



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

KÉTURA RHAMMÁ CAVALCANTE FERREIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FILME POLISSACARÍDICO E
COLAGENASE MICROBIANA NO PROCESSO CICATRICIAL**

Recife

2024

KÉTURA RHAMMÁ CAVALCANTE FERREIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FILME POLISSACARÍDICO E COLAGENASE
MICROBIANA NO PROCESSO CICATRICIAL**

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

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Couto Teixeira

Coorientadores:

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Ferreira, Ketura Rhamma Cavalcante.

Potencial biotecnológico de filme polissacarídico e collagenase microbiana no processo cicatricial / Ketura Rhamma Cavalcante Ferreira. - Recife, 2024.
129f.: il.

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

Orientação: José Antonio Couto Teixeira.

Coorientação: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientação: Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Filme de polissacarídeo; 2. Collagenase; 3. Streptomyces parvulus. I. Teixeira, José Antonio Couto. II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo. III. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CDD 615.3

KÉTURA RHAMMÁ CAVALCANTE FERREIRA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FILME POLISSACARÍDICO E COLAGENASE
MICROBIANA NO PROCESSO CICATRICIAL**

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

Aprovado em: 02/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Couto Teixeira (Orientador)
Universidade do Minho

Prof. Dr^a. Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wendell Wagner Campos Albuquerque (Examinador Externo)
Justus Liebig Universität Giessen

Prof. Dr. . Thiago Pajeú Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr^a. José Manoel Wanderley Duarte Neto (Examinador Externo)
Universitat Politècnica de Catalunya

À minha amada mãe Maria Eleane Cavalcante, por todo o amor, dedicação, ensinamento,
valores e exemplo de mulher e humanidade.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar e dar forças para seguir.

À minha mãe Maria Eleane, por ofertar apoio em cada passo dessa longa jornada. Foram muitos percalços, mas ela sempre esteve presente para me amparar e me encorajar.

À minha sobrinha Luísa, mesmo com sua pequenez, me fez ser forte e corajosa.

Ao meu esposo Everton, por todo companheirismo, respeito e compreensão.

À minha família, de sangue ou a que escolhi, por me mostrar o poder de ser resiliente.

Às minhas gordas: Luna, Sol, Flor e Mia. Elas que por diversos dias e madrugadas foram companheiras leais e sempre me ofertaram amor e a calma que eu precisava. Ao meu eterno amor, Mike. Mesmo com sua ausência física, é presença constante em meus pensamentos.

À professora Ana Lúcia Porto, pela acolhida, atenção e disponibilidade. Por me encorajar a buscar novas formas de melhorar como pessoa e discente.

Ao professor Romero Brandão, pelo incentivo diário e leveza que me auxiliou em todo o processo. Seu carisma e empatia foram fundamentais nesta jornada.

Ao professor José Teixeira, pela acolhida e auxílio, on-line ou presencialmente nos meses de convivência em Portugal.

Aos amigos que ganhei no dia a dia de laboratório (Labtec bio – UFRPE e Libas – UPE). Nos laboratórios encontrei pessoas solícitas, dedicadas, e que em várias ocasiões pausaram seus afazeres para me ensinarem ou me auxiliarem em algum experimento, em especial Kethylen, Anna Gabrielly e Juanize.

Aos amigos que o doutorado sanduíche me proporcionou, por compartilhar comigo das dores e das alegrias do intercâmbio, em especial aos que dividiram a mesma casa, Leandro Paes e Leandro Lins. E aqueles que fizeram dessa jornada em Portugal mais leve: Loreta, Isabela, Kamilla, Luiz e Larissa.

Aos amigos que se fizeram presentes nesses anos de doutorado, em especial Adryanne e Admilson que mesmo em programas distintos de doutorado, eram os companheiros de lamúrias e sorrisos dessa trajetória.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada a Saúde, em especial ao secretário Fábio Costa, sempre solícito e atencioso.

À Universidade do Minho, em Portugal, por me acolher e permitir que eu realizasse alguns dos testes necessários para a conclusão da tese de doutorado.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo provimento da bolsa do doutorado, a qual permitiu a concretização de todo o projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo provimento da bolsa de doutorado sanduíche, a qual permitiu aprofundar meus conhecimentos e viver experiências únicas.

Aos professores participantes da banca pela presença e contribuições para este trabalho.

Aos que acreditaram em mim, quando eu mesma já não acreditava, espero retribuir a confiança depositada. É com muito orgulho que concluo mais uma etapa da minha vida.

A palavra de ordem é gratidão!

“If you can dream it, you can do it.”

Walt Disney

RESUMO

Os filmes de polissacarídeos possuem potencial biotecnológico, oferecendo biocompatibilidade e biodegradabilidade que favorecem a cicatrização de feridas. Tais filmes são veículos eficazes para a entrega de agentes bioativos, como as collagenases, que são comumente utilizadas no tratamento de feridas e queimaduras por atuarem como agentes de desbridamento enzimático, agindo nos eventos celulares, até a cicatrização efetiva da ferida. O uso de filme de polissacarídeo de *Cassia grandis* com collagenases microbianas imobilizadas é uma abordagem promissora na biotecnologia e saúde, em razão do amplo potencial terapêutico e da habilidade em estabelecer um ambiente propício para o processo de cicatrização. Esta pesquisa teve como objetivo investigar as propriedades físico-químicas de filmes de polissacarídeos de *Cassia grandis* com collagenase imobilizada de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573). A Galactomanana foi extraída de sementes de *Cassia grandis* para produção de filmes com 0,8% (p/v) de galactomanana e 0,2% (v/v) de glicerol com ou sem a incorporação de collagenases. A collagenase de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) (0,2%) (m/v) e a collagenase comercial (0,2%) (m/v) foram adicionadas às soluções formadoras de filmes, e deixadas em agitação magnética (500 rpm) por 5h, em temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). Os filmes foram submetidos a análises físico-químicas: espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura, análise termogravimétrica, cor e opacidade, teor de umidade, permeabilidade ao vapor de água, espessura, ângulo de contato e propriedades mecânicas. Os resultados mostraram espectros de FTIR semelhantes a galactomanana, indicando grupos funcionais hidroxila (O-H), carbonila (C=O), hidrocarbonetos (C-H), ligações glicosídicas, presença de carboidratos e amidas, além da confirmação da existência de proteínas imobilizadas no filme de polissacarídeo. A imobilização da collagenase obtida de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) aumentou a rugosidade da superfície observada na microscopia eletrônica de varredura e indicou uma melhor viabilidade, mediante a análise termogravimétrica. Todos os filmes exibiram uma cor amarelada brilhante e com leve opacidade. Testes mecânicos revelaram diminuição da rigidez em filme de polissacarídeo com collagenase comercial em relação ao filme de polissacarídeo com collagenase obtida do *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573), e houve aumento da deformabilidade em ambos os filmes. O uso de filmes de polissacarídeos derivados da planta *Cassia grandis* com a imobilização de collagenase microbiana, apresentam potencial para aplicações farmacológicas, em especial para a cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Filme de polissacarídeo; Collagenase; *Streptomyces parvulus*; Imobilização.

