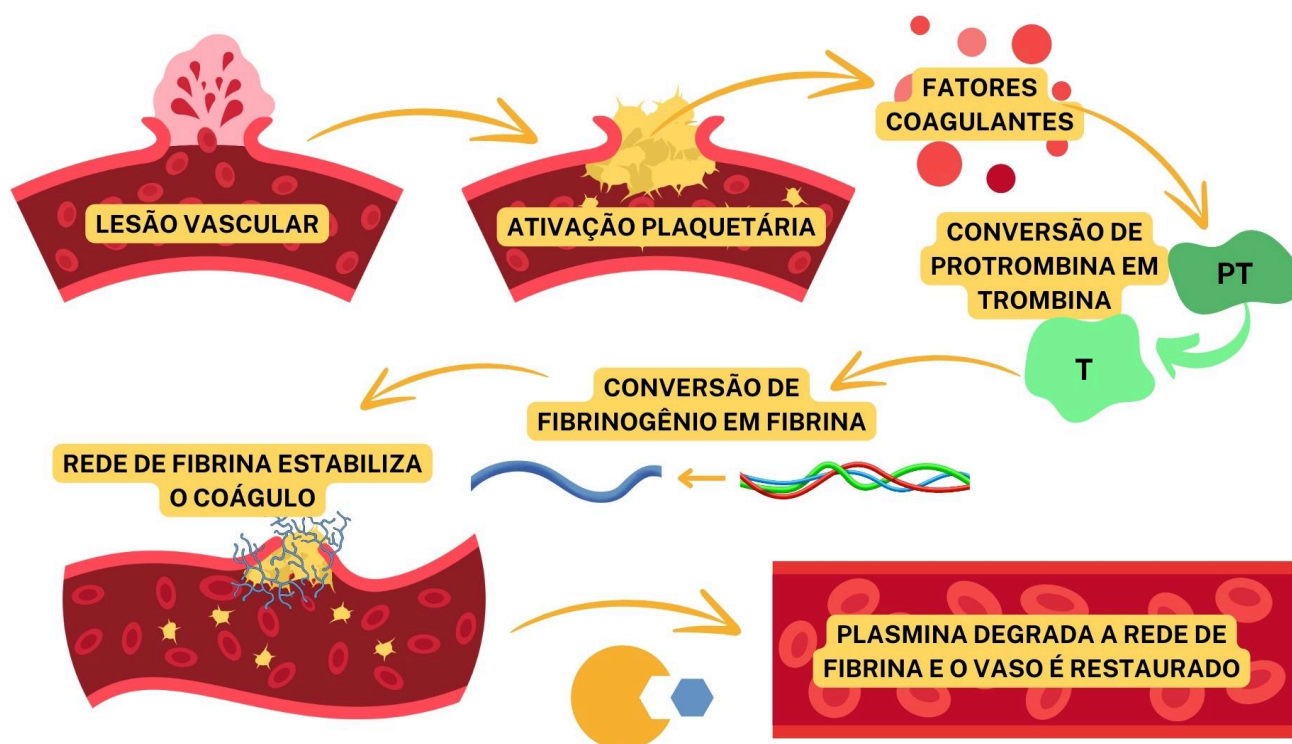
A conversão do fibrinogênio em fibrina é mediada pela enzima trombina, que é gerada a partir da clivagem proteolítica do precursor inativo pró-trombina pela enzima ativa tromboplastina. A trombina, por sua vez, cliva o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que se agregam espontaneamente em um polímero fibrilar (Tanaka e Davie, 2008). A polimerização da fibrina é facilitada pela presença do fator XIII da coagulação, que catalisa a formação de ligações cruzadas entre as moléculas de fibrina para formar um coágulo estável (Weisel *et al.*, 2017). A transformação do fibrinogênio em fibrina é um processo complexo que envolve a ativação de uma série de fatores de coagulação e a regulação cuidadosa da formação e degradação do coágulo sanguíneo (Mosesson, 2005; Anjun *et al.*, 2024). A compreensão desse processo é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para distúrbios hemorrágicos e trombóticos. Além disso, as plaquetas também têm um papel importante na amplificação da cascata de coagulação. Quando ocorre alguma lesão que exige a ativação da cascata de coagulação, as plaquetas são ativadas e se aglomeram para a formação de um tampão. Como possuem receptores para fatores de coagulação em sua superfície (fator de von Willebrand e o fator IX), elas facilitam a formação do coágulo (Tanaka e Davie, 2008).

A cascata de coagulação pode ser iniciada por duas vias principais: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é ativada pelo contato com superfícies negativas, como o colágeno exposto após uma lesão vascular, enquanto a via extrínseca é ativada pela exposição do sangue ao fator tecidual (TF) presente nas células extravasculares. Ambas as vias convergem na ativação do fator X, levando à formação de trombina e, conseqüentemente, à produção de fibrina (Chaudhry *et al.*, 2018).

Por outro lado, a fibrinólise é um processo que degrada o coágulo sanguíneo para permitir a recuperação do fluxo sanguíneo normal. A fibrinólise é mediada pela enzima

plasmina, que é gerada a partir do precursor inativo plasminogênio pela ativação pelo ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). A fibrinólise é iniciada quando o plasminogênio, uma proteína presente no plasma sanguíneo, é convertido em plasmina por meio da ação de ativadores de plasminogênio (Litnov *et al.*, 2021). Esses ativadores podem ser produzidos no local da lesão ou serem circulantes no sangue. Uma vez convertida em plasmina, essa enzima proteolítica é capaz de quebrar a rede de fibrina, promovendo a dissolução do coágulo sanguíneo. Além disso, a plasmina também é capaz de quebrar outros fatores de coagulação, como o fibrinogênio e os fatores V e VIII, inibindo ainda mais a formação de coágulos sanguíneos (DeLoughery, 2019). Um resumo simplificado do processo de coagulação para manutenção da integridade vascular pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da ativação da coagulação a partir de uma lesão vascular, mostrando a ativação plaquetária, conversão de protrombina em trombina, e fibrinogênio em fibrina, formação da rede de fibrina estabilizando o coágulo e ação da plasmina na fibrinólise.



Fonte: a autora (2024)

Ademais, existem vários anticoagulantes naturais no organismo humano que ajudam a regular a cascata de coagulação e prevenir a formação de coágulos sanguíneos indesejados ou o desenvolvimento de problemas mais graves. Entre esses anticoagulantes estão a Antitrombina III (AT III), que inibe a ação da trombina, a Proteína C e a Proteína S, que inativam os fatores V e VIII, diminuindo a formação de trombina, o Inibidor da Via do Contato, que inibe a ativação do fator XII, e a Heparina, que atua como um anticoagulante por meio da inibição direta da trombina e do fator Xa (Antovic e Blombäck, 2010; Wang *et al.*,

2023).

Dado que a cascata de coagulação é um evento complexo e dependente de várias etapas e fatores, diversos problemas podem surgir nesse processo, resultando em distúrbios hemorrágicos e trombóticos. Um exemplo de distúrbio hemorrágico é a hemofilia, que ocorre devido à deficiência de fatores de coagulação, resultando em sangramento excessivo (Camera *et al.*, 2021). Por outro lado, distúrbios trombóticos podem ocorrer devido à hipercoagulabilidade, uma condição na qual há uma maior tendência à formação de coágulos sanguíneos. Essa condição pode ser causada por fatores genéticos, como mutações no gene do fator V Leiden, ou adquiridos, como o uso prolongado de anticoncepcionais hormonais, imobilização prolongada, câncer, entre outros (Antovic e Blombäck, 2010; Paidas *et al.*, 2011; Raj *et al.*, 2021).

Distúrbios na manutenção da cascata de coagulação que levam a formação irregular do trombo pode levar a outros diagnósticos com maiores consequências, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Vários métodos foram propostos para tratar ou prevenir a trombose. Métodos diagnósticos tradicionais, como tromboelastograma, radiografia, tecnologia de tomografia computadorizada e raios-X, são comumente usados, além disso, novas tecnologias como a citometria de fluxo têm se mostrado promissoras em melhorar a precisão e a conveniência no diagnóstico de trombose (Wang *et al.*, 2023). Em relação ao tratamento, as opções incluem medicamentos trombolíticos, anticoagulantes e antiplaquetários, com pesquisas em andamento explorando novas composições terapêuticas (Mackmand *et al.*, 2020).

Um dos tratamentos mais frequentes para prevenir a trombose é o uso de antiagregantes plaquetários, como o ácido acetilsalicílico (aspirina). Este medicamento atua inibindo a agregação das plaquetas, impedindo a formação de coágulos sanguíneos. Apesar de sua eficácia na redução do risco de trombose, os antiagregantes plaquetários podem causar efeitos colaterais, incluindo dor abdominal e úlceras estomacais (Li *et al.*, 2020). Outra opção de tratamento é a trombólise, que envolve o uso de medicamentos para dissolver coágulos de sangue. A trombólise desempenha um papel crucial no tratamento de casos graves de trombose em diferentes populações de pacientes. Em casos neonatais, por exemplo, ativadores do plasminogênio tecidual têm sido utilizados com sucesso, enfatizando a importância da avaliação e vigilância cuidadosa do risco (Samji *et al.*, 2022). Da mesma forma, em adultos com COVID-19 e embolia pulmonar, o ativador de plasminogênio tecidual recombinante de baixa dose demonstrou eficácia em melhorar a oxigenação e reduzir os níveis de fibrinogênio, destacando os benefícios potenciais da terapia trombolítica (Aribawa *et al.*, 2022). Além disso, pode ser encarada como uma alternativa à cirurgia de emergência, especialmente em ambientes onde as condições cirúrgicas são limitadas, mostrando sua importância no tratamento da trombose. A trombólise é eficaz, mas também pode ter efeitos colaterais, como sangramento excessivo (Shi e Dowell, 2017).

Em casos graves de trombose, especialmente quando os pacientes apresentam isquemia periférica aguda ou embolia pulmonar de alto risco, a cirurgia pode ser necessária para o tratamento (Pasli *et al.*, 2022). A cirurgia é geralmente utilizada em casos em que o coágulo de sangue é grande ou em que a trombose é causada por uma anomalia física. No entanto, é crucial considerar que as intervenções cirúrgicas para trombose, incluindo trombectomia cirúrgica aberta, podem ser invasivas e levar a tempos de recuperação prolongados. Embora esses procedimentos tenham mostrado benefícios na restauração da permeabilidade venosa e na redução de complicações, eles também apresentam possíveis deficiências e riscos, exigindo

uma seleção cuidadosa dos pacientes e a consideração de opções alternativas de tratamento (Aghamiri *et al.*, 2022).

No âmbito farmacêutico, destacam-se biofármacos que funcionam como antagonistas do receptor da trombina (por exemplo, bivalirudina e argatroban), antagonistas da vitamina K (varfarina e acenocumarol), antagonistas do fator Xa (rivaroxabana, apixabana e edoxabana), anticoagulantes orais diretos (como dabigatrana, rivaroxabana e apixabana), heparina e ácido acetilsalicílico, que atua como antiagregante plaquetário (Intagliata, Caldwell e Tripodi, 2019). Como alternativa, as enzimas fibrinolíticas oferecem uma opção mais segura e eficaz do que a trombólise tradicional, com menos efeitos colaterais e menor risco de sangramento excessivo. As enzimas fibrinolíticas de origem microbiana são proteases que dissolvem coágulos sanguíneos de forma eficiente, sem apresentar efeitos colaterais significativos, restaurando o fluxo sanguíneo normal nos vasos. Essas enzimas atuam como ativadores do plasminogênio tecidual (tPA) ou ativadores do plasminogênio (PA) e são amplamente utilizadas na terapia trombolítica (Altaf *et al.*, 2021). Elas são classificadas em três gerações: a primeira geração possui menor especificidade pela fibrina e maior predisposição a complicações por sangramento; a segunda geração tem maior especificidade à fibrina e menor risco de sangramento; e a terceira geração combina alta seletividade à fibrina com uma meia-vida prolongada, permitindo tratamento com dose única e um tempo de depuração renal mais longo (Wu *et al.*, 2017; Diwan *et al.*, 2021).

As PA são serina proteases que convertem o plasminogênio inativo em plasmina ativa e promovem a lise da fibrina através de dois modos de ação: direto, em que a enzima age diretamente sobre o plasminogênio para catalisar sua ativação, e indireto, em que a enzima forma um complexo estequiométrico 1:1 com plasminogênio ou plasmina antes de ativar a molécula de plasminogênio circulante (Urano *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2014). Apesar de sua eficácia clínica, esses agentes podem causar efeitos colaterais indesejáveis, como imunogenicidade e sangramento gastrointestinal (Agrebi *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2017). Essas enzimas podem ser produzidas em larga escala de maneira rentável. Diversos microrganismos são capazes de produzir enzimas fibrinolíticas, tais como estreptoquinase, que pode ser produzida, por exemplo, por *Streptococcus hemolyticus* (Rafeeq *et al.*, 2022; Sahoo *et al.*, 2020), que age como ativador de plasminogênio de primeira geração e já é amplamente utilizada como parte da terapia trombolítica devido ao seu baixo custo em comparação com outros ativadores de plasminogênio de segunda e terceira geração (Adivitiya, 2017; Sahoo *et al.*, 2020), sendo recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e comercializada em diversos países.

Também podemos citar a nattokinase, enzima fibrinolítica extraída e purificada de uma soja fermentada japonesa por *Bacillus subtilis* var. natto (Li *et al.*, 2022), Fibrinase, produzida por *Bacillus sp.* (Thanh *et al.*, 2023), estafiloquinase (SAK, EC 3.4.99.22), um agente fibrinolítico de terceira geração produzido por *Staphylococcus aureus* sendo liberado extracelular, facilitando sua recuperação (Alzahrani & El-Shenawy, 2020). além de outras enzimas fibrinolíticas como a alteplase, que demonstrou ser mais rápida e eficaz que a estreptoquinase (Wang *et al.*, 2023), a tenecteplase que possui maior afinidade pelas fibrinas e maior resistência à inativação, possibilitando tratamentos de dose única (Kathirvel *et al.*, 2018), assim como a reteplase que possui meia-vida maior que as outras opções disponíveis (Nishanth *et al.*, 2019). Além disso, verificou-se que a uroquinase tem alta especificidade de fibrina e menos efeitos colaterais, tornando-a um potente agente fibrinolítico para o tratamento de complicações cardiovasculares (Nawaz *et al.*, 2020). Isso ocorre porque a uroquinase atua

tanto na conversão do plasminogênio em plasmina, quanto se ligando diretamente à fibrina, o que aumenta sua seletividade e diminui a probabilidade de efeitos colaterais (Raffeq *et al.*, 2022). Por outro lado, a estreptoquinase não possui essa afinidade pela fibrina, o que pode resultar em uma atividade fibrinolítica mais ampla e, consequentemente, um maior risco de sangramento (Huish *et al.*, 2017).

Apesar do que está disponível no mercado, há uma crescente busca por proteases fibrinolíticas produzidas por fontes alternativas, na Tabela 1 estão listados alguns dos estudos recentes relacionados a novas fontes de obtenção de proteases fibrinolíticas. Essa busca se deve à necessidade de se obter proteases mais específicas, com menor risco de efeitos colaterais e que sejam mais acessíveis economicamente (Cardoso *et al.*, 2022).