ABSTRACT

Polysaccharide films possess biotechnological potential, offering biocompatibility and biodegradability that promote wound healing. These films serve as effective vehicles for delivering bioactive agents such as collagenases, which are commonly used in the treatment of wounds and burns due to their role as enzymatic debriding agents, facilitating cellular events crucial for effective wound healing. The use of *Cassia grandis* polysaccharide films with immobilized microbial collagenases is a promising approach in biotechnology and healthcare, given their broad therapeutic potential and ability to create a conducive environment for the healing process. This research aimed to investigate the physicochemical properties of *Cassia grandis* polysaccharide films with immobilized collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573). Galactomannan was extracted from *Cassia grandis* seeds to produce films containing 0.8% (w/v) galactomannan and 0.2% (v/v) glycerol, with or without the incorporation of collagenases. Collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) (0.2%) (w/v) and commercial collagenase (0.2%) (w/v) were added to the film-forming solutions and subjected to magnetic stirring (500 rpm) for 5 hours at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$). The films underwent physicochemical analyses, including Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy, thermogravimetric analysis, color and opacity, moisture content, water vapor permeability, thickness, contact angle, and mechanical properties. The FTIR spectra showed similarities to galactomannan, indicating the presence of hydroxyl (O-H), carbonyl (C=O), hydrocarbon (C-H), glycosidic bonds, carbohydrates, and amides, as well as confirming the presence of immobilized proteins within the polysaccharide film. The immobilization of collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) increased surface roughness, as observed through scanning electron microscopy, and indicated improved viability based on thermogravimetric analysis. All films displayed a bright yellow color with slight opacity. Mechanical tests revealed a decrease in stiffness in the polysaccharide film with commercial collagenase compared to the film with collagenase from *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573), along with an increase in deformability in both films. The use of polysaccharide films derived from *Cassia grandis* with immobilized microbial collagenase shows potential for pharmacological applications, particularly in wound healing.

Keywords: Polysaccharide film; Collagenase; *Streptomyces parvulus*; Immobilization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 -	Principais agentes causadores de queimaduras	20
Figura 2 -	Alterações na pele desencadeadas por queimaduras. Observa-se na figura ilustrativa a pele íntegra (a), queimadura de primeiro grau (b), queimadura de segundo grau (c), e queimadura de terceiro grau (d)	21
Figura 3 -	Imagem ilustrativa das fases do processo cicatricial: hemostasia (a), fase inflamatória (b), fase proliferativa (c) e fase de remodelação (d)	24
Figura 4 -	Floração (a), vagem (b) e semente (c) da árvore de <i>Cassia grandis</i> (c)	26
Figura 5 -	Métodos de imobilização enzimática	29
Figura 6 -	Degradação do colágeno por ação da collagenase e protease collagenolítica	32
Figura 7 -	Imagem de uma placa contendo o <i>Streptomyces parvulus</i> (DPUA 1573) visualizado em microscópio óptico	35

CAPÍTULO I

Figura 1 -	Processo de cicatrização após uma lesão tecidual	62
Figura 2 -	Representação gráfica da atuação do colágeno e de peptídeos de colágeno em diferentes fases da regeneração tecidual	63
Figura 3 -	Representação gráfica das estruturas poliméricas	68

CAPÍTULO II

Figure 1 -	SEM images showing the surface structure of galactomannan film with and without bioactive compound incorporations	82
Figure 2 -	Variation in effective coefficients for WVP in polysaccharide films related to relative humidity at 20 °C	83
Figure 3 -	FTIR Spectra of the polysaccharide films after the incorporation of commercial collagenase enzymes and collagenase produced using <i>Streptomyces parvulus</i>	84

Figure 4 -	<i>FTIR Spectra (before and after UV exposure) of the polysaccharide films (a) polysaccharide film with commercial collagenase enzyme (b) and polysaccharide film with collagenase produced using Streptomyces parvulus (c)</i>	84
Figure 5 -	<i>Thermogravimetric analysis of the polysaccharide films (a), polysaccharide film with commercial collagenase enzyme (b) and polysaccharide film with collagenase produced using Streptomyces parvulus (c)</i>	86
Figure 6 -	<i>Representative image of the galactomannan film with immobilized collagenase obtained Streptomyces parvulus on black (a) and white (b) background</i>	87

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 -	Enzimas imobilizadas em filmes de polissacarídeos com o objetivo de cicatrização de feridas	30
Tabela 2 -	Espécie de <i>Streptomyces</i> produtoras de collagenases	34

CAPÍTULO II

Table 1 -	<i>Thickness and moisture content for the polysaccharide films before and after immobilization (values expressed as average $\pm$ standard deviation)</i>	82
Table 2 -	<i>Contact angle for the polysaccharide films before and after immobilization with enzymes (values expressed as average $\pm$ standard deviation)</i>	83
Table 3 -	<i>Color parameters L^* (luminosity), a^* ($-a^*$ = greenness and $+a^*$ = redness), b^* ($-b^*$ = blueness and $+b^*$ = yellowness) and Y (opacity) for the polysaccharide films before and after immobilization (values expressed as average $\pm$ standard deviation)</i>	87
Table 4 -	<i>Effect of concentration on Young's modulus (YM), tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of the films (w/v) films before and after immobilization of collagenases in the filmforming mixture</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPUA	Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas
EB	<i>Elongation break</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
MC	<i>Moisture content</i>
ml	Mililitro
ODS	Objetivos do Desenvolvimento Sustentável
PCF	<i>Polysaccharide film with commercial collagenase enzyme</i>
PF	<i>Polysaccharide film</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SCF	<i>Polysaccharide film with collagenase obtained from Streptomyces parvulus</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
TGA	<i>Thermogravimetric Analysis</i>
TS	<i>Tensile strength</i>
UV	<i>Ultraviolet radiation</i>
WVP	<i>Water Vapor Permeability</i>
YM	<i>Yong's modulus</i>

SUMÁRIO

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 PROBLEMÁTICA DOS QUEIMADOS NO BRASIL E NO MUNDO	19
3.2 QUEIMADURAS.....	20
3.3 PROCESSO CICATRICIAL.....	22
3.4 POLISSACARÍDEO DO TIPO GALACTOMANANA.....	25
3.5 FILME DE POLISSACARÍDEO	27
3.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM FILMES DE POLISSACARÍDEOS PARA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	28
3.7 COLAGENASES	31
3.8 MICRORGANISMO PRODUTOR DE COLAGENASE.....	32
3.9 REFERÊNCIAS	36
4 RESULTADOS.....	53
 CAPÍTULO I	 53
MICROBIOLOGIA APLICADA AO TRATAMENTO DE FERIDAS: ESTRATÉGIAS PARA O CONTROLE MICROBIANO E CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	53
 CAPÍTULO II.....	 76
PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A BIOACTIVE POLYSACCHARIDE FILM FROM <i>Cassia grandis</i> WITH IMMOBILIZED COLLAGENASE FROM <i>Streptomyces Parvulus</i> (DPUA/1573)	76
 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 95
APÊNDICE A	96
ANEXO A.....	101
ANEXO B.....	105

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1 INTRODUÇÃO

As queimaduras são uma das principais causas de morte no mundo, conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Arruda, 2017; Guest *et al.*, 2020). Estima-se no Brasil, que aproximadamente 1 milhão de pessoas a cada ano sejam acometidas por algum tipo de queimadura, desses aproximadamente 2.500 irão a óbito em decorrência das lesões, sendo a queimadura uma das principais causas externas de mortalidade. Tais lesões são graves e impõem um grande desafio aos sistemas de saúde devido à complexidade de seu tratamento e aos altos custos envolvidos (Bezerra *et al.*, 2023).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) enfrenta um ônus financeiro considerável com o atendimento a pacientes queimados, incluindo gastos com hospitalização prolongada, cirurgias reconstrutivas, tratamentos intensivos e reabilitação. Além dos custos diretos com cuidados médicos, há também despesas indiretas relacionadas à perda de produtividade e impacto socioeconômico para os pacientes e suas famílias (Santos *et al.*, 2023; Daronch *et al.*, 2023; Araújo *et al.*, 2023; Oh *et al.*, 2023).

A implementação de tratamentos mais eficientes e acessíveis são cruciais para reduzir esses custos e melhorar os resultados clínicos, aliviando assim a pressão sobre o sistema de saúde pública brasileiro (Nigro *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2023).

A comunidade internacional estabeleceu os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), incluindo o ODS 15, que visa proteger, restaurar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres e é crescente a busca por alternativas sustentáveis em diversas áreas, incluindo a indústria de materiais. Dentre elas, o uso de princípios bioativos naturais, que envolve a extração e utilização de compostos provenientes de fontes naturais, como plantas e microrganismos, para desenvolver produtos com aplicações diversas (Gora *et al.*, 2022; Arora, 2023; Valladares, 2023; Ponphaiboon *et al.*, 2023).

A utilização de curativos derivados da biodiversidade biológica, como mel, própolis, extratos vegetais e polissacarídeos de algas e sementes, apresenta uma abordagem promissora na cicatrização de feridas (Elfawy *et al.*, 2023; El-Sherbeni & Negm, 2023; Ajayi *et al.*, 2023).

Ao longo do tempo, diversos curativos elaborados a partir de polímeros naturais têm sido empregados com o intuito de mitigar o impacto ambiental dos resíduos e minimizar a toxicidade para os pacientes. Esses curativos demonstram uma permeabilidade adequada,

oferecem proteção antimicrobiana e promovem a aceleração da cicatrização, sem provocar efeitos citotóxicos (Costa *et al.*, 2023; Sheokand *et al.*, 2023; Koshy *et al.*, 2023). Além disso, certos polímeros desempenham um papel crucial nos processos de remodelação tecidual e reepitelização durante o processo de cicatrização (Costa *et al.*, 2023).

A *Cassia grandis* é um polissacarídeo de origem vegetal popularmente conhecida como cássia-rosa, é muito utilizada na medicina tradicional e em atividades farmacológicas (Alhawarri *et al.*, 2023). As sementes dessa planta contêm um endosperma gomoso que pode servir como fonte de galactomanana, matéria-prima considerada ecologicamente sustentável, de baixo custo e atóxica, sendo reconhecida por sua segurança. O galactomanano tem a capacidade de ser apresentado tanto na forma de solução quanto de gel, o que o torna versátil em diversas aplicações, facilitando seu consumo em larga escala. Além de apresentarem a capacidade de formar filmes de polissacarídeos, os quais podem encapsular e liberar compostos bioativos (Albuquerque *et al.*, 2013; Albuquerque *et al.*, 2017).

Os filmes de polissacarídeos são veículos promissores na entrega de agentes bioativos, como as collagenases. As collagenases são enzimas capazes de degradar o colágeno, que auxiliam na remodelação tecidual e regeneração da pele (Oliveira *et al.*, 2017; Ferreira, Wanderley & Porto, 2022; Slovakova *et al.*, 2022; Herman, Niranjana & Grover, 2020). Ao imobilizar a collagenase no filme de polissacarídeo, as collagenases podem ser liberadas de forma controlada no local da ferida, o que poderá gerar uma degradação do colágeno excessivo e facilitar a regeneração tecidual. Assim, minimizando o risco de cicatrizes hipertróficas ou quelóideanas (Agustina, Miatmoko & Hariyadi, 2023; Sanjanwala *et al.*, 2022).

Esses filmes são projetados para serem aplicados diretamente sobre a ferida, onde a collagenase incorporada facilita a degradação de tecido necrosado e promove a formação de novo tecido. A aplicação de filmes de polissacarídeo com collagenase incorporada para a cicatrização de feridas representa um avanço significativo na medicina regenerativa, sendo o objeto de estudo da presente tese.

A tese é constituída de três capítulos. No capítulo I encontra-se a Revisão Sistemática da Literatura sobre filmes de polissacarídeos com compostos imobilizados para a cicatrização, o capítulo II consta de um capítulo de livro sobre o tratamento de feridas, e no capítulo III, o artigo de caracterização do filme de polissacarídeo com collagenase obtida de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) imobilizada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar físico-quimicamente o filme de polissacarídeo de *Cassia grandis* com collagenase imobilizada obtida de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) e avaliar o seu potencial biotecnológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir filme de polissacarídeo a partir de sementes de *Cassia grandis*;
- Produzir e purificar collagenase obtida de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573);
- Imobilizar a collagenase de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) e collagenase comercial em filme de polissacarídeo obtido de sementes de *Cassia grandis*;
- Caracterizar o filme de polissacarídeo obtido de sementes de *Cassia grandis* com collagenases imobilizadas de acordo com suas propriedades físico-químicas e mecânicas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PROBLEMÁTICA DOS QUEIMADOS NO BRASIL E NO MUNDO

As queimaduras representam um desafio significativo de saúde pública no Brasil e no mundo, com características epidemiológicas variadas. No Brasil, estudos têm demonstrado que as queimaduras são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com uma alta taxa de mortalidade hospitalar, especialmente em pacientes com mais de 70% da superfície corporal queimada (Carvalho *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2017).