Tabela 1. Potenciais Fontes Microbiológicas de Proteases Fibrinolíticas

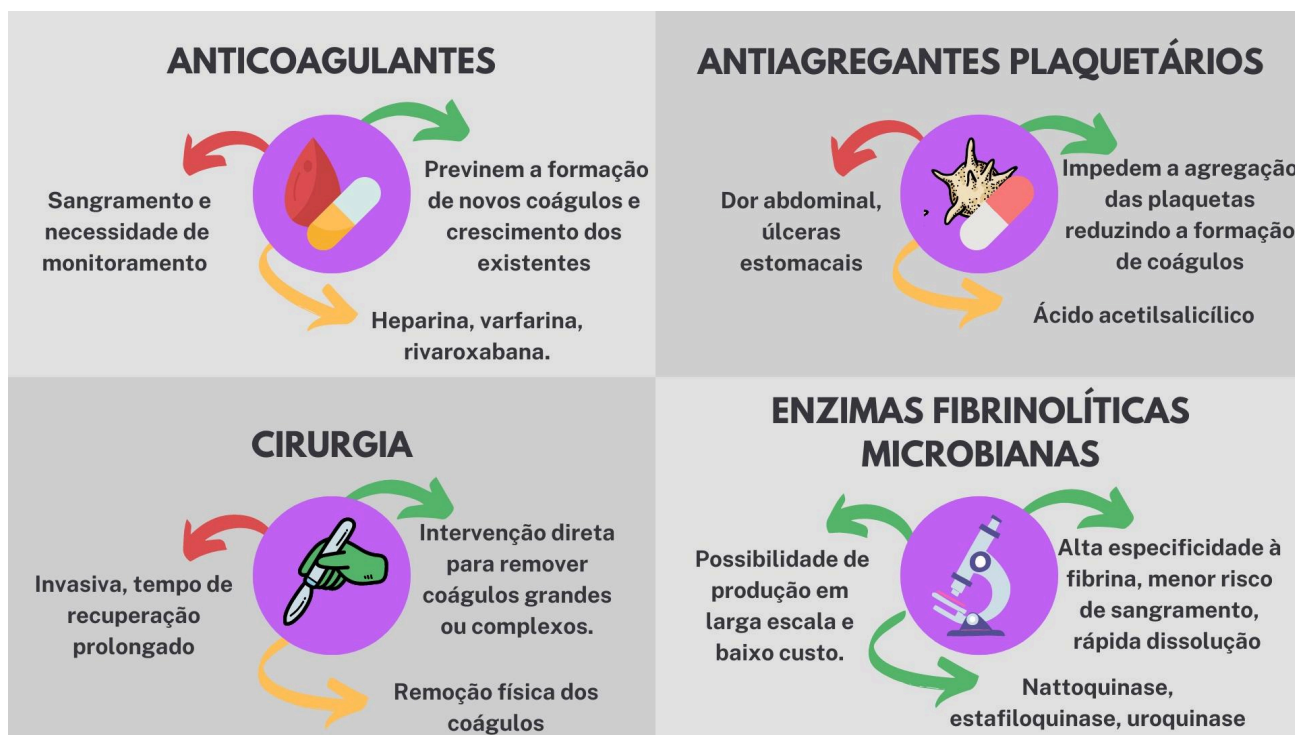
MICROORGANISMO	ESPÉCIE	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
BACTÉRIAS	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KJ10	3940 U/mL	Rajaselvam <i>et al.</i> (2021)
	<i>Bacillus pseudomycooides</i> MA02	79,83 U/mL	Chandramohan <i>et al.</i> (2019)
	<i>Paenibacillus graminis</i>	16,25 U/mL	Do Couto <i>et al.</i> (2022)
	<i>Acinetobacter johnsonii</i> TR01	8,30 U/mL	Umay, Gül e Tanyıldızı (2023)
	<i>Streptomyces fumanus</i> NBRC 13042T	1255,3 U/mL	He <i>et al.</i> (2023)
FUNGOS	<i>Penicillium steckii</i> KU1	454,49 U/mL	Kunhiraman <i>et al.</i> (2024)
	<i>Aspergillus aureolatus</i>	116,17 U/mL	Surkova <i>et al.</i> (2023)
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	226,47 U/mL	Santana <i>et al.</i> (2024)
	<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	26,1 U/mL	Nascimento <i>et al.</i> (2020)

Fonte: A autora (2024)

Estudos futuros devem focar na otimização das condições de produção e na purificação das proteases fibrinolíticas, além de explorar novas fontes e modificações genéticas que possam aumentar a especificidade e a eficácia destas enzimas. Além disso, o desenvolvimento de um biofármaco que possa atuar em ambas as vias intrínseca e extrínseca é de grande importância, pois garantiria uma resposta hemostática mais robusta e eficiente, além de minimizar os riscos associados a falhas em uma das vias, proporcionando uma abordagem terapêutica mais

abrangente e eficaz contra distúrbios hemorrágicos e trombóticos. A utilização de microrganismos promete ampliar as opções terapêuticas disponíveis, oferecendo tratamentos mais acessíveis e seguros para pacientes com doenças trombóticas. Na figura 3 está melhor elucidado as diferenças entre os possíveis tratamentos à trombose.

Figura 3. Diferentes tratamentos para trombose: convencionais vs. proteases fibrinolíticas de origem microbiana



Fonte: a autora (2024)

3.3 Explorando o Potencial dos Fungos Filamentosos na Produção de Proteases Fibrinolíticas

Entre os microrganismos que produzem protease, os fungos filamentosos são notáveis por sua capacidade de se desenvolver em substratos de baixo custo e reaproveitamento de matéria orgânica, além disso, a secreção extracelular da enzima traz benefícios ao simplificar o processo de extração e purificação, eliminando a necessidade de lise celular e diminuindo o número de etapas envolvidas na obtenção dessas biomoléculas, obtendo ponto de vantagem quando comparado a outros microrganismos como bactérias e algas. Essa característica aumenta a eficiência econômica do processo. (Agu *et al.*, 2023; Batista *et al.*, 2020).

A ruptura celular, além de introduzir mais etapas no processo, também adiciona complexidade ao aumentar a diversidade de moléculas contaminantes e a viscosidade do meio devido aos fragmentos de lise. Isso resulta em um custo final mais alto em comparação aos produtos extracelulares, pois requer mais operações durante a purificação (Pessoa-Jr *et al.*, 2020). Além disso, outros benefícios incluem a capacidade de se adaptar em várias condições ambientais, como pH e temperatura, bem como a variedade de substratos que podem servir como nutrientes (Raju *et al.*, 2022). Apesar das vantagens, levando em consideração a diversidade de fungos filamentosos encontrados na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente. Dentre os fungos filamentosos, deve-se procurar por espécies com distribuição

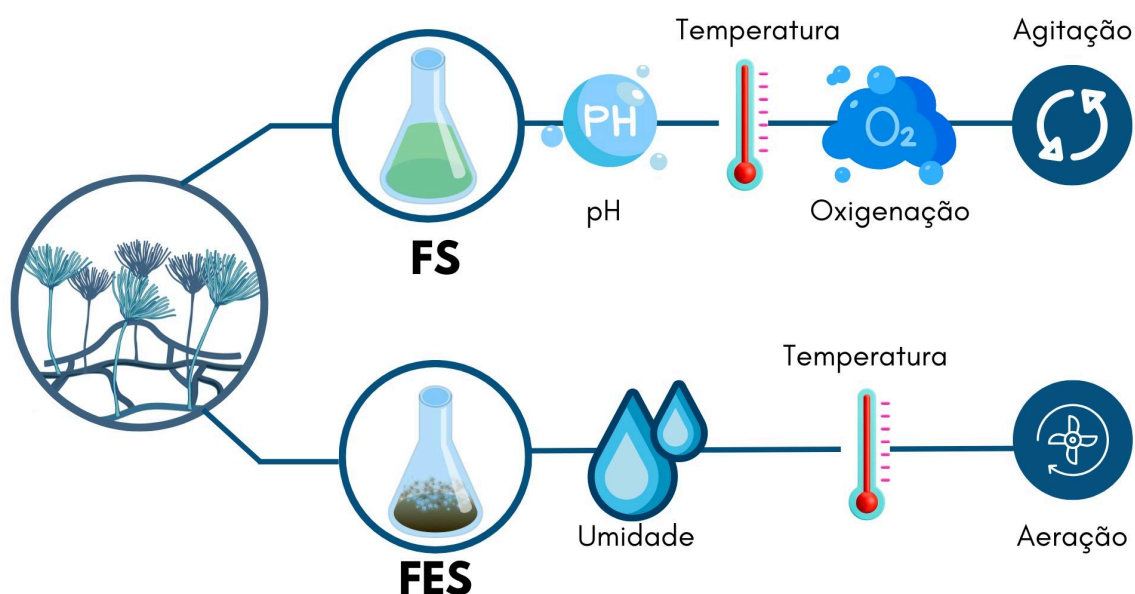
cosmopolita e capacidade de produzir uma diversidade de enzimas, podendo ser aplicado em mais um setor industrial. Alguns dos gêneros em destaque são *Penicillium*, *Aspergillus* e *Mucor*, conhecidos por sua produção de proteases com atividade colagenolítica e fibrinolítica (Wanderley *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2020)

Fungos Filamentosos se desenvolvem formando hifas, longos filamentos ramificados, constituindo uma rede conhecida como micélio (Ledoux *et al.*, 2023). Esta estrutura permite uma exploração eficiente do substrato e uma absorção eficaz de nutrientes (Peeters *et al.*, 2023). O ciclo de vida desses organismos é considerado complexo, envolvendo esporulação assexuada após o crescimento vegetativo e influenciado por fatores ambientais (Jung *et al.*, 2014). Durante a germinação, esses esporos desenvolvem novas hifas, reiniciando o ciclo de crescimento. Esta habilidade de formar esporos contribui para a resistência e adaptabilidade dos fungos filamentosos em diferentes ambientes. Além disso, sua capacidade de crescer em uma ampla gama de substratos, incluindo resíduos agrícolas e industriais, torna-os particularmente valiosos para processos de fermentação (Astudilo *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023).

Destarte, a aplicação desses microrganismos é extremamente influenciada pelo meio de cultivo. Em condições controladas, seja no laboratório ou na indústria, é fundamental monitorar e ajustar os parâmetros de controle durante a fermentação. Um dos primeiros parâmetros a serem definidos é quanto ao tipo de fermentação utilizada, a Fermentação Submersa (FS) utiliza um meio líquido no qual os microrganismos crescem em suspensão, comumente composto por solução de nutrientes dissolvidos em água, já a Fermentação em Estado Sólido (FES) utiliza substratos sólidos com pouca ou nenhuma água livre, onde os microrganismos crescem na superfície ou dentro das partículas do substrato (Ramesh *et al.*, 2022; Tiwari *et al.*, 2023).

Os parâmetros de controle na fermentação, seja submersa (FS) ou em estado sólido (FES), influenciam significativamente a obtenção de proteases. Na primeira, o controle preciso de pH, temperatura, oxigenação e agitação é essencial para otimizar a produção de enzimas (Figura 4), uma vez que a homogeneidade do meio líquido permite um controle mais rigoroso dessas condições, resultando em alta produtividade. Em contraste, a FES pode ser influenciada principalmente pela umidade, aeração e temperatura e apresenta vantagens pela possibilidade de utilização de substratos de baixo custo e resíduos agroindustriais, reduzindo os custos de produção (Tiwari *et al.*, 2023; Oiza *et al.*, 2022).

Figura 4. Fluxograma representando os principais parâmetros de controle utilizados em Fermentação submersa e Fermentação em estado sólido de fungos filamentosos.



Fonte: A autora (2024)

Portanto, os fungos filamentosos representam uma fonte valiosa de enzimas industriais, e a escolha dos parâmetros de fermentação são muito importantes e o controle adequado dos parâmetros de fermentação é crucial para maximizar a produção de proteases e outros metabólitos de interesse, aproveitando ao máximo o potencial biotecnológico desses microrganismos.

A produção de proteases fibrinolíticas, especificamente, desfruta das mesmas vantagens de fermentação desses microrganismos (Batista *et al.*, 2020; Martinez-Medina *et al.*, 2019) Nesse contexto, os fungos vêm sendo explorados para o desenvolvimento de enzimas fibrinolíticas, entretanto, apesar de haver uma tendência de utilização desses microrganismos, eles ainda podem ser mais explorados, principalmente levando em consideração a diversidade biológica e a possibilidade de alteração genética. Surpreendentemente, embora micromicetos estejam ganhando espaço na produção de enzimas, a obtenção de proteases fibrinolíticas de cogumelos está mais presente na literatura, com vários autores destacando sua eficiência e segurança, principalmente no uso de cogumelos comestíveis, estudados pela presença de bioativos naturais e utilizados na medicina popular como fitoterapia. Atualmente, estão disponíveis na literatura diversos extratos de cogumelos com atividades antioxidante, antitumoral, imunomoduladora, antifúngica, hipotensora e anticoagulante (Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2021). vantagens relacionadas à fermentação em várias condições ambientais, como pH, temperatura, luz e a variedade de substratos que podem ser usados como nutrientes (Haq *et al.*, 2004).

A produção de protease fibrinolítica é extremamente influenciada pela composição do meio de fermentação, principalmente fontes de carbono e nitrogênio e fatores físicos como

temperatura, pH, agitação, concentração de inóculo e tempo de fermentação. Cada organismo é capaz de atingir a produção máxima de enzimas em uma condição específica, portanto, a otimização dos componentes do meio e dos parâmetros de cultivo é essencial no processo biológico. Meshran *et al.* (2016) avaliam o efeito de diversas fontes de nitrogênio e carbono como substrato, tais como: farelo de arroz, farelo de trigo, casca de ovo, casca de laranja e casca de banana. Em contrapartida, Clementino *et al.* (2019) utilizou a técnica de fermentação extrativa para obter a enzima pré-purificada em uma única etapa, variando não apenas o meio de cultivo (farelo de trigo e farelo de soja), mas também a composição e concentração dos dois aquosos sistema de fases aplicado ao planejamento fatorial 2³. A otimização da composição do meio e das condições físicas são aplicadas para aumentar a produção de enzimas e é um parâmetro importante no desenvolvimento de um processo economicamente viável. Um dos principais fatores que devem ser levados em consideração na produção de proteases é o tipo de fermentação adotado. Atualmente, a técnica mais utilizada é a fermentação submersa (FS), com menor viscosidade e possibilidade de agitação e aeração (Castro *et al.*, 2011). Em contraste, a fermentação em estado sólido (FES) reduz a probabilidade de contaminação bacteriana e resulta em um extrato mais concentrado. A principal diferença entre os dois modelos de fermentação é a quantidade de água livre presente (Santos *et al.*, 2018). Cardoso *et al.*, (2022) destacam a falta de informações sobre os parâmetros fermentativos na literatura e como isso pode dificultar a introdução de fungos com grande potencial biotecnológico na indústria.

Enzimas fibrinolíticas são aplicadas na indústria farmacêutica, essa abordagem implica na necessidade de atingir um alto grau de pureza, por isso é comum o uso de mais de uma cromatografia em sequência, como filtração em gel, troca iônica, interação hidrofóbica ou afinidade. Outras técnicas ainda podem preceder o processo de purificação como precipitação de sais ou por solventes orgânicos, centrifugação e filtração. Essas estratégias são comumente referidas como etapas de pré-purificação, sinalizando o próprio processo de preparação para a purificação (Tang *et al.*, 2023).

Em relação às caracterizações presentes na literatura, em sua maior parte se dedicam a pH e temperatura ótimos, inibidores e massa molecular. O pH ótimo das enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos pode variar bastante, demonstrando uma ampla gama de enzimas capazes de se manterem em condições ácidas ou alcalinas. Em relação à temperatura ideal, vários trabalhos indicam atividade fibrinolítica mais pronunciada a 37°C (Abu-Tahon *et al.*, 2023), enquanto as enzimas de *Aspergillus carbonarius* exibiram atividade ideal a 45°C (Afini *et al.*, 2023). Além disso, as enzimas de *Mucor subtitillissimus* mostraram atividade ideal a 25°C (Nascimento *et al.*, 2020). Essas descobertas indicam que as enzimas fibrinolíticas fúngicas podem ter temperaturas ótimas variáveis para sua atividade, destacando a importância de compreender as características específicas das enzimas de diferentes espécies de fungos para otimizar suas aplicações potenciais na terapia trombolítica.

Informações sobre pH e temperatura ótimos são de extrema importância para o desenvolvimento de pesquisas básicas e de aplicação, estabelecendo as bases para o desenvolvimento de alternativas válidas para o tratamento da trombose, por isso é de extrema importância que em trabalhos de produção e caracterização de enzimas fibrinolíticas. Pesquisas mostraram que a enzima fibrinolítica produzida por *Cochliobolus hawaiiensis* exibiu atividade máxima em pH 7 (Abu-Tahon *et al.*, 2023), enquanto a enzima de *Aspergillus terreus* demonstrou atividade máxima em pH 8,0 (Osmolovskiy *et al.* 2018). Além disso, a enzima fibrinolítica variase de *Aspergillus versicolor* ZLH-1 exibiu sua maior atividade em pH 5,0 (Zhao *et al.*, 2022). Essas descobertas indicam que as enzimas fibrinolíticas derivadas de

fungos podem ter atividade ideal em faixas de pH levemente ácidas a neutras, com enzimas específicas mostrando preferências por diferentes níveis de pH.