O tratamento do paciente queimado envolve um custo elevado em razão de longos períodos de hospitalização, além disso pode culminar com sequelas para os sobreviventes. O impacto econômico das queimaduras em todo o mundo é substancial, com perdas de bem-estar estimadas em 0,09% do PIB em 2019, afetando desproporcionalmente os países de baixa e média renda (Gerstl *et al.*, 2021).

O tempo de recuperação para pacientes queimados pode ser extenso, variando de semanas a vários meses, dependendo da gravidade da queimadura. Durante esse período, os pacientes geralmente enfrentam múltiplas cirurgias, enxertos de pele ou desbridamento da ferida, fisioterapia intensiva e cuidados contínuos para prevenir infecções e promover a cicatrização adequada (Mego *et al.*, 2022; Sljivic *et al.*, 2022). Tal necessidade, culmina com a ocupação de leitos hospitalares e recursos humanos por períodos prolongados, limitando a capacidade do sistema de saúde de atender a outros pacientes (Little & Mason, 2024). Além disso, os pacientes frequentemente enfrentam a perda temporária ou permanente de habilidades funcionais, afetando sua capacidade laborativa e cotidiana (Verma *et al.*, 2024; Cukor *et al.*, 2015).

As sequelas das queimaduras são outro aspecto crítico. Cicatrizes extensas, contraturas e deformidades físicas são comuns nos pacientes queimados, exigindo intervenções cirúrgicas adicionais e reabilitação a longo prazo (Ali & Ali, 2022). O impacto psicológico é igualmente significativo, pois alguns pacientes desenvolvem transtornos como ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático (Gu, Ran & Li, 2023; Chaudhry *et al.*, 2023). A estigmatização social e as barreiras para reintegração no ambiente de trabalho e na vida social podem dificultar ainda mais a recuperação completa do indivíduo. Portanto, além dos custos médicos diretos, há custos sociais e econômicos indiretos significativos associados à recuperação e reabilitação de pacientes queimados, ressaltando a urgência para estratégias eficazes de prevenção e tratamento para minimizar as sequelas provenientes das queimaduras (Potter *et al.*, 2023; Farzan *et al.*, 2023; Turgeon *et al.*, 2023).

3.2 QUEIMADURAS

A queimadura é caracterizada por uma destruição parcial ou total da barreira epitelial, causada por agentes térmicos, químicos, elétricos, radioativos ou ainda por fricção (Zwierello *et al.*, 2023; Metsavaht, 2017). As queimaduras térmicas são ocasionadas através do contato com fontes de calor, como fogo, líquidos quentes, superfícies quentes ou vapor quente. As queimaduras químicas são causadas por substâncias corrosivas, como ácidos e bases fortes. Já as queimaduras elétricas resultam do contato com correntes elétricas, as quais podem causar danos internos extensos e queimaduras na pele. Há ainda as queimaduras por radiação, mediante exposição prolongada a radiação solar, ultravioleta ou ionizante, e as queimaduras por fricção, ocasionadas pelo atrito intenso contra a pele, comum em acidentes de trânsito (Figura 1) (Boissiere *et al.*, 2020; Metsavaht, 2017; Magnani, Sassi e Andrade, 2019; Santos, 2014).

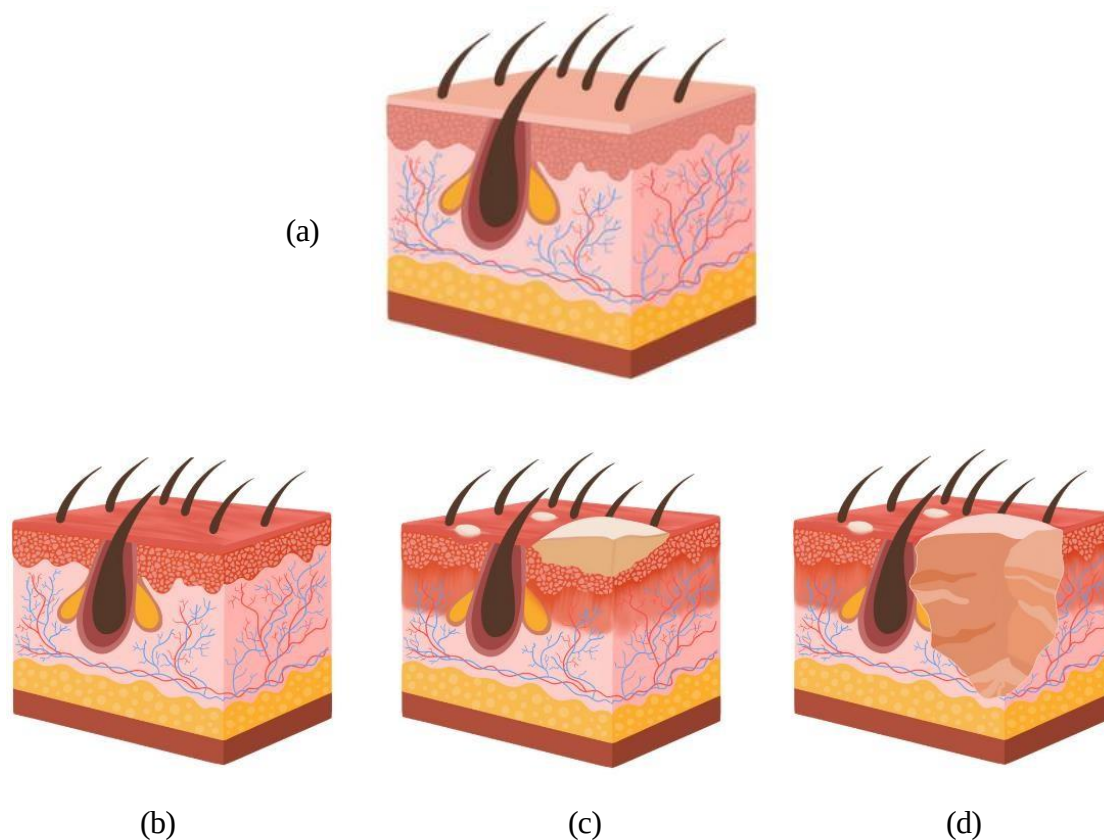
Figura 1 – Principais agentes causadores de queimaduras



Fonte: autora, 2024.

As principais causas de queimaduras no Brasil são térmicas, como fogo e líquidos quentes, com lesões por inalação presentes em uma parcela significativa dos pacientes. Tal lesão pode causar dano significativo à pele e aos tecidos subjacentes (Figura 2) (Carvalho *et al.*, 2023). As queimaduras são classificadas com base na profundidade e na extensão do dano. Tradicionalmente, as queimaduras são categorizadas em queimaduras de primeiro grau, segundo grau e terceiro (Madea & Doberentz, 2022).

Figura 2 – Alterações na pele desencadeadas por queimaduras. Observa-se na figura ilustrativa a pele íntegra (a), queimadura de primeiro grau (b), queimadura de segundo grau (c), e queimadura de terceiro grau (d)



Fonte: autora, 2024.

Queimaduras de primeiro grau afetam a camada externa da pele (epiderme), exibindo vermelhidão, edema e dor leve (Figura 2b). As queimaduras de segundo grau são ainda categorizadas em queimaduras superficiais e profundas de espessura parcial, envolvendo a epiderme e parte da derme, levando à formação de bolhas e dor intensa, ou afetando quase toda a derme com dor menos pronunciada devido à destruição do nervo (Figura 2c). Queimaduras de terceiro grau, conhecidas como queimaduras de espessura total, se estendem por todas as camadas da pele e podem danificar tecidos mais profundos, como músculos e ossos, resultando na redução da sensação de dor devido a extensos danos nos nervos (Figura 2d) (Abazari *et al.*, 2022; Volety *et al.*, 2022; Magnani, Sassi e Andrade, 2019).

As lesões subsequentes ao processo da queimadura são responsáveis por diversos ferimentos, afastamentos das atividades laborais e funcionais, podendo acarretar no óbito ou inferindo diretamente na autoestima e sociabilização do indivíduo queimado (Metsavaht, 2017; Farzan *et al.*, 2023). Compreender essas classificações é crucial para o diagnóstico, manejo e

seleção de tratamento adequados, pois diferentes graus de queimaduras requerem níveis variados de intervenção médica e cuidados para promover a cicatrização eficaz e reduzir as complicações (Abazari *et al.*, 2022).

As queimaduras representam um desafio significativo. A perda da barreira protetora da pele aumenta o risco de infecção, enquanto a presença de tecido necrótico pode impedir o processo de cicatrização (Chogan *et al.*, 2023). As infecções bacterianas são comuns em queimaduras, complicando ainda mais o tratamento. Além disso, o desenvolvimento de cicatrizes como queloides e cicatrizes hipertróficas, juntamente com contraturas, são complicações frequentes que podem afetar tanto a função quanto a estética da pele cicatrizada. Tais desafios destacam a importância de estratégias adequadas de tratamento de feridas, incluindo desbridamento oportuno, controle de infecções e o uso de substitutos da pele ou curativos para facilitar a cicatrização eficaz de feridas e minimizar o risco de complicações (Neagu *et al.*, 2022; Chogan *et al.*, 2023).

3.3 PROCESSO CICATRICIAL

A cicatrização é um processo biológico dinâmico e envolve a formação de um novo tecido para reparar o dano sofrido, que inicia imediatamente após a lesão. E de acordo com a evolução das fases de cicatrização, tais etapas serão determinantes para o tipo de cicatriz, sendo a de estética favorável e funcionalidade as almejadas (Prabhu, 2023; Gomes, Bomfim & Lopes Filho, 2020).

Tal processo pode ser dividido em quatro fases interdependentes e sobrepostas: homeostasia, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação. Cada fase envolve uma série de eventos celulares e moleculares que colaboram para a reparação eficaz do tecido (Balbino, Pereira e Curi, 2005; Ferreira e D'assumpção, 2006; Potter, Veitch & Johnston, 2019).

A fase de hemostasia é a primeira resposta à lesão e ocorre nos primeiros minutos após o dano tecidual. Este estágio é crucial para a contenção da hemorragia e é caracterizado pela vasoconstrição imediata dos vasos sanguíneos lesionados, agregação plaquetária e formação de coágulos para evitar sangramento excessivo. As plaquetas aderem ao local lesado, liberando fatores que desencadeiam a cascata de coagulação, levando à formação de uma malha de fibrina que estabiliza o coágulo. Esse coágulo, composto principalmente de fibrina, atua como um suporte temporário para os processos de cicatrização subsequentes (Guo & Dipietro, 2010; Ramanan, Rajan & Rajan, 2022; Wallace, Basehore & Zito, 2023).

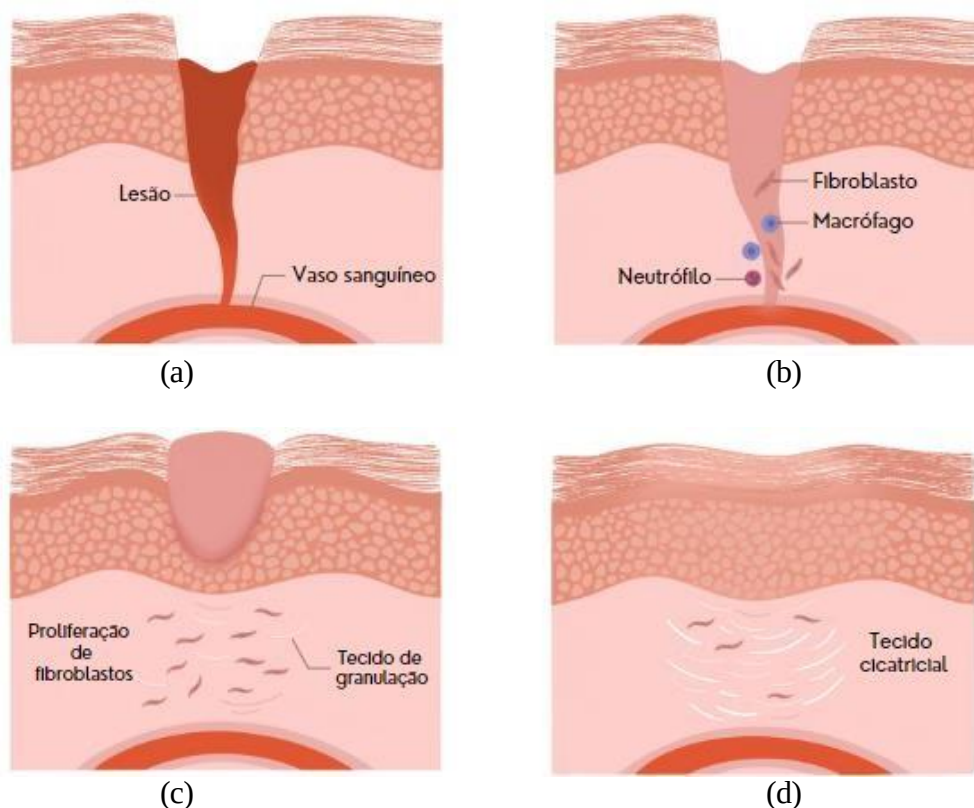
A fase inflamatória inicia após a hemostasia e pode durar de alguns dias a uma semana, dependendo da extensão da lesão. Durante esta fase, ocorre a vasodilatação dos vasos sanguíneos, permitindo a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, para o local da lesão. Os neutrófilos são os primeiros a chegar e têm a função de limpar o local, fagocitando detritos celulares e microrganismos. Subsequentemente, os macrófagos substituem os neutrófilos e desempenham um papel crucial na modulação da inflamação e na liberação de citocinas e fatores de crescimento que promovem a transição para a fase proliferativa (Boniakowski et al., 2017; Hsu & Mustoe, 2010; Wallace, Basehore & Zito, 2023; Landén, Li & Stahle, 2016).