A caracterização físico-química engloba fatores capazes de afetar o estado nativo da enzima, podendo inclusive levar à desnaturação e consequente perda total de atividade. Assim, a caracterização das enzimas produzidas, principalmente quando destinadas à indústria farmacêutica, é essencial (Sharma *et al.*, 2021). Dentre os fungos filamentosos, o *Mucor subitillissimus* tem se destacado como um produtor promissor destas enzimas (Nascimento *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado que as proteases produzidas por este fungo são capazes de dissolver coágulos sanguíneos de forma eficaz, além de possuírem outras propriedades interessantes, como estabilidade térmica e de pH. Uma das vantagens da utilização de proteases fibrinolíticas produzidas por fungos filamentosos é a possibilidade de se obter uma produção mais econômica e sustentável em relação às proteases sintéticas ou de origem animal, além de se evitar riscos de contaminação por agentes patogênicos. Assim, o *Mucor subitillissimus* é um exemplo promissor de produtor de proteases fibrinolíticas e pode representar uma alternativa interessante no tratamento da trombose. Entretanto, mais estudos são necessários para entender melhor as características dessa enzima, buscando uma futura aplicação no mercado (Nascimento *et al.*, 2017).

3.4 Aplicações Biotecnológicas de *Mucor subitillissimus*

A classe Mucorales é encontrada em todo o mundo e possui grande capacidade de dispersão. A maioria dos indivíduos pertencentes a este grupo tem como habitat o solo e resíduos orgânicos de animais, especialmente de herbívoros e roedores, com função decompositora. Alguns membros desse táxon são comumente encontrados em frutas em decomposição e alimentos armazenados (Nicolás *et al.*, 2020), enquanto outros têm a habilidade de agir como parasitas em animais e plantas (Trufem *et al.*, 2006; Santiago e Souza-Motta, 2008). Embora a maioria dos indivíduos seja terrestre, alguns apresentam relação com ambientes aquáticos e seus hospedeiros (Tahiri *et al.*, 2023).

Os representantes da classe Mucorales possuem hifas cenocíticas, embora seja possível visualizar septos que delimitam as estruturas reprodutivas em alguns indivíduos (Sepúlveda *et al.*, 2023; Walter *et al.*, 2019). O micélio dos membros da classe Mucorales possui aspecto cotonoso, com coloração que varia de acordo com a espécie, temperatura do ambiente e tempo de vida da colônia (Sokołowska *et al.*, 2023). Muitos indivíduos dessa classe são conhecidos por produzirem enzimas, tais como amilases, pectinases e inulinases, bem como ácidos orgânicos lático e fumárico (Dhevagi *et al.*, 2021), metabólitos de grande importância industrial utilizados na produção de alimentos fermentados, principalmente em países asiáticos. Além disso, esses metabólitos são amplamente utilizados nas indústrias farmacêutica, cosmética e têxtil (Puntambekar *et al.*, 2023).

O fungo *Mucor subitillissimus* é um representante da ordem Mucorales e é encontrado em diversas partes do mundo, especialmente em regiões de clima tropical e subtropical. Assim como outros membros desta ordem, este fungo é um decompositor, frequentemente encontrado no solo e em excremento de animais. Estudos recentes têm demonstrado que *M. subitillissimus* é capaz de produzir compostos com potencial aplicação em diversas áreas, incluindo a indústria farmacêutica e alimentícia (Nascimento *et al.* 2020). Além disso, alguns estudos sugerem que este fungo pode ser utilizado como um agente de biocontrole de patógenos de plantas. A compreensão das características bioquímicas e fisiológicas de *M.*

subtilissimus tem grande importância para o desenvolvimento de novas aplicações industriais e agrícolas, bem como para a compreensão da diversidade ecológica da ordem Mucorales.

Nascimento *et al.* (2016) destacam que *M. subtilissimus* UCP 1262 foi capaz de produzir proteases fibrinolíticas eficientes comparadas a outras no mercado, apresentando características similares a quimotripsina, tendo temperatura ótima de atividade enzimática a 37°C. Esta protease fibrinolítica foi capaz de manter sua atividade após imobilização em nanopartículas magnéticas (MNPs/FP) indicando que pode ser usada como uma estratégia alternativa para aplicação como liberação direcionada no tratamento de doenças cardiovasculares (da Silva *et al.*, 2022).

Mucor subtilissimus UCP 1262 também apresentou capacidade de produzir protease colagenolítica (Souza *et al.*, 2022), tanto sob condições de fermentação submersa utilizando meio de cultura MS-2 composto por soja, quanto fermentação em estado sólido utilizando farelo de soja como substrato, alcançando até 362,66 U/mL. Esses resultados demonstram a diversidade de aplicações que podem ser alcançadas pela exploração deste microrganismo e garantem sua contínua utilização em pesquisas e processos industriais.

3.5 Caracterização Físico-Química de Proteases Fibrinolíticas

O estudo de proteases fibrinolíticas para possíveis aplicações farmacêuticas e biomédicas deve ser conduzido de acordo com os critérios e normas estabelecidas pela ANVISA. É essencial obter dados detalhados sobre a identificação dos compostos, especialmente do princípio ativo, a fim de compreender sua estrutura, atividade e mecanismo de ação. Além disso, é crucial avaliar a qualidade do princípio ativo, incluindo sua pureza, atividade, estabilidade e especificidade (Liu *et al.* 2022). No desenvolvimento terapêutico, é necessário verificar a eficiência e segurança do princípio ativo antes de sua utilização em ensaios clínicos. Por fim, a otimização do processo de produção deve incluir a identificação das condições ideais de produção e a maximização do rendimento do bioativo (Alhazmi e Albrattiy, 2023).

As proteases fibrinolíticas possuem grande potencial como biofármacos, mas a produção e comercialização desses medicamentos dependem fortemente de sua caracterização detalhada. Esse processo identifica os fatores que determinam a viabilidade do uso do medicamento, bem como as condições específicas para sua manutenção e manejo. É fundamental compreender a estrutura, atividade, qualidade e segurança das proteases fibrinolíticas para desenvolver novos tratamentos. Para isso, a ANVISA, através do compêndio oficial, Farmacopeia Brasileira, estabelece os testes específicos que devem ser realizados em ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs) e produtos acabados para garantir a obtenção de parâmetros de qualidade mínimos (Brasil, 2010). Além disso, outros testes de caracterização não oficiais também podem ser realizados para obter informações físico-químicas relevantes no desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Diversas atividades de caracterização físico-química são realizadas para caracterizar um biofármaco composto por protease com ação fibrinolítica. A determinação da atividade enzimática, por exemplo, mede a capacidade da protease de degradar fibrina, avaliando, consequentemente, sua eficiência na dissolução de coágulos (Sharma *et al.* 2021). Análises químicas são essenciais para compreender as propriedades e comportamentos da protease sob diferentes condições. Técnicas amplamente utilizadas

incluem a determinação do pH e da temperatura ótimos, que identificam as condições em que a protease apresenta maior atividade. A influência de íons metálicos também é um aspecto crucial, onde a atividade enzimática é testada na presença de diversos íons, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} , para identificar quais íons podem ativar ou inibir a protease (Singh *et al.* 2021). A influência de inibidores de proteases é investigada para determinar substâncias que podem regular ou inibir a atividade enzimática. Além disso, a determinação das constantes cinéticas (K_m e V_{max}) é realizada para avaliar a eficiência catalítica da protease. Adicionalmente, a estabilidade da protease em diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de íons é estudada ao longo do tempo, garantindo que a protease mantenha sua funcionalidade em diversas condições ambientais (Pham *et al.*, 2024). Essas caracterizações abrangentes fornecem uma visão detalhada das propriedades bioquímicas das proteases fibrinolíticas, assegurando seu uso seguro e eficaz como biofármacos.

Os aspectos físicos da protease são analisados a partir de técnicas como espectrometria de massa, utilizada para determinar a massa molecular e sua estrutura primária. Já a espectroscopia de infravermelho permite a avaliação das ligações químicas e da conformação tridimensional da protease, ajudando a identificar grupos funcionais presentes na molécula e a avaliar sua estrutura secundária (Sun *et al.*, 2023). A análise térmica, como a calorimetria diferencial de varredura (DSC), é empregada para determinar a estabilidade térmica da protease, medindo a quantidade de calor necessária para desestabilizar sua estrutura (Di Matter *et al.*, 2023). Isso fornece informações valiosas sobre a temperatura de desnaturação e a estabilidade da enzima em diferentes condições térmicas. A difração de raios X é usada para obter detalhes sobre a estrutura tridimensional da protease em nível atômico, fornecendo informações precisas sobre a organização espacial dos átomos na molécula (Xin Xiong *et al.*, 2018). Complementando essa análise, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de força atômica (MFA) permitem a visualização da morfologia e da topografia da protease em alta resolução, proporcionando imagens detalhadas da superfície da enzima e suas interações com outras biomoléculas (Abdul-Rahim *et al.*, 2022). Todas essas técnicas, quando combinadas, fornecem uma compreensão abrangente das propriedades estruturais e funcionais das proteases fibrinolíticas, sendo crucial para assegurar a qualidade, pureza e eficácia dessas enzimas como biofármacos, permitindo seu uso seguro e eficiente em aplicações terapêuticas (Alhazmi e Albrattiy, 2023).

3.5.1 Espectroscopia de Fluorescência

A Espectroscopia de fluorescência de estado estacionário é uma técnica amplamente utilizada na caracterização de proteases, sendo utilizada para investigar a estrutura e a dinâmica dessas moléculas, incluindo a conformação da proteína, a interação com substratos e inibidores, a cinética enzimática e as mudanças conformacionais induzidas por fatores ambientais, sendo então de extrema importância para a caracterização de possíveis biofármacos (Shanker e Bane, 2008; Sultangaziyev e Bukasov, 2020).

Esta técnica é baseada na medida da emissão de fluorescência de um substrato após a excitação com luz ultravioleta (UV) ou visível. Por exemplo, caso a proteína tenha resíduos de triptofano e tirosina, que são cromóforos naturais (parte da molécula que

absorve luz em uma determinada faixa de comprimento de onda e normalmente representa a da substância) altamente fluorescentes, serão facilmente identificados (Kumai, Tamar e Mishra, 2017). A fluorescência emitida pela amostra é medida em um comprimento de onda determinado, uma vez que o cromóforo absorve energia na forma de luz na região de comprimento de onda de excitação, e em seguida, emite essa energia na forma de luz fluorescente em um comprimento de onda mais longo. Essa fluorescência é sensível às mudanças na estrutura e no microambiente da proteína, o que permite investigar as mudanças conformacionais induzidas por fatores como temperatura, pH, pressão e radiação. Além da interação de determinada enzima com substratos e inibidores caso ocorra mudança na estrutura ou no microambiente da proteína e da cinética enzimática (Kumai, Tamar e Mishra, 2017; Sultangaziyev e Bukasov, 2020). Pesquisas como a de Qian *et al.* (2020) demonstraram que as medições dos espectros de fluorescência revelaram alterações significativas na estrutura terciária da protease fibrinolítica de *Euphausia superba* (EFP) após a modificação do resíduo de serina, indicando a flexibilidade da enzima e o principal envolvimento do resíduo catalítico, dados como esses são importantes ao considerar a aplicação enzimática.

3.5.2. Dicroísmo Circular

A estrutura das proteases fibrinolíticas pode afetar sua atividade e estabilidade, logo é preciso entender suas características estruturais antes de sua aplicação industrial. Uma das técnicas comumente utilizadas para caracterização estrutural de enzimas e/ou biofármacos é o dicroísmo circular, uma técnica espectroscópica que mede a diferença na absorção de radiação circularmente polarizada pelos componentes opticamente ativos, como proteínas e assim fornece informações como a quantidade de hélices alfa, folhas beta e estruturas desordenadas presentes na proteína (Kwit *et al.*, 2012). É uma técnica amplamente utilizada em estudos de bioquímica e biologia molecular, fornecendo informações valiosas sobre a estrutura e função de proteínas e ácidos nucleicos, além de ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de novos medicamentos (Souza *et al.*, 2021).

Além disso, o dicroísmo circular pode ser usado para monitorar a estabilidade da molécula em diferentes condições, como mudanças de pH, temperatura ou presença de agentes desnaturantes. Uma mudança na estrutura secundária de uma proteína, por exemplo, em resposta a essas condições pode indicar uma alteração na estabilidade e, conseqüentemente, na atividade fibrinolítica da enzima (Woody, 1968). A técnica se baseia no fato de que as moléculas quirais, ou seja, que possuem uma assimetria em sua estrutura, ou seja não podendo ter sua imagem especular superposta, interagem de maneira diferencial com a luz polarizada, resultando em uma diferença de absorção da luz polarizada em relação à não polarizada. Sistemas que apresentam capacidade rotacional nula não aparecem no dicroísmo circular. A comparação entre uma molécula quiral e sua imagem especular revela que ambas apresentam as mesmas propriedades físicas escalares, tais como a massa molecular, entalpia de formação e densidade, sendo sua diferenciação possível apenas por meio da interação com luz circularmente polarizada (Nelson; Cox, 2004; Wallace; Janes, 2009; Fasman, 1996). A técnica é altamente sensível e pode detectar alterações na estrutura de uma molécula, como mudanças em sua conformação, interação com outras moléculas ou efeitos de mutação (Woody, 1996).

A quiralidade é uma característica fundamental encontrada em diversas moléculas

biológicas (Kwit *et al.*, 2012). Entre elas, as proteínas se destacam pela extensa utilização da técnica de dicroísmo circular para investigar sua estrutura quiral (Kelly *et al.*, 2005).

3.5.3. Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier

A Espectroscopia Infravermelha por Transformada de Fourier (FTIR) desempenha um papel crucial na caracterização de proteases, proporcionando informações detalhadas sobre suas estruturas moleculares e propriedades funcionais. Esta técnica analítica permite a análise das interações moleculares das proteases através da absorção de radiação infravermelha por ligações químicas específicas presentes na molécula. Na prática, a FTIR utiliza um feixe de radiação infravermelha que é absorvido pela amostra em diferentes frequências, correspondentes às vibrações das ligações químicas presentes na protease. As características espectrais obtidas permitem identificar grupos funcionais, como carbonilas, aminas, e hidroxilas, presentes na estrutura da protease. Essa análise é fundamental para determinar a composição química da enzima e para elucidar sua estrutura secundária e terciária. Além da composição química, a FTIR pode ser utilizada para estudar mudanças conformacionais na protease induzidas por variações de pH, temperatura, e concentrações de solução. Essas informações são cruciais para compreender como diferentes condições ambientais afetam a estrutura e a atividade catalítica da enzima. Por exemplo, variações na intensidade e na posição dos picos espectrais podem indicar alterações na estrutura química da protease, fornecendo insights valiosos sobre sua estabilidade e funcionalidade em condições específicas.

A aplicação dessa técnica permite não apenas a identificação precisa de grupos funcionais e estruturas moleculares, mas também a avaliação das respostas da protease a diferentes condições experimentais, contribuindo significativamente para o avanço no desenvolvimento de biofármacos e terapias enzimáticas. Essa técnica vem mostrando grande potencial no monitoramento de reações proteolíticas e processos de hidrólise enzimática em proteínas e peptídeos (Kristoffersen *et al.*, 2020).

3.6 Radiação Ionizante como Agente Modulador de Proteases

A radiação gama é um tipo de radiação ionizante que consiste em ondas eletromagnéticas de alta energia e frequência, produzidas pelo núcleo de átomos instáveis, sendo capaz de penetrar na matéria com alta energia e ionizar átomos e moléculas presentes, ou seja, remover um ou mais elétrons dos átomos ou moléculas, criando íons eletricamente carregados (Antebi *et al.*, 2016; Sedaghat *et al.*, 2022).

Na medicina, a radiação gama é utilizada principalmente para esterilizar materiais médicos e farmacêuticos devido à sua eficácia na eliminação de microrganismos patogênicos, sem comprometer as propriedades dos materiais. Esta técnica também é fundamental na produção de radioisótopos usados em diagnósticos por imagem e terapias de tratamento de doenças como o câncer. Além disso, a irradiação gama é utilizada na indústria farmacêutica para esterilizar ingredientes farmacêuticos ativos, garantindo a esterilidade ao quebrar as ligações químicas nos micróbios e inibir a divisão celular, aumentando a segurança do produto (Zahid *et al.*, 2022), esse método é preferido para esterilização terminal pelas autoridades reguladoras, especialmente para produtos farmacêuticos termolábeis, pois esteriliza os produtos em seus recipientes finais (Jacobs *et*

al., 2022).