A fase de proliferação, que pode durar de alguns dias a várias semanas, é marcada pela formação de novo tecido. Esta fase pode ser subdividida em quatro processos principais: angiogênese, é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos existentes, este processo é essencial para fornecer nutrientes e oxigênio ao tecido em regeneração; fibroplasia, etapa onde os fibroblastos proliferam e sintetizam colágeno, fornecendo suporte estrutural ao novo tecido; epitelização, etapa na qual as células epiteliais migram a partir das bordas da ferida para cobrir o tecido recém-formado, restabelecendo a barreira cutânea; e contração da ferida, etapa em que os miofibroblastos desempenham um papel importante na redução do tamanho da ferida, puxando as bordas da ferida para o centro (Landén, Li & Stahle, 2016; Wallace, Basehore & Zito, 2023; Bartolo *et al.*, 2022).

Já a fase de remodelação ou maturação consiste na última etapa da cicatrização e pode durar de meses a anos. Durante esta fase, ocorre a reorganização do colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Wallace, Basehore & Zito, 2023). O colágeno tipo III, inicialmente depositado, é gradualmente substituído por colágeno tipo I, mais forte e organizado, aumentando a resistência à tração do tecido cicatrizado. Os miofibroblastos também diminuem em número, resultando na redução da contração da ferida e no refinamento da cicatriz (Su *et al.*, 2023).

A reorganização da nova matriz é um processo crucial na cicatrização. Os fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que promovem a degradação da matriz extracelular e a cicatrização é bem-sucedida quando há um equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga, garantindo a remodelação adequada do tecido (Medeiros & Filho, 2016; Patrick & Chen-Charpentier, 2023; Wallace, Basehore & Zito, 2023) (Figura 3).

Figura 3 – Imagem ilustrativa das fases do processo cicatricial: hemostasia (a), fase inflamatória (b), fase proliferativa (c) e fase de remodelação (d)



Fonte: autora, 2024.

O processo cicatricial é um fenômeno complexo e envolve diversos tipos celulares e mediadores bioquímicos. Cada fase desempenha um papel essencial na restauração da integridade tecidual e na promoção de uma cicatrização eficiente (Quraishi, Bhuvaneshwari & Roopa. 2023). Para que uma ferida cicatrize com sucesso, todas as quatro fases devem ocorrer na sequência e no período adequados. Muitos fatores podem interferir em uma ou mais fases desse processo, causando assim uma cicatrização inadequada ou prejudicada da ferida (Yang *et al.*, 2021).

A compreensão deste processo é fundamental para o desenvolvimento de terapias inovadoras que possam melhorar os resultados clínicos em pacientes com lesões teciduais, incluindo queimaduras e outras feridas complexas. Diante desses desafios, o uso de filmes derivados da biodiversidade brasileira para fins terapêuticos emergiu como uma alternativa promissora. Materiais como quitosana, galactomanana e extratos de plantas como *Aloe vera* possuem propriedades cicatrizantes reconhecidas, acelerando o processo de regeneração cutânea. Além de suas capacidades regenerativas, esses filmes apresentam atividade antimicrobiana, reduzindo o risco de infecções nas feridas, e são biocompatíveis, minimizando

reações adversas no organismo (Elfawy et al., 2023; Grosu et al., 2023; Phimmuan et al., 2023; Gayathri et al., 2023; Muniz & De Menezes, 2022). Tais filmes propiciam uma abordagem promissora para o tratamento de feridas, visando uma cicatrização mais rápida, a redução dos riscos de infecção.

3.4 POLISSACARÍDEO DO TIPO GALACTOMANANA

O polissacarídeo é um polímero macromolecular natural, composto de monossacarídeos mediante cadeias lineares ou ramificadas, extraídos de plantas, fungos, animais ou mediante fermentação (Cunha *et al.*, 2009). Em razão da segurança e não toxicidade, alguns dos polissacarídeos são amplamente utilizados na aplicação farmacológica. Os quais apresentam ações antioxidantes, antitumorais, hepatoprotetoras, hipoglicêmicas, hipocolesterolêmicas, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias (Cunha *et al.*, 2009; Albuquerque, 2017).

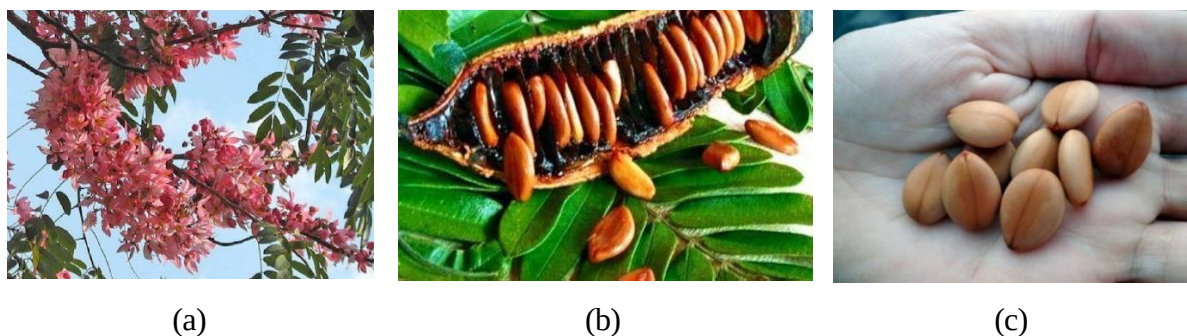
Polissacarídeo do tipo galactomanana pode ser encontrado em fungos, bactérias, algas, e especialmente em sementes de plantas. São formados por cadeia linear, constituído por um esqueleto de unidades repetidas de β -D-manose, ligadas entre si por ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 4 e unidades de α -D-galactose ligadas à cadeia principal por ligações do tipo 1 $\rightarrow$ 6 (Albuquerque, 2016).