No campo da pesquisa científica, a radiação gama é empregada na modificação de proteínas e outros compostos para fins terapêuticos. A exposição a doses controladas de radiação pode induzir mudanças significativas na estrutura e nas propriedades das proteínas. Por exemplo, pode ocorrer a quebra das ligações peptídicas ou modificações químicas como a oxidação de aminoácidos, influenciando diretamente na atividade e especificidade das enzimas (Montero-Lomeli e Rumjanek, 2013). Estudos como o de Kumari *et al.* (2020) destacam que a irradiação de sementes de soja com até 5 KGy pode resultar em alterações físico-químicas que aumentam o potencial antioxidante das proteínas, além de melhorar a solubilidade e reduzir a turbidez.

Essas modificações não apenas podem desnaturar ou neutralizar a protease, mas também têm o potencial de induzir mutações que aumentam sua atividade enzimática ou melhoram a estabilidade tridimensional da estrutura proteica. A proteína modificada pode se tornar mais resistente a condições extremas como pH extremo, temperatura elevada e agentes desnaturantes, ampliando suas aplicações práticas (Avhad e Rathod, 2014; Hårdig, Persson e Olsson, 2006). No entanto, é crucial realizar testes rigorosos após a irradiação para avaliar a atividade enzimática, estabilidade e especificidade da protease modificada. Estes testes podem incluir análises espectrométricas, determinações de atividade enzimática, estudos de estabilidade térmica e de pH, entre outros métodos analíticos (Costa *et al.*, 2017). O uso da radiação ionizante como ferramenta para a modificação de proteases para aplicações específicas requer precisão e cautela para garantir que os efeitos sejam benéficos e não prejudiciais (Jian *et al.*, 2010).

3.7 Desenvolvimento de Biofármacos: Desafios e Oportunidades na Indústria Farmacêutica

O desenvolvimento de biofármacos representa uma área dinâmica e promissora na indústria farmacêutica contemporânea, impulsionada pela crescente demanda por terapias mais eficazes e personalizadas. Esses medicamentos, derivados de fontes biológicas, oferecem vantagens significativas em termos de especificidade, eficácia e segurança em comparação com os fármacos tradicionais.

A identificação e o desenvolvimento de agentes terapêuticos para combater distúrbios humanos têm sido o foco principal da pesquisa há décadas (Nash, 2017). Avanços recentes em biotecnologia ampliaram o potencial de enzimas como biofármacos devido a vantagens como alta especificidade, afinidade de substrato, catálise eficiente com toxicidade reduzida e efeitos colaterais mínimos. A catálise enzimática permite a conversão de múltiplos alvos, incluindo pró-fármacos, simultaneamente nos produtos desejados, permitindo a administração de quantidades menores de terapêuticos (Yari *et al.*, 2017). Medicamentos biológicos são facilmente produzidos a partir de seres vivos e podem incluir hormônios como a insulina e a eritropoietina, hemoderivados, fatores de coagulação e anticoagulantes recombinantes, fatores de crescimento hematopoiético, enzimas, citocinas como o interferon e as interleucinas, medicamentos imunológicos variados como soros e vacinas recombinantes, anticorpos monoclonais, proteínas recombinantes e terapêuticas de base celular (Sekhon, 2010).

Atualmente, os medicamentos biológicos se destacam como uma classe relevante na indústria farmacêutica, sendo uma das maiores fontes de inovação. Com o vencimento

das patentes desses medicamentos, surgem oportunidades importantes para aquisição de novas competências e incorporação de biotecnologias no desenvolvimento de produtos farmacêuticos. Dessa forma, busca-se por alternativas mais econômicas e eficientes aos medicamentos biológicos existentes na indústria (Privato, Martinez e Schmidt, 2020).

Em geral, a legislação sobre a produção e composição de biofármacos visa garantir que esses medicamentos sejam seguros, eficazes e produzidos de acordo com padrões elevados de qualidade. As normas internacionais para a produção e controle de qualidade de medicamentos biológicos são estabelecidas pelo Conselho Internacional para Harmonização de Diretrizes para Medicamentos (ICH), que é uma organização global formada por reguladores e indústrias farmacêuticas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária é responsável pela supervisão da produção e regulamentação de medicamentos biológicos, incluindo proteases fibrinolíticas, regulamentando e monitorando a produção e comercialização desses insumos. A ANVISA, também normatiza a produção e fornece controle de qualidade pela Farmacopeia Brasileira, nas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) nº 55, de 16 de dezembro de 2010 e a nº 665, de 30 de março de 2022. Essas normas têm como objetivo estabelecer e avaliar parâmetros de produção, manutenção e comercialização dos biofármacos.

Algumas das normas para o desenvolvimento e comercialização de um biofármaco incluem a caracterização físico-química, que envolve a análise de características como atividade enzimática, pureza, espectrometria, análise termográfica, determinação de tamanho de partícula e concentração. Além disso, é importante avaliar a estabilidade do produto, considerando as condições de armazenamento recomendadas, incluindo temperatura e umidade, e como esses fatores influenciam na data de validade do produto. É também fundamental realizar o controle de qualidade, incluindo ensaios microbiológicos e de esterilidade, além da rotulagem, que deve fornecer informações claras sobre a composição, modo de uso, armazenamento e data de validade do medicamento (Gad, 2008; Cavalcanti, 2020).

A produção de biofármacos tem sido uma área de grande interesse e investimento nos últimos anos, devido à sua capacidade de oferecer tratamentos mais eficazes e personalizados para diversas doenças, como a trombose. Neste contexto, podemos encontrar no estado da técnica uma ampla variedade de pesquisas relacionadas ao tema, fornecendo diversos pontos de vista, além de documentos de proteção da propriedade intelectual. No contexto da produção de biofármacos, as patentes são particularmente relevantes, uma vez que esses produtos podem representar investimentos significativos em pesquisa e desenvolvimento.

Evidenciando a colocação acima, a patente EP4056590A1 depositado pelo Escritório Europeu de Patentes e pelo Organização Mundial da Propriedade Intelectual, propôs uma formulação farmacêutica composta por anticorpos monoclonais (mAb) anti-IL-5 e tampão (pH 6.8 a 7.2) para o tratamento de doenças mediadas pela interleucina 5 (IL-5) como a asma. Já US20180125966A1 (Tecnologias de estabilização universal Inc. depositado no escritório estadunidense de patentes) relata processo de formulação de composições farmacêuticas compostas por microrganismos, proteínas e antígenos, separadamente ou combinados entre si inativados, mas terapêticamente ativos. Seguindo uma outra linha, a patente US10272033B2 (Tecnologias de estabilização universal Inc. depositado no escritório estadunidense de patentes) se refere a meios de administração de biofármacos termoestáveis (preferencialmente vacinas) sem o uso de seringas,

utilizando a metodologia de imobilização do biofármaco em filme polimérico composto por carboidratos em diversas camadas com funções diferentes de aportar o biofármaco, protegê-lo e permitir a aplicação no paciente.

Processos que envolvem a distribuição e estabilidade de biomoléculas compõem grande parte dos pedidos de proteção de propriedade intelectual, como US20050118718A1 (Universidade de Utah depositado no escritório estadunidense de patentes), que utiliza um copolímero (Polietilenoglicol-Poli-L-histidina) biocompatível associado a uma biomolécula como peptídeos, ácido nucleico, enzima, hormônio, vacina ou uma mistura desses, estabilizando a molécula por ionização e facilitando sua distribuição. Também é muito presente a proteção a processos que utilizam plantas e microrganismos para a obtenção de ativos fármacos, como BR1020150291906A2 (Universidade Federal de Pernambuco pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial) que aborda o uso do extrato aquoso e fração polissacarídica de *Thuja occidentalis* como agentes antiinflamatórios, ou PI94076600A que informa o uso de extrato de *Aspergillus niger* 1.2 AN39. para uso profilático e terapêutico para prevenção e tratamento de tumores induzidos por papilomavirus em mamíferos.

Além disso, pode-se encontrar patentes voltadas a preocupações emergentes como o tratamento de trombose como BR1120220196660A2 (Aplagon Oy pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial) que determina o processo de produção e uso de uma molécula antitrombótica, tendo tanto atividade antiplaquetária quanto anticoagulante formada por heparina não fracionada e albumina de soro humano. Porém, é importante ressaltar que o uso indevido de patentes pode limitar o acesso a medicamentos essenciais e encarecer o custo dos tratamentos. Nesse sentido, a discussão sobre as patentes de biofármacos deve ser realizada com cautela e considerando o interesse público e a garantia do acesso à saúde.

REFERÊNCIAS

ABDUL RAHIM, P.; RENGASWAMY, D. Fibrinolytic enzyme-an overview. Current pharmaceutical biotechnology, v. 23, n. 11, p. 1336-1345, 2022.

ABDUL-GHAFFAR, A. M. Radiation synthesis and modification of biopolymers and polymeric composites for biomedical applications. Polymers and Polymer Composites, v. 31, p. 09673911231166636, 2023.

ABU-TAHON, M. A. *et al.* Thrombolytic and anticoagulant efficiencies of purified fibrinolytic enzyme produced from *Cochliobolus hawaiiensis* under solid-state fermentation. Biotechnology and Applied Biochemistry, v. 70, n. 6, p. 1954-1971, 2023.

ADIVITIYA; K. Y. P. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. Bioengineered, v. 8, n. 4, p. 331-358, 2017.

AFINI, A. V. M. *et al.* Production and partial characterization of fibrinolytic enzyme from a soil isolate *Aspergillus carbonarius* S-CSR-0007. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, v. 8, p. 142-148, 2016.

AGHAMIRI, S. H. *et al.* Efficacy of mechanical thrombectomy in stroke patients with large vessel involvement. *European Journal of Translational Myology*, v. 32, n. 2, 2022.

AGU, K. C. *et al.* Isolation and Characterization of Proteolytic Enzyme Produced from Fungi. 2023.

ALHAZMI, H.A.; ALBRATTY, M. Analytical Techniques for the Characterization and Quantification of Monoclonal Antibodies. *Pharmaceuticals* 2023, 16, 291. <https://doi.org/10.3390/ph16020291>.

ALIPOUR, H. *et al.* Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 6, n. 11, p. 975-981, 2016.

ALTAF, F.; WU, S.; KASIM, V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 680397, 2021.

ALVES NOBRE, T. *et al.* Bromelain as a natural anti-inflammatory drug: a systematic review. *Natural Product Research*, p. 1-14, 2024.

ALZHRANI, N. H.; EL-SHENAWY, F. S. Production and characterization of staphylokinase enzyme from *Staphylococcus aureus* ASIA4. *Archives of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2020.

ANJUM, F. *et al.* The Role of Coagulation in Heart Failure: A Literature Review. *Current Heart Failure Reports*, p. 1-15, 2024.

ANTEBI, U. *et al.* Efeitos da radiação ionizante nas proteínas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados ou congelados. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 51(2), 224-230. 2016.

ANTUNES, J. *et al.* Exploring nanofibers and hydrogels as collagenase carriers for the development of advanced wound dressings. In: *Materials Science Forum*. Trans Tech Publications Ltd, 2022. p. 43-55.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 665, DE 30 DE MARÇO DE 2022.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 55, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010.

ARIBAWA, I. G. N. M. *et al.* Pulmonary embolism in patients with severe COVID-19 treated with systemic low-dose thrombolytic therapy: A case series. *International journal of critical illness and injury science*, v. 12, n. 4, p. 235-238, 2022.

ASTUDILLO, Á. *et al.* Advances in agroindustrial waste as a substrate for obtaining eco-friendly microbial products. *Sustainability*, v. 15, n. 4, p. 3467, 2023.

AVHAD, D. N.; RATHOD, V. K. Ultrasound stimulated production of a fibrinolytic enzyme.

Ultrasonics Sonochemistry, 21, 182-188. 2014.

BABALOLA, B. A. *et al.* Therapeutic benefits of Carica papaya: A review on its pharmacological activities and characterization of papain. Arabian Journal of Chemistry, v. 17, n. 1, p. 105369, 2024.

BAJAJ, S. *et al.* Gamma radiation Induced Intestinal Proteomic modulation in mice: a two Dimensional electrophoretic analysis. Defence Life Science Journal, v. 2, n. 3, p. 327-334, 2017.

BENMRAD, M. O. *et al.* Production, purification, and biochemical characterization of serine alkaline protease from Penicillium chrysogenum strain X5 used as excellent bio-additive for textile processing. International journal of biological macromolecules, v. 119, p. 1002-1016, 2018.

BENJAMIN E. J. *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2018 update: A report from the American Heart Association. Circulation. 2018 Mar 1. 137(12) -492.

BERKOWITZ, S. A. Challenges with the biophysical characterization of complex (multichain assembly, chemically modified, big and high concentration) biopharmaceuticals. In Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals, Second Edition, Elsevier, pp. 331-352. 2020.

BHATT, P. *et al.* Recent advancement in microbial enzymes and their industrial applications. In: Industrial applications of microbial enzymes. CRC Press, 2022. p. 1-17.

BISWAS, P. *et al.* Enzymes in health care: Cost-effective production and applications of therapeutic enzymes in health care sector. Bioprospecting of enzymes in industry, Healthcare and Sustainable Environment, p. 291-314, 2021.

BLANCO-COLIO, L. M.; MARTÍN-VENTURA, J. L. Atherosclerosis and Other Related-Arterial Diseases. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 13, p. 10453, 2023.

BONNARD, T. *et al.* Development and validation of a high throughput whole blood thrombolysis plate assay. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 2346, 2017.

BOVET, P. *et al.* Cardiovascular disease: Priority interventions. In: Noncommunicable Diseases. Routledge, 2023. p. 52-57.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. Research, Society and Development, v. 11, n. 2, p. e13611225449-e13611225449, 2022.

CAMERA, M. The Coagulative Cascade. Direct Oral Anticoagulants: From Pharmacology to Clinical Practice, p. 1-8, 2021.

CARVALHO, J. K. *et al.* Yeasts isolated from a lotic continental environment in Brazil show potential to produce amylase, cellulase and protease. Biotechnology Reports, v. 30, p. e00630, 2021.

CAVALCANTI, R. M .F. *et al.* Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. 3 Biotech, [s.l.], v. 10, n. 4, p. 177, Apr. 2020.

CHI, Z. *et al.* Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. Bioresource Technology, v. 98, n. 3, p. 534-538, 2007.

CHOI, J. *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the Medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 47 (6), 539-546. 2017.

CHOI, K. R.; LEE, S. Y. Systems metabolic engineering of microorganisms for food and cosmetics production. Nature Reviews Bioengineering, v. 1, n. 11, p. 832-857, 2023.

CLEMENTINO, E. L. *et al.* Integrated production and purification of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. 2019.

COSME, F.; INÊS, A.; VILELA, A. Microbial and commercial enzymes applied in the beverage production process. Fermentation, v. 9, n. 4, p. 385, 2023.

DA SILVA, M. M. *et al.* Immobilization of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in magnetic nanoparticles. Protein Expression and Purification, v. 192, p. 106044, 2022.

DA SILVA SANTANA, R. *et al.* Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years. Research, Society and Development, v. 11, n. 14, p. e530111436652-e530111436652, 2022.

DATASUS. Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. Ministério da Saúde. 2024. Acesso em: 07 de Julho de 2024. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

DE CASTRO, R. J. S.; CRUZ, G. A. S. Xylooligosaccharides production by enzymatic hydrolysis: A review. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, v. 19, p. 100194, 2019.

DI MATTEO, Paola *et al.* Differential scanning calorimetry (DSC) as a tool for studying thermal properties of a crude cellulase cocktail. Chemical Papers, v. 77, n. 5, p. 2689-2696, 2023.

DIAS, A. G. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of galactomannans from *Adenanthera pavonina* seeds in vitro. International Journal of Biological Macromolecules, v. 164, p. 2733-2741, 2020.

DU, C. *et al.* Purification and characterization of a novel serine protease from *Cordyceps militaris*. African Journal of Microbiology Research, v. 6, n. 15, p. 3643-3650, 2012.

DUARTE, J. H. *et al.* A fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 with hemolytic, antioxidant, antitumor, and anti-inflammatory properties. International journal of biological macromolecules, v. 177, p. 332-342, 2021.

EL-TAYEB, T. S. A. *et al.* Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme from a newly isolated *Bacillus subtilis* K42. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 261-269, 2012.

FACKLER, O. T.; GARCÍA, J. V. Molecular determinants of HIV pathogenesis. *PLoS pathogens*, v. 4, n. 6, p. e1000104, 2008.

FAROUK, A. *et al.* Effects of gamma irradiation on various radiation-resistant proteases. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 91, p. 140-147, 2013.

FERREIRA, P. L. *et al.* Potential application of enzyme-loaded nanoparticles for targeted treatment of vascular diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 670847, 2021.

FERREIRA, A. N. *et al.* Fibrinogenolytic and fibrinolytic activity of fungal proteases: The role of *Mucor subtilissimus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 142, p. 109685, 2020.

FONSECA, J. G. A. *et al.* Advances in mycoprotein production from filamentous fungi. *Mycosphere*, v. 12, n. 1, p. 669-681, 2021.

FONG, J. N. Y. *et al.* Aggregation of an IgG2 antibody at a pH change: roles of colloidal stability and conformational stability. *Pharmaceutical Research*, v. 24, n. 4, p. 700-707, 2007.

FUJITA, M. *et al.* Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) produced by *Bacillus subtilis* natto from a vegetable protein. *Enzyme and microbial technology*, v. 30, n. 2, p. 393-399, 2002.

GARZA, A.; TORRES, V. Recent advances in the study of staphylokinase-a multifunctional plasminogen activator from *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*, v. 8, n. 1, p. 74, 2020.

GEWITTER, G. B. *et al.* Pharmacological activity of chitosan with different deacetylation degrees: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 184, p. 456-471, 2021.

GIM, G.; KIM, W. Genome mining reveals the novel fibrinolytic enzyme producing potential of a soil-derived *Streptomyces griseorubiginosus* strain. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2021.

GONG, X. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus natto* B12. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 53, n. 20, p. 7733-7736, 2005.

GONZALEZ-MUNOZ, P. F. *et al.* Fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. G1 isolated from a marine sponge *Haliclona simulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 6, p. 1-13, 2019.

GREENBERGER, J. S. *et al.* Amelioration of radiation-induced life threatening side effects in a murine model of hematopoietic-acute radiation syndrome. In: *Medical Countermeasures Against Radiological and Nuclear Threats*. Springer, Cham, 2019. p. 49-74.

GRIMSRUD, P. A. *et al.* A two-pronged approach of ECM hydrogel and therapeutic monoclonal antibodies to treat myocardial infarction. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 111, n. 1, p. 93-107, 2023.

GUO, R. *et al.* Cloning, expression, and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus pumilus* BS15. *Molecular biology reports*, v. 40, n. 5, p. 3821-3828, 2013.

GUPTA, S. K.; SINGH, P. K.; AGARWAL, R. P. Fibrinolytic enzymes of microbial origin: therapeutic potential and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 852005, 2022.

HAMAD, B. *et al.* Immobilization of α -amylase on nanofibers using gamma irradiation for biocatalytic applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 196, p. 161-168, 2022.

HAN, J. *et al.* Construction of an efficient expression system for a novel fibrinolytic enzyme gene from *Bacillus subtilis* LD-8547. *Biotechnology Letters*, v. 36, n. 5, p. 939-946, 2014.

HAN, Y. S.; ZHANG, Y. Fibrinolytic enzymes and their potential role in biotechnological and medicinal applications. *Advances in Applied Microbiology*, v. 113, p. 187-217, 2020.

HERNÁNDEZ-RIVERA, M. L. *et al.* Gamma irradiation effects on the structural, mechanical, and biological properties of hydrogel scaffolds for tissue engineering. *Applied Sciences*, v. 11, n. 9, p. 4094, 2021.

HOPKINS, T. E.; LEE, K. H.; TURNER, M. S. Thrombosis: balancing clotting and bleeding in everyday clinical practice. *Australian Prescriber*, v. 44, n. 1, p. 2-6, 2021.

HOSNY, N. A. *et al.* A new approach for the lipase purification by partitioning in aqueous two-phase systems using thermo-separating polymer. *Separation and Purification Technology*, v. 66, n. 3, p. 530-536, 2009.

HSIEH, W. C.; KO, C. Y. Study of gamma irradiation on collagen and its impact on the enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme. *Radiation Physics and Chemistry*, 187, 109557, 2021.

HUANG, L.; ZHAO, W.; HUANG, W.i; CAO, J.; ZHOU, S. Purification and characterization of a novel serine protease from *Bacillus velezensis* SW1 with fibrinolytic and keratinolytic activities. *Process Biochemistry*, v. 110, p. 217-225, 2021.

HUMBER, J.; GRADY, D.. Fibrinolytic therapy for acute stroke: review and current concepts. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 59, n. 4, p. 593-602, 2020.

ISLAM, M. *et al.* Bioprospecting microbial enzymes for sustainable waste management: Challenges and opportunities. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1106767, 2023.

JACOBS, G. P. Irradiation of pharmaceuticals: A literature review. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 190, p. 109795, 2022.

KANG, S. C. *et al.* Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 5, p. 493-500, 2004.

KAPLAN, A. *et al.* Fibrinolytic enzyme derived from *Bacillus subtilis*: A potential therapeutic approach for thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, v. 54, n. 1, p. 174-184, 2022.

KAUFMAN, J.; VIGANO, S.; WILLIAMS, G. Innovations in fibrinolytic therapy for thromboembolic disorders: insights and advancements. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 19, n. 8, p. 1975-1988, 2021.

KHAN, A. *et al.* Fibrinolytic and thrombolytic potential of a newly isolated *Bacillus cereus* strain. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 1086-1095, 2018.

KIM, W. H. *et al.* Characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. *Journal of Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 29-34, 2006.

KIM, J. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* K42 isolated from fermented soybean. *Food Science and Biotechnology*, v. 14, n. 2, p. 273-278, 2005.

KIM, Y. C. *et al.* Screening and characterization of fibrinolytic enzyme from *Streptomyces griseus* isolated from Korean soy sauce. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 7, n. 5, p. 337-343, 1997.

KIM, W. *et al.* Fibrinolytic activity of microbial enzymes: characteristics and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 87, n. 1, p. 243-251, 2010.

KO, D. W.; KIM, W. J. A novel fibrinolytic enzyme from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* K42. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 34, n. 4, p. 287-292, 2007.

KOPKE, L. S. *et al.* Lectins: A novel perspective on the anti-cancer properties of natural compounds. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, p. 51, 2019.

KRISTOFFERSEN, K. A. *et al.* Fourier-transform infrared spectroscopy for monitoring proteolytic reactions using dry-films treated with trifluoroacetic acid. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 7844, 2020.

KUO, C. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* WR 2004. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 63, n. 8, p. 1932-1938, 2015.

LANG, I. M. Thrombosis—besieged but poorly understood. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 1, p. 4, 2014.

LEE, S. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Agrocybe chaxingu*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 70, n. 8, p. 1869-1875, 2006.

LI, T.; YUAN, D.; YUAN, J. Antithrombotic drugs—pharmacology and perspectives. *Coronary*

artery disease: Therapeutics and drug discovery, p. 101-131, 2020.

LI, Y. *et al.* Identification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from Daqu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 10, p. 5804-5810, 2010.

LI, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. CK 11-4 screened from cheonggukjang. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, n. 4, p. 541-546, 2011.

LIN, J. *et al.* Characterization and optimization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*: a potential thrombolytic agent. *Journal of Basic Microbiology*, v. 57, n. 8, p. 721-728, 2017.

LIU, H. *et al.* A novel fibrinolytic protein From *Pheretima vulgaris*: purification, identification, antithrombotic evaluation, and mechanisms investigation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 772419, 2022.

LIU, L. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 15, n. 1, p. 38-43, 2005.

LU, J. *et al.* High level expression of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2013.

MACKMAN, N. *et al.* Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches. *Nature reviews Drug discovery*, v. 19, n. 5, p. 333-352, 2020.

MAO, S. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. H-67 isolated from fermented shrimp paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 20, p. 7666-7672, 2005.

MARQUES, D. C. *et al.* Evaluation of proteases production by filamentous fungi from Brazilian cerrado soil. *International Journal of Microbiology*, v. 2019, p. 10, 2019.

MATTHIAS, U. *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel peptide-based fibrinolytic inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 6, p. 1837-1848, 2017.

MAZUMDER, M. *et al.* Fibrinolytic enzyme production by *Bacillus* sp. under submerged and solid-state fermentation using agro-wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, p. 101066, 2019.

MEHMOOD, S. *et al.* Fibrinolytic enzyme production and optimization using statistical methods from *Bacillus cereus* MSK-01. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 29, p. 101775, 2020.

MISHRA, B. P. *et al.* Fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* B80F6: Screening, purification, biochemical characterization and evaluation of thrombolytic potential in vitro. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 26, p. 101646, 2020.

MORSY, F. M.; KAMEL, R. S.; ABDELGHANY, T. M. Biochemical characterization of fibrinolytic enzymes from *Streptomyces rochei* isolated from Egyptian soil. *Archives of Microbiology*, v. 204, n. 6, p. 1-13, 2022.

MULIA, K.; NURHARDEVI, E. Y. Production and characterization of fibrinolytic enzymes from *Streptomyces* sp. isolated from traditional fermented soybean in Indonesia. *Journal of Applied Microbiology*, v. 131, n. 3, p. 1465-1476, 2021.

MURAKAMI, M. *et al.* A novel fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) from skipjack “Shiokara”. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 138, n. 1, p. 81-88, 2004.

NAM, H. *et al.* A novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* and its application for oral administration. *Protein Expression and Purification*, v. 66, n. 1, p. 16-22, 2009.

NAWAZ, A. *et al.* Biosynthesis of fibrinolytic agent urokinase by *Enterococcus gallinarum* isolated from sardine. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 19, n. Sup. 1, p. 213-225, 2020.

NAWAZ, H. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces radiopugnans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 35, p. 102108, 2021.

NISHIYAMA, K. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* I-2, and its application in thrombolytic therapy. *Thrombosis Research*, v. 136, n. 5, p. 961-968, 2015.

OHTSUKA, M. *et al.* Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 113, n. 6, p. 718-720, 2012.

OKAJIMA, T. *et al.* Properties of a novel fibrinolytic enzyme isolated from a Korean fermented food. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, n. 11, p. 1291-1297, 2009.

OSMOLOVSKIY, A. A. *et al.* Secretion of proteinases with fibrinolytic activity by micromycetes of the genus *Aspergillus*. *Moscow University Biological Sciences Bulletin*, v. 73, p. 39-42, 2018.

PATIL, S. V. *et al.* Proteolytic and fibrinolytic activity of *Aspergillus flavus*, isolated from native soil of karnataka. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 2003-2007, 2013.

PENEDO, L. *et al.* Effects of radiation on thrombolytic and fibrinolytic enzymes: a review. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 198, p. 110760, 2022.

PHAM, T. V. *et al.* Purification and Characterization of a Small Thermostable Protease from sp. CNXK100. *Polish Journal of Microbiology*. 2024.

QI, H.; HU, M.; ZHU, H. A fibrinolytic enzyme from *Fusarium* sp. CPCC 400908. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 44, n. 3, p. 270-278, 2014.

QIAN, G. *et al.* Biochemical study of fibrinolytic protease from *Euphausia superba* possessing

multifunctional serine protease activity. *Protein and Peptide Letters*, v. 28, n. 6, p. 651-664, 2021.

RAJPUT, R. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from a soil bacterium *Bacillus subtilis*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 28, n. 1, p. 1-7, 2022.

RAMACHANDRAN, S.; RAJESHKANNAN, C.; CHELLAPPAN, D. S. Enzymatic hydrolysis of fibrin clot by a fibrinolytic enzyme from *Aspergillus clavatus*. *Archives of Microbiology*, v. 193, n. 3, p. 247-255, 2011.

RAMLI, I. N. *et al.* Production and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND6. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, v. 8, n. 1, p. 13-21, 2020.

REKHA, M. R. *et al.* Study on the fibrinolytic activity of protease produced by *Bacillus* sp. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, v. 27, n. 4, p. 2399-2410, 2021.

SAFFARI, P. *et al.* Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus pumilus* BS15 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v. 95, p. 68-74, 2014.

SAMJI, N. *et al.* Successful Use of Thrombolysis in an Extremely Low Birth Weight, Premature Infant With Aortic Thrombosis. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 44, n. 5, p. e888-e891, 2022.

SANTOS, F. R. P. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory and antithrombotic properties of fibrinolytic proteases produced by fungal species. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 177, p. 401-410, 2021.

SARKAR, R. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* A26. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 1175-1183, 2017.

SCHOPPER, M. *et al.* Enzyme therapy: a potential solution for the treatment of blood clots. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 18, n. 10, p. 2465-2476, 2020.

SHAH, S. A. *et al.* Fibrinolytic enzymes of microbial origin: their therapeutic potential and biotechnological applications. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1108574, 2023.

SHAIKH, M. I. *et al.* In vitro thrombolytic potential and fibrinolytic enzyme production from a newly isolated *Bacillus cereus* MSK-01. *BioMed Research International*, v. 2020, p. 1-10, 2020.

SHEN, P. *et al.* A novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* H1180 isolated from Korean fermented fish sauce. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2009.

SILVA, F. M. *et al.* Proteases from *Aspergillus* species: Biochemical characterization and potential applications in industrial processes. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 1-14, 2021.

SINGH, P. K. *et al.* Fibrinolytic enzymes: Microbial sources and potential therapeutic

applications. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 1-9, 2016.

SINGH, S. *et al.* Biochemical characterization of protease enzyme extracted from different plant leaves and seeds: destaining efficiency of enzyme for stain removal. *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, v. 35, n. 2, p. 175-181, 2022.

SINGH, V. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 110, p. 9-16, 2018.

SIVAKUMAR, P. K. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from a newly isolated *Bacillus cereus* R1. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 47, n. 6, p. 633-641, 2017.

SONG, S. *et al.* Impact of the COVID-19 pandemic on cardiovascular mortality and contrast analysis within subgroups. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 11, p. 1279890, 2024.

SUN, Binwen *et al.* The utility of proteases in proteomics, from sequence profiling to structure and function analysis. *Proteomics*, v. 23, n. 6, p. 2200132, 2023.

SZYPUŁA, K. *et al.* Wpływ COVID-19 na układ sercowo-naczyniowy. *Medycyna Sportowa*, v. 40, n. 1, p. 215-221, 2024.

TANG, M. *et al.* Affinity Purification of a Fibrinolytic Enzyme from *Sipunculus nudus* (Video)| JoVE. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, n. 196, p. e65631, 2023.

VERVOORT, D.; PEZZELLA, A. T. Global cardiac surgery and the global burden of disease. *Global Cardiac Surgery Capacity Development in Low and Middle Income Countries*, p. 101-106, 2022.

WANG, L.; TAN, J. Detection and treatment of thrombotic diseases by activating platelet. *Highlights in Science, Engineering and Technology*, v. 54, p. 287-293, 2023.

XIN XIONG, X. X. *et al.* Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from a bacterium isolated from soil. 2018.

ZAHID, H. M. *et al.* Gamma Irradiation to Sterilize Active Ingredients, Consumer Foodstuffs and Beverages in Bangladesh. *Scientific Review*, v. 8, n. 1, p. 33-37, 2022.

ZHAO, L.

et al.

A novel bi-functional fibrinolytic enzyme with anticoagulant and thrombolytic activities from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor* ZLH-1. *Marine Drugs*, v. 20, n. 6, p. 356, 2022.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Enzimas Fibrinolíticas Microbianas como Abordagem Promissora para Distúrbios Tromboembólicos

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados como capítulo no livro “Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde” pela Editora Rfb.