A principal fonte é encontrada no endoesperma de sementes de dicotiledôneas, em especial nos membros da família *Leguminosae*. As galactomananas extraídas das leguminosas apresentam características específicas, tais como alta molaridade, solubilidade em água, ausência de toxicidade, além de capacidade de modelar membranas. As quais apresentam a função de reserva de energia e hidratação (Cerqueira *et al.*, 2011; Albuquerque, 2013; Andrade, 2018). As galactomananas destacam-se por sua economia, sustentabilidade e adaptabilidade a modificações químicas e bioquímicas. Possuem a capacidade de espessamento, estabilização e gelificação, o que agrega grande valor em variadas aplicações. Apresentando como uma das principais vantagens, seu uso como matriz para a incorporação de bioativos (Silva Neto *et al.*, 2023; Lavudi & Suthari, 2020).

A *Cassia grandis* é uma planta de pequeno a médio porte pertencente à família *Caesalpinioideae* (Fuentes *et al.*, 2020). Há aproximadamente mais de 500 espécies no mundo, e é encontrada em diversas regiões tropicais e subtropicais, sendo essa espécie também encontrada na zona da mata do Estado de Pernambuco, Brasil. Emerge como uma fonte potencialmente rica em princípios bioativos naturais, e é utilizada na medicina popular e em atividades farmacológicas (Albuquerque, 2013; Albuquerque, 2016).

A árvore pode atingir cerca de 12m de altura, apresenta flores amarelo-rosadas (Figura 4a) e frutos em vagem (Figura 4b) (Silva *et al.*, 2012). O fruto maduro da *Cassia grandis* é rígido e suas sementes apresentam forma elíptica, com faces achatadas, são duras, com coloração acastanhada-marrom (Figura 4c) (Barreiro, 2021).

Figura 4 – Floração (a), vagem (b) e semente (c) da árvore de *Cassia grandis* (c)



Fonte: Google imagens, 2024.

As sementes possuem um endosperma gomoso, com possibilidade de serem fonte de galactomanana. Tal matéria prima é considerada ecológica, barata e não tóxica, sendo reconhecida como segura. Além da habilidade de apresentar-se tanto como solução quanto como gel, permite diversas aplicações e favorece para o consumo em grande escala (Albuquerque, 2013; Albuquerque, 2017).

A *Cassia grandis* é uma espécie de planta que possui diversos usos e propriedades, e vem sendo estudada por seus potenciais benefícios à saúde (Alhawarri *et al.*, 2023). A literatura aponta que a *Cassia grandis* apresenta efeito prebiótico do pó da polpa (Marcia *et al.*, 2023), atua como alimento funcional e nutracêutico devido aos seus compostos bioativos, como compostos fenólicos, carotenóides e minerais (Marcia-Fuentes *et al.*, 2021), auxilia no tratamento de anemia, úlceras de pele e diabetes. Além disso, a planta contém uma alta concentração de proteínas, especialmente nas sementes (Paz *et al.*, 2022).

O uso de filme de polissacarídeo de *Cassia grandis* associando a incorporação de outros compostos bioativos é uma abordagem promissora no campo da biotecnologia e saúde. Tais compostos podem incluir extratos de plantas, extratos de algas, antioxidantes ou agentes antimicrobianos (Albuquerque *et al.*, 2017; Seixas, 2017). A aplicação da galactomanana para incorporar bioativos é recorrente na indústria farmacêutica e pode formar sistemas de liberação controlada que melhoram a estabilidade, a eficácia e a biodisponibilidade desses bioativos (Lavudi *et al.*, 2023; Dangi *et al.*, 2022).

3.5 FILME DE POLISSACARIDEO

Os filmes de polissacarídeos representam uma classe diversificada de materiais biopoliméricos derivados de fontes naturais como algas, plantas, microrganismos e animais. Esses filmes possuem uma variedade de propriedades e características únicas, que podem ser ajustadas de acordo com a fonte do polissacarídeo e os métodos de processamento utilizados. Dentre os tipos mais comuns de filmes de polissacarídeos estão: celulose (Voss *et al.*, 2018; Maia *et al.*, 2019; Claro *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021; Yuan *et al.*, 2021); quitosana (Jaiswal *et al.*, 2019; Shao *et al.*, 2019; Salomatina *et al.*, 2020; Alborzi *et al.*, 2021); alginato de sódio (Amado, 2022; Gonçalves, 2021); pululano (Li *et al.*, 2018; Dhal *et al.*, 2020); sacrano (Wathoni *et al.*, 2019); e galactomanana (Gomes *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2017).

Cada tipo de filme possui características únicas que podem ser exploradas para atender às necessidades específicas de diferentes aplicações, sendo explorado nas indústrias: alimentícia, como revestimentos e embalagens biodegradáveis; farmacêutica e biomédica, para liberação de fármacos, cápsulas, revestimentos de medicação, e curativos de feridas; higiene pessoal, em cremes, loções, máscaras faciais; e têxtil, atuando na resistência e absorção de tecidos (Gupta, Biswas & Roy, 2022; Miranda & Fernandes, 2022; Riccio *et al.*, 2022).

As estruturas poliméricas para liberação medicamentosa são amplamente estudadas para melhorar a eficácia e segurança na entrega medicamentosa, especialmente na cicatrização de feridas. Essas estruturas podem ser projetadas para a liberação medicamentosa de forma controlada no local específico da ferida, redução da frequência de administração medicamentosa, minimização de cicatrizes, o que favorece a cicatrização (Fahimirad & Ajalloueian, 2019).

O desenvolvimento de filmes de polissacarídeo pode favorecer o aceleração de processo cicatricial e apresenta um vasto potencial biotecnológico, pois ofertam biocompatibilidade e biodegradabilidade (Li *et al.*, 2018; Shanmugapriya *et al.*, 2018; Wathoni *et al.*, 2019; Das *et al.*, 2023; Mehmood *et al.*, 2023). Evidências indicam ainda que os filmes constituídos por polissacarídeos apresentam características antioxidantes, e aprimoram a migração de células essenciais, como fibroblastos e queratinócitos (Hmood *et al.*, 2022; Woonnoi *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023; Szymanski *et al.*, 2023). Tais filmes revelam-se como grande promessa como curativos para feridas, em razão do amplo potencial terapêutico e sua habilidade de estabelecer um ambiente propício para o processo de cicatrização (Szymanski *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2023).

Os filmes poliméricos apresentam vantagens como a capacidade de absorver fluidos da ferida, não necessitando de trocas frequentes, proporcionando um microambiente úmido e protegendo a ferida (De Barros *et al.*, 2022; Ali *et al.*, 2020). Filmes de polissacarídeos têm demonstrado alto potencial como curativos de feridas, e é descrito na literatura que eles podem acelerar o processo de cicatrização. A versatilidade das formas polissacarídicas, em líquido ou gel, é uma vantagem significativa, devido às suas diferentes propriedades mecânicas, físicas e biológicas. Além de suas propriedades não irritantes e não tóxicas (Albuquerque *et al.*, 2016; Albuquerque *et al.*, 2017).