Título: Introdução À Biotecnologia Microbiana

Livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde

Editora Rfb

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.1

ISBN: 978-65-85712-37-8

Autores: Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Maria Clara do Nascimento, Celso Lucas Gomes da Silva, Diva Maria Izabel de Oliveira Silva Melo, Kétura Rhammá Cavalcante Ferreira, Juanize Matias da Silva Batista, Thiago Pajeú Nascimento, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS MICROBIANAS COMO ABORDAGEM PROMISSORA PARA DISTÚRBIOS TROMBOEMBÓLICOS

Resumo

As doenças cardiovasculares são um sério problema de saúde global, causando inúmeros óbitos a cada ano. A trombose é uma complicação grave dessas doenças, levando a acidentes vasculares cerebrais (AVC) e infartos do miocárdio. Os tratamentos atuais, como anticoagulantes, são caros e podem apresentar efeitos colaterais. Assim, as proteases fibrinolíticas de origem microbiana surgem como uma promissora inovação terapêutica. O presente capítulo apresenta uma abordagem atualizada obtida a partir de pesquisa conduzida em bases de dados científicas. As proteases fibrinolíticas de origem microbiana têm sido identificadas como uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento da trombose. Elas têm mostrado alta eficácia na dissolução de coágulos sanguíneos e menor risco de efeitos colaterais. Além disso, sua produção por microrganismos permite a obtenção em larga escala e o uso de resíduos agroindustriais como substrato, tornando o processo mais econômico e ambientalmente sustentável.

Palavras-chave: Doenças cardiovasculares; Trombose; Proteases fibrinolíticas; Microrganismos; Tratamento terapêutico.

4.2 Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados no periódico “Research, Society and Development”.



Fator de Impacto: 1.78 (2020-21, CiteFactor).

Qualis CAPES: C.

DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25449>

Autores: Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Maria Clara Nascimento, Anna Carolina Batista, Vagne de Melo Oliveira, Thiago Pajeú Nascimento, Juanize Matias da Silva Batista, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Lorenzo Pastrana, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

SYSTEMATIC ANALYSIS ON THE OBTAINING OF FIBRINOLYTIC FUNGI ENZYMES

Resumo

Proteases fibrinolíticas destacam-se por atuarem diretamente no coágulo de fibrina e conseguir manter o fluxo sanguíneo. Fungos despontam na literatura como fontes viáveis na obtenção dessa enzima. Desta forma, o propósito desta revisão sistemática é analisar as informações disponíveis a respeito da produção, purificação e caracterização de proteases fibrinolíticas por fungos. A pesquisa foi conduzida nas bases ScienceDirect, PubMed e Scopus, utilizando como palavras-chave “ (Fibrinolytic enzyme) OR (Fibrinolytic protease) AND (Fungal or Fungus or Fungi) ”. Delimitando período de 10 anos (2011-2021). Os resultados obtidos foram filtrados por critérios de seleção, sendo excluídos artigos de revisão e artigos fora do escopo deste trabalho. Os artigos foram avaliados e pontuados (0-10) segundo critérios pré-estabelecidos. Nenhum dos trabalhos obteve pontuação máxima, entretanto o trabalho com maior pontuação (9) apresentou dados relevantes em todos os critérios analisados, obtendo enzima fibrinolítica de *Xylaria curta*. Dentre os 21 artigos selecionados foram descritos 12 gêneros diferentes e o uso de Fermentação Submersa e a purificação de Serino proteases foram mais descritos. Este trabalho também observou maior representação de etapas de purificação e caracterização, indicando a necessidade de atenção ao cultivo e aplicação enzimática. Está claro que a produção destas enzimas por fungos é pertinente tendo em vista a alta recuperação observada mesmo após purificação e sua tendência à aplicação farmacêutica.

Palavras-chave: Protease; Trombolítico; Cogumelo; Fungos filamentosos; Fermentação; Purificação

4.3 Role of gamma radiation as an agent modulator of *Mucor subtilissimus* UCP1262 Fibrinolytic Enzyme (MsFE)

Os resultados descritos neste capítulo foram publicados no periódico “Process Biochemistry”.



Fator de Impacto: 4.4 (2024, Process Biochemistry).

Qualis CAPES: A3.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.04.017>

Autores: Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Thiago Pajeú Nascimento, Patyanne Carvalho Correia, Juanize Matias da Silva Batista, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa, Kétura Rhamma Cavalcante Ferreira, Jonatas de Carvalho-Silva, Maria Teresa da Cruz Augusto Neves Petersen, Wendell Albuquerque, Thiago de Salazar e Fernandes, Attilio Converti, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

ROLE OF GAMMA RADIATION AS AN AGENT MODULATOR OF *Mucor subtilissimus* UCP1262 FIBRINOLYTIC ENZYME (MSFE)

RESUMO

A trombose é uma condição perigosa que pode resultar em danos graves. As enzimas fibrinolíticas são agentes terapêuticos significativos para a trombose. Este estudo concentrou-se na MsFE, uma protease fibrinolítica de *M. subtilissimus* UCP1262, explorando seus traços físico-químicos e o impacto da radiação gama em sua atividade. As investigações incluíram: atividade fibrinogenolítica, efeitos de solventes e íons, raios gama, vida útil da enzima, FTIR, CD, determinação de tempos de coagulação e cinética enzimática. Notavelmente, os principais resultados obtidos mostram que a protease manteve 90% de atividade em solventes orgânicos, o FTIR indicou grupos funcionais carbonila e estudos espectroscópicos de dicroísmo circular indicaram que a estrutura secundária (folha β) da enzima permaneceu principalmente inalterada em pH 2.0–9.0, enquanto mudanças consideráveis foram observadas na estrutura terciária. A análise cinética revelou parâmetros alterados após irradiação. A radiação gama inicialmente aumentou a atividade da enzima (10 kGy), mas diminuiu progressivamente além de 20 kGy. Íons metálicos, especialmente magnésio, aumentaram a atividade da enzima irradiada. Este estudo destaca o potencial da

radiação gama como um modulador para aprimorar a atividade fibrinolítica, sugerindo futuras aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Atividade protease, Terapia fibrinolítica, Radiação gama.

5 CONCLUSÕES DA TESE

Buscando aprofundar o conhecimento e trazer a literatura uma compreensão do padrão de publicações atuais, foram realizadas duas revisões sobre o tema da tese. A revisão narrativa publicada como capítulo de livro expõe a importância da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos baseados em enzimas fibrinolíticas para o tratamento de doenças cardiovasculares, especialmente a trombose. A revisão sistemática realizou uma busca exaustiva em bancos de dados que resultou em um total de 426 artigos, dos quais, após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão preestabelecidos, 21 artigos publicados entre 2011 e 2021 foram selecionados. De acordo com a análise e critérios de pontuação, observou-se que 52,4% dos artigos alcançaram uma pontuação final acima de 7. A análise evidenciou a necessidade de aprofundar as pesquisas sobre enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos, visto que essas moléculas apresentam grande variação. Da mesma forma, pesquisas sobre a aplicação da enzima são cruciais para sua direção industrial, um atributo essencial para seu uso futuro como agente trombolítico.

Já em relação à parte prática do estudo, a protease fibrinolítica nomeada MsFE demonstrou potencial como agente antitrombótico, com a exposição à radiação gama influenciando sua atividade de maneira dose-dependente. Doses baixas aumentaram a atividade da enzima, enquanto doses mais altas diminuem progressivamente sua atividade, indicando um impacto na estrutura da enzima. Além disso, íons metálicos como ferro, cobre e magnésio afetaram positivamente a atividade da protease irradiada, sugerindo uma modulação potencial por esses íons. A cinética enzimática da protease irradiada mostrou alta afinidade, indicando eficácia como agente fibrinolítico. Este estudo contribui para a compreensão das aplicações clínicas e industriais da enzima MsFE e estabelece uma base sólida para futuras pesquisas focadas nos benefícios terapêuticos e aplicações farmacêuticas e industriais desta enzima. Assim, é essencial ampliar as publicações relacionadas à produção de enzimas fibrinolíticas e à avaliação de suas aplicações, além de desenvolver uma caracterização mais complexa das propriedades físico-químicas da enzima.

A compreensão aprofundada da atividade enzimática e dos fatores que a influenciam, como radiação e íons metálicos, proporciona uma base sólida para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes no tratamento de doenças cardiovasculares. Na biotecnologia, as descobertas ressaltam a importância da otimização de processos enzimáticos e o potencial de aplicação dessas enzimas em contextos industriais. Assim, a tese contribui significativamente para o avanço das tecnologias farmacêuticas e biotecnológicas, promovendo novas oportunidades para o desenvolvimento de tratamentos inovadores e sustentáveis, e fortalecendo a integração entre a pesquisa acadêmica e a aplicação prática na indústria.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGOS COM AUTORIA PRINCIPAL SUBMETIDOS E/OU PUBLICADOS

Research, Society and Development, v. 11, n. 2, e15511225500, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25500>

Protease com atividade fibrinolítica e collagenolítica produzida por *Aspergillus ochraceus* URM604

Protease with fibrinolytic and collagenolytic activity produced by *Aspergillus ochraceus* URM604

Proteasa con actividad fibrinolítica y collagenolítica producida por *Aspergillus ochraceus* URM604

Recebido: 08/01/2022 | Revisado: 15/01/2022 | Aceito: 19/01/2022 | Publicado: 22/01/2022

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0317-0307>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: kethybarbara@gmail.com

Thiago Pajeu Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3480-6734>
Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: thiago_pajeu@hotmail.com

Vagne de Melo Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0841-1974>
Universidade Federal do Acre, Brasil

E-mail: vagne_melo@hotmail.com

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7045-2975>
Universidade de Pernambuco, Brasil

E-mail: romero_brandao@yahoo.com.br

Lorenzo Pastrana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6637-3462>
International Iberian Nanotechnology Laboratory, Portugal

E-mail: lorenzo.pastrana@inl.int

Juanize Matias da Silva Batista

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7654-2533>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: juanzematias@yahoo.com.br

Ana Lúcia Figueiredo Porto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5561-5158>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Resumo

Proteases possuem um papel fundamental na economia, estando presentes em diversos setores industriais. Dentre os fungos conhecidos por produzir proteases, destaca-se o gênero *Aspergillus*. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi produzir proteases a partir de fermentação em estado sólido de *Aspergillus ochraceus*, purificar, caracterizar e avaliar seu potencial na produção de enzima collagenolítica e fibrinolítica. Para isto foram avaliados o tipo e quantidade do substrato e a umidade das fermentações. Posteriormente foi realizada purificação por cromatografia DEA-Sephadex e Superdex-G75 em sistema FPLC. Assim como caracterização parcial avaliando o pH e temperatura ótimos da ação da protease. Foi observada que a melhor atividade da enzima nas fermentações com farelo de trigo como substrato (3g) e 60% de umidade, apresentando atividade proteásica, collagenolítica e fibrinolítica. Também foi observada maior atividade em pH8 e 50°C. Assim, concluiu-se que *A. ochraceus* possui grande potencial para aplicação biotecnológica, destacando-se a importância de futuras avaliações.

Palavras-chave: Fungo Filamentoso; Resíduo de Café; Farelo de Trigo; Enzima Fibrinolítica; Collagenase.

Abstract

Proteases play a fundamental role in the economy, being present in several industrial sectors. Among the fungi known to produce proteases, the genus *Aspergillus* stands out. Thus, the objective of this work was to produce proteases from solid state fermentation of *Aspergillus ochraceus*, purify, characterize and evaluate their potential in the production of collagenolytic and fibrinolytic enzymes. For this, the type and quantity of the substrate and the humidity of the fermentations were evaluated. Subsequently, purification was performed by DEA-Sephadex and Superdex-G75 chromatography in an FPLC system. As well as partial characterization evaluating the optimal pH and temperature of the protease action. It was observed that the best enzyme activity in fermentations with wheat bran as substrate (3g) and 60% moisture, showing protease, collagenolytic and fibrinolytic activity. Greater activity was also observed at pH8 and

Título: Protease with fibrinolytic and collagenolytic activity produced by *Aspergillus ochraceus* URM604

Aceito em: 19/01/2022

DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25500>

Fator de Impacto da revista: 1.78 (2020-21, CiteFactor). **Qualis:** C.

CAPÍTULOS DE LIVRO

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO À BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso¹

Raphael Luiz Andrade Silva²

Maria Rafaele Oliveira Bezerra da Silva³

Daniela de Araújo Viana Marques⁴

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁵

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.1

- ¹ Centro de Biociências – CB, Universidade Federal de Pernambuco
² Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco
³ Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco
⁴ Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco
⁵ Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco

Título: Introdução À Biotecnologia Microbiana

Livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde

Editora Rfb **DOI:** 10.46898/rfb.9786558895886.1 **ISBN:** 978-65-85712-37-8

APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS COM PARTICIPAÇÃO COLABORATIVA



Article

Physicochemical Properties of a Bioactive Polysaccharide Film from *Cassia grandis* with Immobilized Collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573)

Kétura Ferreira ¹, Kethylen Cardoso ¹, Romero Brandão-Costa ², Joana T. Martins ³, Cláudia Botelho ³, Anna Neves ⁴, Thiago Nascimento ⁵, Juanize Batista ⁴, Éverton Ferreira ⁶, Fernando Damasceno ⁶, Amanda Sales-Conniff ⁷, Wendell Albuquerque ^{8,*}, Ana Porto ⁴ and José Teixeira ³

- ¹ Postgraduate Program in Biological Applied to Health, Department of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; ketura.cavalcante@ufpe.br (K.F.); kethylen.barbara@ufpe.br (K.C.)
 - ² Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife 50100-130, Brazil; romero.brandao@upe.br
 - ³ CEB—Centre of Biological Engineering (LABBELS—Associate Laboratory), University of Minho, 4710-057 Braga, Portugal; joanamartins@ceb.uminho.pt (J.T.M.); claudiabotelho@deb.uminho.pt (C.B.); jateixeira@deb.uminho.pt (J.T.)
 - ⁴ Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural of University of Pernambuco, Recife 52171-900, Brazil; anna.dneves@ufrpe.br (A.N.); ana.porto@ufrpe.br (A.P.)
 - ⁵ Campus Professor Cinobélina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus 64049-550, Brazil; thiagopaje@ufpi.edu.br
 - ⁶ Campus Serra da Capivara, Federal University of São Francisco Valley-Univasf, São Raimundo Nonato 64770-000, Brazil; everton.franca@univasf.edu.br (É.F.); fernando.damasceno@univasf.edu.br (F.D.)
 - ⁷ USF Health Heart Institute, University of South Florida, 560, Channelside Drive, Tampa, FL 33602, USA; amandasales@usf.edu
 - ⁸ Institute of Food Chemistry and Food Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 17, 35392 Giessen, Germany
- * Correspondence: wendell.albuquerque@lcb.chemie.uni-giessen.de



Citation: Ferreira, K.; Cardoso, K.; Brandão-Costa, R.; Martins, J.T.; Botelho, C.; Neves, A.; Nascimento, T.; Batista, J.; Ferreira, É.; Damasceno, F.; et al. Physicochemical Properties of a Bioactive Polysaccharide Film from *Cassia grandis* with Immobilized Collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573). *Cosmetics* **2024**, *11*, 86. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11030086>

Academic Editor: Vasil Georgiev

Received: 19 April 2024

Revised: 15 May 2024

Accepted: 20 May 2024

Published: 29 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: (1) Background: Polysaccharide films are promising vehicles for the delivery of bioactive agents such as collagenases, as they provide controlled release at the wound site, facilitating tissue regeneration. This study aimed to investigate the physicochemical properties of *Cassia grandis* polysaccharide films with immobilized collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573). (2) Methods: Galactomannan was extracted from *Cassia grandis* seeds for film production with 0.8% (w/v) galactomannan and 0.2% (v/v) glycerol with or without collagenases. The films underwent physical-chemical analyses: Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), thermogravimetric analysis (TGA), color and opacity (luminosity-L*, green to red-a*, yellow to blue-b*, opacity-Y%), moisture content, water vapor permeability (WVP), thickness, contact angle, and mechanical properties. (3) Results: The results showed similar FTIR spectra to the literature, indicating carbonyl functional groups. Immobilizing bioactive compounds increased surface roughness observed in SEM. TGA indicated a better viability for films with immobilized *S. parvulus* enzymes. Both collagenase-containing and control films exhibited a bright-yellowish color with slight opacity (Y%). Mechanical tests revealed decreased rigidity in PCF (−25%) and SCF (−41%) and increased deformability in films with the immobilized bioactive compounds, PCF (234%) and SCF (295%). (4) Conclusions: Polysaccharide-based films are promising biomaterials for controlled composition, biocompatibility, biodegradability, and wound healing, with a potential in pharmacological applications.

Keywords: polysaccharide film; collagenase; *Streptomyces parvulus*; skin healing

Cosmetics **2024**, *11*, 86. <https://doi.org/10.3390/cosmetics11030086>

<https://www.mdpi.com/journal/cosmetics>

Título: Physicochemical Properties of a Bioactive Polysaccharide Film from *Cassia grandis* with Immobilized Collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573)

Aceito em: 20/04/2024

DOI: <https://doi.org/10.3390/cosmetics11030086>

Fator de Impacto da revista: 3.3 (2024, *Cosmetics*). **Qualis:** A3.

Extracellular collagenase isolated from *Streptomyces antibioticus* UFPEDA 3421: purification and biochemical characterization

Elizianne Pereira Costa^{a,b}, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa^c, Wendell Wagner Campos Albuquerque^d, Thiago Pajeú Nascimento^e, Amanda Emmanuelle Sales Conniff^f, Kethylen Barbara Barbosa Cardoso^a, Anna Gabrielly Duarte Neves^a, Juanize Matias da Silva Batista^a, and Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,b}

^aDepartment of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^bCenter of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^cLaboratory of Advances in Protein Biotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^dInstitute of Food Chemistry and Food Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany; ^eCampus Professora Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus, Brazil; ^fDepartment of Molecular Medicine, University of South Florida, Tampa, FL, USA

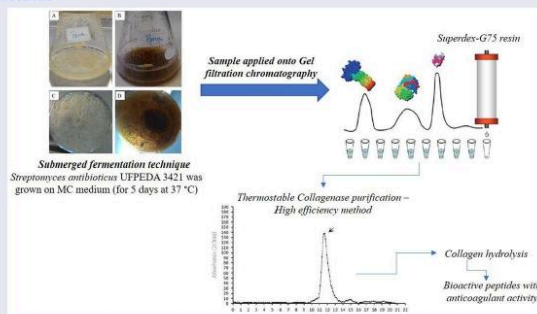
ABSTRACT

Collagenases are proteases able to degrade native and denatured collagen, with broad applications such as leather, food, and pharmaceutical industries. The aim of this research was to purify and characterize a collagenase from *Streptomyces antibioticus*. In the present work, the coffee ground substrate provided conditions to obtaining high collagenase activity (377.5 U/mL) using anion-exchange DEAE-Sephadex G50 chromatographic protocol. SDS-PAGE revealed the metallo-collagenase with a single band of 41.28 kDa and was able to hydrolyzed type I and type V collagen producing bioactive peptides that delayed the coagulation time. The enzyme activity showed stability across a range of pH (6.0–11) and temperature (30–55 °C) with optima at pH 7.0 and 60 °C, respectively. Activators include Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^{+} , K^{+} , while full inhibition was given by other tested metalloproteinase inhibitors. Kinetic parameters (K_m of 27.14 mg/mol, V_{max} of 714.29 mg/mol/min, K_{cat} of $79.9 s^{-1}$ and K_{cat}/K_m of 2.95 mL/mg/s) and thermodynamic parameters (E_a of 65.224 kJ/mol, ΔH of 62.75 kJ/mol, ΔS of 1.96 J/mol, ΔG of 62.16 kJ/mol, ΔG_{E-S} of 8.18 kJ/mol and ΔG_{E-T} of -2.64 kJ/mol) were also defined. Coffee grounds showed to be an interesting source to obtaining a collagenase able to produce bioactive peptides with anticoagulant activity.

KEYWORDS

Anticoagulant; bioactive peptides; coffee ground; collagen; collagenase; *Streptomyces*

GRAPHICAL ABSTRACT



Introduction

Microbial collagenases [E.C. 3.4.24.3] are metalloproteinases (MMPs) that belong to M9 family of metalloproteinases, but it may also include some serine proteases from the S1, S8, and S53 families.^[1,2] The S8 family proteases, characterized by an Asp-His-Ser catalytic triad (DHS triad), are often accompanied, on either side, by other domains. A similar

His-Asp-Ser catalytic triad is present in S1 protease family, what is described as a clear example of convergent evolution. Collagenases are responsible for degrading the triple-helix structure of native collagen. Microbial collagenases are less specific than animal collagenases and cleave several types of collagens, including insoluble collagen and denatured collagen.^[3] These enzymes are widely used in industrial processes and in therapeutic procedures as: meat

CONTACT Ana Lúcia Figueiredo Porto  analuporto@yahoo.com.br  Department of Animal Morphology and Physiology, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

© 2023 Taylor & Francis Group, LLC

Título: Extracellular collagenase isolated from *Streptomyces antibioticus* UFPEDA 3421: purification and biochemical characterization

Publicado em: 24/06/2023

DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2225090>

Fator de Impacto da revista: 2.9 (Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022)

Qualis: B1.

A novel β -fructofuranosidase produced by *Penicillium citreonigrum* URM 4459: purification and biochemical features

Vittoria Pradal Baracho Araújo^a , Thayza Kássia de Araújo^a , Karlla Mayara Nunes de Sousa^b , Wendell W. C. Albuquerque^c , Ana Karoline Caitano do Nascimento^a , Kethylen Barbara Barbosa Cardoso^a , Thiago Pajeú Nascimento^d , Juanize Matias da Silva Batista^a , Maria Taciana Holanda Cavalcanti^a , Ana Lucia Figueiredo Porto^a , and Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa^b 

^aDepartment of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^bInstitute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^cCampus Westend Theodor-W.-Adorno-Platz, Goethe University, Frankfurt, Germany; ^dCampus Professora Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus, Brazil

ABSTRACT

Fructooligosaccharides (FOS) are prebiotics of interest to the food industry. These compounds can be produced through the transfructosylation reaction by the enzyme fructofuranosidase. This enzyme is widely produced by fungi in a medium rich in sugar. Therefore, in this work, the main objectives were production, purification, biochemical characterization of a novel fructofuranosidase enzyme by *Penicillium citreonigrum* URM 4459 and synthesize and evaluate the antibacterial potential of fructooligosaccharides. With respect to sucrose hydrolysis, the optimal pH was 5.5, the apparent K_m for purified FFase was 3.8 mM, the molecular mass was 43.0 kDa, estimated by gel filtration on Superdex increase G75 controlled by AKTA Avant 25 and confirmed by 10% SDS-PAGE under denaturing condition. Also, the isoelectric point was 4.9. The fractions obtained with enzymatic activities, both stable at acidic pH and high temperatures, as well as being able to produce FOS. Regarding antibacterial activity, the FOS produced in this study showed better results than commercial FOS and other carbon sources. Thus, this work presents relevant data for the use of *P. citreonigrum* to produce fructofuranosidase and consequently FOS and can be used in the food and pharmaceutical industry.

KEYWORDS

Fructofuranosidase;
Fructooligosaccharides;
Penicillium citreonigrum;
prebiotics

Introduction

The enzyme market is very promising, and it is estimated that in 2030 it will exceed US\$20.5 bn. Besides in 2021 microorganisms were responsible for 86% of the global enzyme market. The enzymes market is projected to reach \$26.9 bn by 2027, growing of 6.8% from 2022 to 2027, according to a new report by Markets and Markets. Systematic methods in the field of enzymes and engineering have allowed access to achieve ends, such as screening novel enzymes from natural sources, thus making them safe and secure for manufacturing speciality products, such as pharmaceuticals, as well as for use in biocatalytic processes.^[1–3] The global industrial biotechnology market size is expected to reach \$852.6 bn in 2030 and register a revenue CAGR of 9.9% over the forecast period, according to the latest report. The market is anticipated to grow significantly due to the rapid adoption of industrial biotechnology by various industries, such as food & beverage, pharmaceuticals, chemicals, and others.

The human health is deeply influenced by the type of nutrients ingested, therefore the demand for healthier foods has been increased. One of the current trends in the food industry is the use of prebiotics in functional foods, that is,

foods that offer health benefits that go beyond basic nutrition; Prebiotics are components present in these foods that are not digested by gastrointestinal enzymes, favoring the growth of the active microbiota in the intestine, and inhibiting the proliferation of pathogens. Inulin, galactooligosaccharides and fructooligosaccharides are also combined with probiotics for their potential synergistic action, and such combinations are called symbiotic.^[4,5]

Fructooligosaccharides (FOS) are widely known for their prebiotic properties, they are non-conventional sugars, represented mainly by kestose (GF2), nystosis (GF3) and 1- β -fructofuranosylmaltose (GF4), in which fructose units (F) are joined by β -type connections (2 $\rightarrow$ 1) and linked to a terminal glucose fraction (G) by α -type connections (2 $\rightarrow$ 1).^[6,7] The implementation of FOS in food can assist in strengthening the immune system, preventing tooth decay, improving mineral absorption, and reducing serum levels of total cholesterol and lipids.^[8] In addition, FOS do not interfere with the organoleptic properties of the products. They can be found in small amounts in fruits and vegetables; however, the amount is not sufficient to produce a prebiotic effect in the individual. Therefore, enzymes such as β -Fructofuranosidase and fructosyltransferases production

CONTACT Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa  romero.brandao@upe.br  Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Santo Amaro, Recife, Brazil.

© 2022 Taylor & Francis Group, LLC

F

Título: A novel β -fructofuranosidase produced by *Penicillium citreonigrum* URM 4459: purification and biochemical features

Publicado em: 29/12/2022

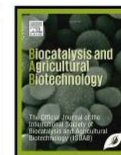
DOI: 10.1080/10826068.2022.2158472

Fator de Impacto da revista: 2.9 (Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022) **Qualis:** B1.



Contents lists available at ScienceDirect

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/bab>

Biotechnological purification of a β -fructofuranosidase (β -FFase) from *Aspergillus tamarii* kito: Aqueous two-phase system (PEG/Citrate) and biochemical characterization

Juanize Matias da Silva Batista^a, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa^{b,*},
Kethylen Barbara Barbosa Cardoso^a, Thiago Pajeú Nascimento^a, Wendell W.C. Albuquerque^c,
Márcia Nieves Carneiro da Cunha^a, Camila Souza Porto^d, Raquel Pedrosa Bezerra^a,
Ana Lucia Figueiredo Porto^a

^a Laboratory of Bioactives Technology (LABTECBIO), Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel Medeiros, S/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife, PE, Brazil

^b Laboratory of Advances in Protein Biotechnology (LABIOPROT), Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Santo Amaro, Recife, PE, Brazil

^c Goethe University Campus Riedberg, Campus Westend Theodor-W. Adorno-Platz 6 (PEG Building), 60323, Frankfurt Am Main, Germany

^d Federal University of Alagoas – UFAL, Av. Beira Rio, Penedo, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Extracellular enzyme
Prebiotics
Purification
Ultrasound
Biocatalysis

ABSTRACT

β -fructofuranosidases (EC3.2.1.26) are members of the GH32 family of glycoside hydrolases, which include more than 390 enzymes of vegetable and microbial origins, used in several biotechnological applications. Thus, this research aimed to produce a β -fructofuranosidase obtained by *Aspergillus tamarii* through solid state fermentation, and to purify by Aqueous Two-Phase System (ATPS). Summary results presented the optimal parameters to produce the β -fructofuranosidase used wheat bran as a substrate at 30 °C for 48 h, and purification process using ATPS with polyethylene glycol and sodium citrate (PEG/sodium citrate), where the β -fructofuranosidase preferably partitioned to the salt-rich phase, the best run (24% of PEG 400, 20% sodium citrate, pH 8) which presented a higher purification factor 6.42 with 12.39 U/mL activity and 352% yield. Optimum parameter was pH 5.15 and temperature of 55 °C, respectively. The purified enzyme showed excellent thermal stability and exhibited a half-life of 60 min at 65 °C. Kinetics results for enzyme showed for Sucrose substrate the enzyme showed K_m of 42.9 ± 2.21 mM and V_{max} of 180.2 ± 2.8 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein. Although V_{max} was the highest for 1-Kestose (219.4 ± 2.7 $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ of protein) the preferred substrate of *Aspergillus tamarii* β -fructofuranosidase (β -FFase) was Nystose (K_m of 3.8 ± 0.15 mM). SDS-PAGE revealed a single band of protein at ~66 kDa. Finally, this study demonstrated the potential of ATPS to purify a β -fructofuranosidase with application in biotechnological field aiming to functional foods.

1. Introduction

Microbial enzymes are a promising alternative for the biotechnology industry due to their high selectivity of the substrates used and products generated. They also have lower production costs, genetic manipulation capacity, operations under controllable conditions and represent an alternative renewable resource (Adrio and Demain, 2014).

The enzymatic market is promising, in 2015 it reached a mark of approximately \$4.6 billion and the estimate for 2021 is \$6.3 billion, totaling a growth of 4.7% in the 2016–2021 ranges. Thus, microbial en-

zymes are applied in different points of industrial, but are mostly used in beverage industry, followed by the dairy industry (Thapa et al., 2019).

However, the process of purifying microbial enzymes is still a challenge for the biotechnology industry, as there is a need to employ an easy-to-use, high purification factor and low-cost procedure (Mukherjee et al., 2019).

Aqueous two-phase system (ATPS) is usually created by the solution of two immiscible hydrophilic polymers (natural or synthetic) or by the combination of a polymer (polyethylene glycol, PEG) and a salt (e.g.

* Corresponding author. Laboratory of Advances in Protein Biotechnology, Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Santo Amaro, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: romero.brandao@upe.br, romero.brandao@outlook.pt (R.M. Pedrosa Brandão-Costa).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102070>

Received 13 December 2020; Received in revised form 12 June 2021; Accepted 18 June 2021

Available online 21 June 2021

1878-8181/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Título: Biotechnological purification of a β -fructofuranosidase (β -FFase) from *Aspergillus tamarii* kito: Aqueous two-phase system (PEG/Citrate) and biochemical characterization

Publicado em: 01/08/2021

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102070>

Fator de Impacto da revista: 4.0 Qualis: A3.



An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 3): e20200867 DOI 10.1590/0001-3765202120200867
 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

MICROBIOLOGY

Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation

FELYPE T.B. ROCHA, ROMERO M.P. BRANDÃO-COSTA, ANNA GABRIELLY D. NEVES, KETHYLEN B.B. CARDOSO, THIAGO P. NASCIMENTO, WENDELL W.C. ALBUQUERQUE & ANA LÚCIA F. PORTO

Abstract: Solid state fermentation is a promising technology largely used in biotechnology process and is a suitable strategy for producing low-cost enzymatic products. At the present study, a novel enzyme obtained through solid state fermentation using *Aspergillus sydowii* was herein purified and characterized. The fermentations used coffee ground residue as substrate and the crude enzyme was submitted through further purification steps of: acetonic precipitation, DEAE-Sephadex and Superdex G-75 column. Both crude and purified enzymes were submitted to biochemical characterization of their thermostability, optimal temperature and pH, effects of inhibitors and metal ions. A purified protease was obtained with yield of 5.9-fold and 53% recovery, with maximal proteolytic activity of 352.0 U/mL. SDS-PAGE revealed a band of protein at 47.0 kDa. The enzyme activity was abolished in the presence of phenyl-methyl sulfonyl fluoride and partially inhibited against Triton X-100 (78.0%). The optimal activity was found in pH 8.0 at 45°C of temperature. Besides, the enzyme showed stability between 35°C and 50°C. It was possible to determine appropriate conditions to the obtainment of thermostable proteases with biotechnological interest associated with a method that concomitantly shows excellent production levels and recovery waste raw material in a very profitable process.

Key words: *Aspergillus sydowii*, biotechnology, proteases, solid state fermentation, waste coffee residue.

INTRODUCTION

Agricultural waste recovery associated with the development of techniques of conversion of raw material into economically useful products makes research of bioconversion by microorganisms increasingly relevant. Production of proteases using solid substrates through fermentative processes is pointed out in the present study as a low-cost alternative for

waste recovery (Novelli et al. 2016, Albuquerque et al. 2020).

Proteases hydrolyze peptide bonds and provide essential modifications in proteins which are involved in the process of digestion, activation of enzymes, blood clotting and membrane transport. They have a variety of functions and represent approximately 60% of the enzyme world market, being often used in detergent, leather, pharmaceutical and food

An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 3)

Título: Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation

Publicado em: 2021

DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120200867>

Fator de Impacto da revista: 1.7

Qualis: A2.

DEPÓSITO DE PATENTE



05/11/2021 870210101941
09:34

29409161940874806

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 022189 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Título: PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE
PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacifica*

Processo: BR1020210221895

Data de depósito: 05/11/2021



07/11/2022 870220102972
15:03

29409161952295628

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2022 022600 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Título: PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA

Processo: BR1020220226008

Data de depósito: 07/11/2022



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 026983 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Título: PROCESSO DE ELABORAÇÃO E USO DE BIORREATOR SUSTENTÁVEL PARA
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Processo: BR1020220269831

Data de depósito: 29/12/2022



15/03/2023 870230022056
13:17

29409161958589062

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 004813 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Título: DISCOS DE CELULOSE IMPREGNADOS COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADA A EXTRATO VEGETAL PARA ATIVIDADE CUPINICIDA

Processo: BR1020230048137

Data de depósito: 15/03/2023



29/08/2023 870230076606
14:57

29409162304994969

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 017441 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br

Título: COMPOSTO BACTERICIDA PREPARADO EM GEL ENRIQUECIDO COM NANOPARTÍCULAS DE PRATA DE ORIGEM MICROBIANA

Processo: BR1020230174418

Data de depósito: 29/08/2023



23/08/2023 870230074688
15:11



29409162302766837

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 016980 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br

Título: BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLIZADO DE COLÁGENO

Processo: BR10202301698

Data de depósito: 23/08/2023

CAPÍTULO 2

MICROBIOLOGIA APLICADA AO TRATAMENTO DE FERIDAS: ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE MICROBIANO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Kétura Rhammá Cavalcante Ferreira¹
Kethylen Barbara Barbosa Cardoso²
Vinicius Breno Silva de Araújo³
Romualdo Brandão Costa Junior⁴
Juanize Matias da Silva Batista⁵
Ana Lúcia Figueiredo Porto⁶

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.2

¹ 1Centro de Biociências - CB, Universidade Federal de Pernambuco.

² 1Centro de Biociências - CB, Universidade Federal de Pernambuco.

³ 2Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁴ 2Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁵ 2Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁶ 3Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade de Pernambuco.

Título: Microbiologia Aplicada ao Tratamento de Feridas: Estratégias Para o Controle Microbiano e Cicatrização de Feridas

Livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde

Editora Rfb

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.2

ISBN: 978-65-85712-37-8

CAPÍTULO 5

MICORREMEDIAÇÃO: UMA ABORDAGEM SUSTENTÁVEL PARA TRATAR EFLUENTES DA INDÚSTRIA TÊXTIL

Anna Gabrielly Duarte Neves¹

Raphael Luiz Andrade Silva²

Adriane Caroline Batista Oliveira³

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso⁴

Ana Lúcia Figueiredo Porto⁵

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁶

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.5

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco

² Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁴ Centro de Biociências - CB, Universidade Federal de Pernambuco

⁵ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁶ Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Universidade de Pernambuco

Título: Micorremediação: uma Abordagem Sustentável para Tratar Efluentes da Indústria Têxtil

Livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações no meio ambiente

Editora Rfb

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.5

ISBN: 978-65-85712-37-8

CAPÍTULO 1

DA BANCADA AO MERCADO: INOVAÇÃO TECNOLÓGICA IMPULSIONANDO A MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

Isadora Mendes da Fonseca¹

Aline Ferreira Sobral²

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso³

Nilson Fernando Barbosa da Silva⁴

Thiago Pajeú Nascimento⁵

Raphael Luiz Andrade Silva⁶

Ana Lúcia Figueiredo Porto⁷

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁸

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.1

¹ Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade de Pernambuco.

² Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade de Pernambuco.

³ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁴ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

⁵ Campus Professora Cinobelina Elvas - Universidade Federal do Piauí.

⁶ Instituto de Ciências Biológicas - ICB, Universidade de Pernambuco.

⁷ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁸ Campus Professora Cinobelina Elvas - Universidade Federal do Piauí.

Título: Da Bancada ao Mercado: Inovação Tecnológica Impulsionando a Microbiologia Industrial

Livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações no meio ambiente

Editora Rfb

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.1

ISBN: 978-65-85712-37-8

OUTRAS PUBLICAÇÕES E ATIVIDADES

Resumos Publicados

1. **CARDOSO, K. B. B.**; RAMOS, D. G. ; NASCIMENTO, T. P. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; PORTO, A. L. F. . 'PROTEASE COLAGENOLÍTICA PRODUZIDA POR MUCOR SUBITILISSIMUS UCP1262.. In: III Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line, 2023, Fortaleza - CE. III Congresso Brasileiro de Biotecnologia On-line, 2023. v. 1. p. 1-5.
2. SOBRAL, A. F. ; FONSECA, I. M. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; NASCIMENTO, MARIA CLARA ; SILVA, R. L. A. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . PERSPECTIVAS FÍSICO-QUÍMICAS NA PURIFICAÇÃO DE PROTEASES PARA APLICAÇÕES INDUSTRIAIS: UMA REVISÃO.. In: 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE, 2023, Recife. 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE. Recife: UFRPE, 2023. v. 1. p. 1.
3. NASCIMENTO, B. E. G. ; SILVA, M. R. O. B. ; RAMOS, D. G. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; SOUZA, K. L. ; BEZERRA, RAQUEL PEDROSA ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; VIANA, D. A. . RELATO DE EXPERIÊNCIA COMO MONITORA DO I CURSO DE BIOTECNOLOGIA APLICADA À SAÚDE E MEIO AMBIENTE.. In: 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE, 2023, Recife. 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE, 2023. p. 1.
4. SOUZA, K. L. ; SILVA, M. R. O. B. ; NASCIMENTO, B. E. G. ; ANGELIM, J. L. C. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . STREPTOMYCES SPP. E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS: UMA REVISÃO DE LITERATURA. In: 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE, 2023, Recife. 6º Encontro de Química e Formação Docente da UFRPE. Recife: UFRPE, 2023. v. 1. p. 1.
5. NASCIMENTO, THIAGO P. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BARROS, A. C. S. ; SILVA, M. J. C. ; BARBOSA-FILHO, J. P. M. ; PORTO, ANA LÚCIA F. . Efeito da radiação gama sobre uma protease fibrinolítica produzida por um fungo isolado de solo da Caatinga e o efeito de co-fatores sobre a atividade enzimática pós-irradiação. In: I Congresso Nacional de Ciências Aplicada à Farmácia, 2023. I Congresso Nacional de Ciências Aplicada à Farmácia, 2023.

6. SILVA, J. B. ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** ; MIRANDA, L.M.R. ; SILVA, R. L. A. .
TECNOLOGIA EDUCACIONAL E APRENDIZAGEM ATIVA: EXPLORANDO A
UTILIZAÇÃO DE MAPAS MENTAIS NO CANVA PARA O ESTUDO DA
DIVERSIDADE DE FUNGOS. In: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023,
Recife-PE. ENSINO E DIVULGAÇÃO DE MICOLOGIA, 2023.
7. LIMA, A. D. O. ; ALVES, D. G. ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** ; SILVA, R. L. A. ;
MARQUES, D. V. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . APLICAÇÃO DE
NANOCARREADORES PARA OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO TÓPICO DE
INFECÇÕES POR *Candida albicans*. In: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023.
MICOLOGIA E SAÚDE, 2023.
8. VASCONCELLOS, C. E. A. ; NASCIMENTO, M. C. ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** ;
SILVA, R. L. A. ; PORTO, A. L. F. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . O POTENCIAL
ANTIFÚNGICO DE LECTINAS EXTRAÍDAS DE PLANTAS: UMA BREVE REVISÃO.
In: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023, Recife-PE. FUNGOS NA
BIOTECNOLOGIA, 2023.
9. SILVA, J. B. ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** ; SILVA, P. G. O. C. ; NEVES, A. G. D. .
DESENVOLVIMENTO DE MODELOS FÚNGICOS NA SALA DE AULA:
EXPLORANDO A CULTURA MAKER COMO FERRAMENTA DE APRENDIZADO
ATIVO E SIGNIFICATIVO. In: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023,
Recife-PE. ENSINO E DIVULGAÇÃO DE MICOLOGIA, 2023.
10. BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; ARAUJO, V. F. ; BATISTA, J. M. S. ; COSTA-JUNIOR, R.
B. ; BEZERRA, R. P. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; PORTO, A. L. F. . Anticoagulant effect of
Bothrops leucurus crude venom: Coagulation pathway.. In: II International Workshop on
Cellular and Molecular Biology, 2021, Recife. II International Workshop on Cellular and
Molecular Biology., 2021. v. 1. p. 1-4.
11. NASCIMENTO, G. L. S. ; ARAUJO, Vivianne Ferreira ; ROLIM, T. L. V. ; Santos,
Micheline Thais dos ; **CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa** ; NASCIMENTO, Thiago
Pajeú ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; BATISTA, J. M. S. ; PORTO, A. L. F. . O
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS FILAMENTOSOS NA SÍNTESE
VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: UMA BREVE REVISÃO. In: III
SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO, 2021, Garanhuns. A
CIÊNCIA INTEGRADA À SOCIEDADE EM BUSCA DE NOVAS PERSPECTIVAS,

- 2021.
12. **CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa**; NASCIMENTO, T. P. ; BATISTA, J. M. S. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; PORTO, A. L. F. . PRODUÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS POR COGUMELOS. In: III SECAP, 2021, Garanhuns. A CIÊNCIA INTEGRADA À SOCIEDADE EM BUSCA DE NOVAS PERSPECTIVAS, 2021.
 13. SILVA, A. C. B. E. ; NASCIMENTO, M. C. ; **CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa** ; BATISTA, J. M. S. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; PORTO, A. L. F. ; NASCIMENTO, T. P. . O GÊNERO ABSIDIA E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. In: III SECAP, 2021, Garanhuns. A CIÊNCIA INTEGRADA À SOCIEDADE EM BUSCA DE NOVAS PERSPECTIVAS, 2021.
 14. BARRETO, M. E. L. ; SILVA, L. N. ; NASCIMENTO, T. P. ; BATISTA, J. M. S. ; BARROS, N. ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** ; VIANA, D. A. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . ULTRASSOM DE BAIXA FREQUÊNCIA NA EFICIÊNCIA CATALÍTICA DE ENZIMAS PRODUZIDAS POR FUNGOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA. In: III SECAP, 2021, Garanhuns. A CIÊNCIA INTEGRADA À SOCIEDADE EM BUSCA DE NOVAS PERSPECTIVAS, 2021.
 15. **CARDOSO, K. B. B.**; SANTOS, S. M. ; BATISTA, J. M. S. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; PORTO, ANA LÚCIA F. . Production of lectins from Brazillian plant seeds: A review. In: 2nd Internationa Workshop on Cellular and Molecular Biology, 2021, Recife. 2nd Internationa Workshop on Cellular and Molecular Biology, 2021. v. 1. p. 1.
 16. BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; ARAUJO, V. F. ; BATISTA, J. M. S. ; COSTA-JUNIOR, R. B. ; NASCIMENTO, T. P. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BEZERRA, RAQUEL PEDROSA ; PORTO, ANA LÚCIA F. . Anticoagulant effect of Bothrops leucurus crude venom: Coagulation pathway.. In: 2nd Internationa Workshop on Cellular and Molecular Biology, 2021, Recife. 2nd Internationa Workshop on Cellular and Molecular Biology, 2021. v. 1. p. 1.
 17. FONSECA, I. M. ; RAMOS, D. G. ; SOBRAL, A. F. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; DUARTE, C. A. L. ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . TESTE DE EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO MEIO VISANDO A OBTENÇÃO DE PROTEASES MICROBIANAS.. In: XXII Jepex, 2023, Recife-PE. XXII JEPEX UFRPE - Democracia, Educação e Sustentabilidade no Mundo Figital, 2021.

18. SILVA, N. F. B. ; NASCIMENTO, M. C. ; BATISTA, J. M. S. ; SILVA, R. L. A. ;
CARDOSO, K. B. B. ; BRANDÃO-COSTA, ROMERO M.P. . MICRORGANISMOS QUERATINOFÍLICOS COMO ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE RESÍDUOS PROVENIENTES DA AVICULTURA. In: XXII Jepex, 2023, Recife-PE. XXII JEPEX UFRPE - Democracia, Educação e Sustentabilidade no Mundo Figital, 2021.
19. SILVA, N. F. B. ; SILVA, R. L. A. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BATISTA, J. M. S. ;
BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MICRORGANISMOS QUERATINOFÍLICOS PARA TRATAMENTO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS PROVENIENTE DA INDÚSTRIA AVÍCOLA. In: IV Simprot, 2023, Recife-PE. o IV Simpósio de Proteínas Bioativas da Universidade Federal de Pernambuco,, 2023.
20. **CARDOSO, K. B. B.**; BARBOSA FILHO, J. P. M. ; MIRANDA, V. M. A. M. ; BATISTA, Juanize Matias da Silva ; NASCIMENTO, Thiago Pajeú ; Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão . CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE UMA PROTEASE COLAGENOLÍTICA IMOBILIZADA EM FILME DE QUITOSANA PARA FUTURA APLICAÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.. In: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas, 2023, Natal. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.
21. BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; BARBOSA FILHO, J. P. M. ; FREITAS, K. H. ; PORTO, ANA LÚCIA F. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BATISTA, Juanize Matias da Silva ;
NASCIMENTO, THIAGO P. . SOLAMENTO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CELULASES ORIUNDAS FUSARIUM MONILIFORME.. In: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.
22. REGIS, V. G. V. A. ; MIRANDA, V. M. A. M. ; BARBOSA FILHO, J. P. M. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BATISTA, J. M. S. ; PORTO, A. L. F. ; NASCIMENTO, T. P. ;
BRANDÃO-COSTA, R. M. P. . PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS POR UM FUNGO FILAMENTOSO UTILIZANDO BORRA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO. In: II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, III Congresso Brasileiro de Farmácia Estética, Simpósio Brasileiro sobre Clínicas e Consultórios Farmacêuticos, Encontro Brasileiro de Farmacêuticos em Serviços de Vacinação, 2022. v. 1. p. 1-4.
23. BRANDÃO-COSTA, R. M. P. ; ARAUJO, V. F. ; BATISTA, J. M. S. ; COSTA-JUNIOR, R.

B. ; NASCIMENTO, T. P. ; **CARDOSO, K. B. B.** ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. .
 Anticoagulant effect of Bothrops leucurus crude venom: Coagulation pathway. In:
 International workshop on cellular and molecular biolog. In: II International workshop on
 cellular and molecular biology, 2021. II International workshop on cellular and molecular
 biology, 2021. v. 1. p. 1-4.

Organização de livros

0. OLIVEIRA, VAGNE DE MELO (Org.) ; NASCIMENTO, THIAGO P. (Org.) ;
 BATISTA, Juanize Matias da Silva (Org.) ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** (Org.) ;
 BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa (Org.) ; PORTO, ANA LÚCIA F. (Org.) .
 BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL. 1. ed. Belém: RBF, 2022. v. 1. 43p .
1. PORTO, A. L. F. (Org.) ; SANTANA, B. F. M. (Org.) ; MARQUES, D. A. V. (Org.) ;
 BARBOSA FILHO, J. P. M. (Org.) ; BATISTA, J. M. S. (Org.) ; **CARDOSO, K. B. B.**
 (Org.) ; BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa (Org.) ; NASCIMENTO, T. P.
 (Org.) . BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA-VOL 2. 2. ed. , 2022.
2. PORTO, ANA LÚCIA F. (Org.) ; SANTANA, B. F. M. (Org.) ; MARQUES, D. A. V.
 (Org.) ; BARBOSA FILHO, J. P. M. (Org.) ; BATISTA, J. M. S. (Org.) ; **CARDOSO, K.
 B. B.** (Org.) ; SILVA, M. R. O. B. (Org.) ; BRANDÃO-COSTA, R. M. P. (Org.) ;
 NASCIMENTO, T. P. (Org.) . BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA-VOL 1. 1. ed. ,
 2022.
3. OLIVEIRA, VAGNE DE MELO (Org.) ; NASCIMENTO, T. P. (Org.) ; BATISTA, J. M.
 S. (Org.) ; **CARDOSO, KETHYLEN B.B.** (Org.) ; BRANDÃO-COSTA, Romero
 Marcos Pedrosa (Org.) ; PORTO, ANA LÚCIA F. (Org.) . Biotecnologia na saúde. 1. ed.
 Belém: RBF, 2022. v. 1. 51p .

Organização de eventos

4. OLIVEIRA, V. M. ; **CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa** ; PORTO, Ana Lucia
 Figueiredo . II Webinário de Biotecnologia Aplicada a Pesca e Aquicultura (II WBAPA).
 2021. (Outro).