Os polissacarídeos, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e capacidade de formar matrizes tridimensionais, são materiais ideais para a imobilização de enzimas. A imobilização de enzimas em filmes de polissacarídeos representa uma estratégia inovadora para a aplicação de biocatalisadores em diversos campos, incluindo a biotecnologia, a farmacologia e a engenharia biomédica (Arif, 2024).

3.6 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM FILMES DE POLISSACARÍDEOS PARA O PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

O termo imobilização é empregado para descrever a fixação da enzima a um suporte inerte ou matriz que permite maior resistência às mudanças nas condições físicas. A imobilização enzimática é uma alternativa para a instabilidade térmica e perda de atividade catalítica (Mesquita *et al.*, 2018; Jesionowski, Zdarta & Krajewska, 2014; Hackenhaar, 2021).

Trata-se da combinação de características, estabilidade e cinética da enzima com as propriedades do suporte de escolha, cujo objetivo é o de otimizar a estabilidade física e enzimática do biocatalizador (Mesquita *et al.*, 2018; Basso & Serban, 2019; Fernandes, 2020).

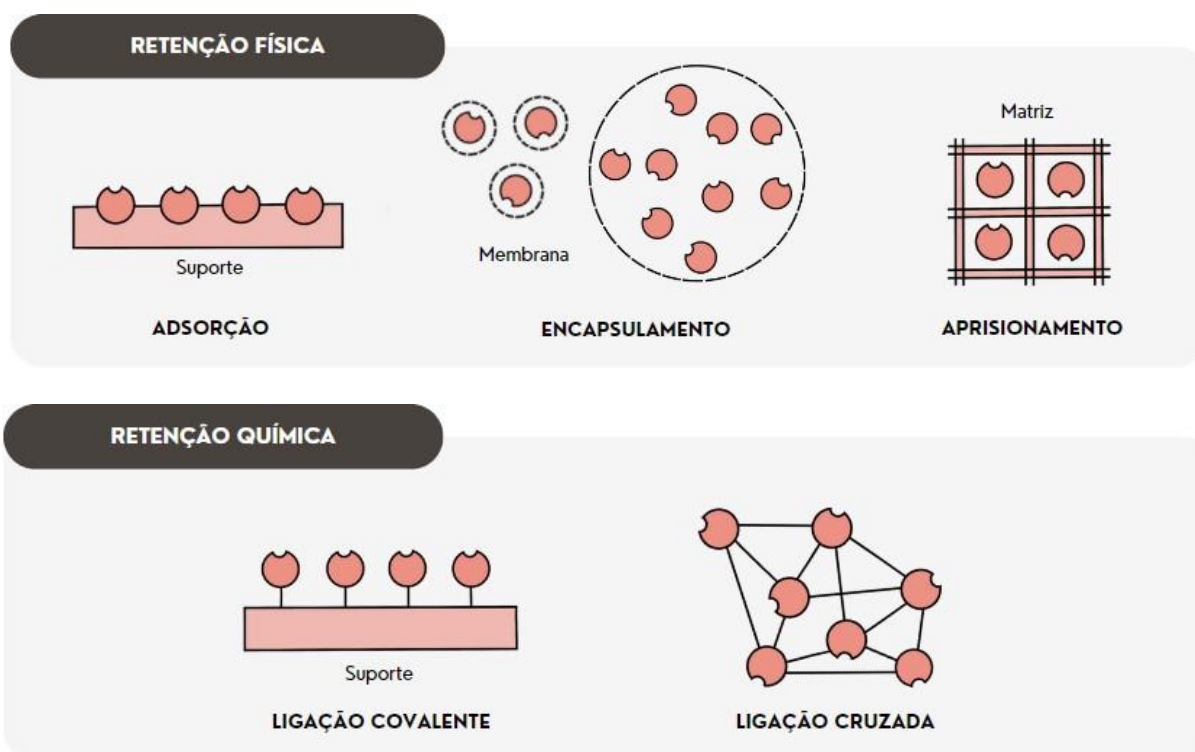
Diversos suportes podem ser utilizados para a imobilização enzimática, tais como filmes, membranas, cápsulas, estruturas porosas, entre outros. Há diversos materiais que podem ser considerados para a imobilização de enzimas, a eleição do suporte dependerá das características da enzima e das condições da biomolécula imobilizada (Maghaby *et al.*, 2023; Bhardwaj, Agrawal & Verma, 2023).

Os suportes são classificados conforme sua origem em inorgânicos ou orgânicos, quanto à morfologia em porosos, não porosos e de estrutura em gel (Jesionowski, Zdarta & Krajewska, 2014). O suporte ideal deve ter alta eficiência catalítica, estabilidade operacional, insolubilidade, não toxicidade, assim como resistência (Jun *et al.*, 2019).

A maneira que se dará a imobilização ocorre em consequência das ligações físicas e químicas entre a biomolécula e o suporte. A imobilização da biomolécula pode ser permanente ou transitória (Albuquerque, 2017; Jun *et al.*, 2019). O uso de uma matriz polimérica na imobilização de biomoléculas, pode auxiliar na estabilidade enzimática, aumentar o efeito, e reduzir os custos da produção tendo em vista que a matriz pode ser reaproveitada (Mendes *et al.*, 2011; Vitolo *et al.*, 2015).

Diferentes métodos foram elaborados para a imobilização enzimática, e em cada um dos métodos há vantagens e desvantagens (Souza *et al.*, 2017). Na adsorção, não há modificação química, a enzima é fisicamente adsorvida ou ligada a superfície; encapsulamento, envolve membranas seletivamente permeáveis, é um método simples e de baixo custo que pode aumentar a atividade enzimática pois há grande superfície de contato entre a enzima e o substrato; aprisionamento, método irreversível, as enzimas estão fisicamente presas dentro de um suporte de matriz; ligação covalente, envolve a formação de ligações covalentes entre o suporte e os grupos funcionais das enzimas; e ligação cruzada, método de imobilização irreversível e não há matriz de suporte, envolve a formação de ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas enzimáticas (Figura 5) (Jun *et al.*, 2019; Bhardwaj, Agrawal & Verma, 2023; Intisar *et al.*, 2023).

Figura 5 – Métodos de imobilização enzimática



As matrizes poliméricas despertam interesse devido à sua biocompatibilidade, capacidade de fornecer suporte estrutural e capacidade de estimular a cicatrização de feridas (Tan *et al.*, 2021; Rafeeq *et al.*, 2022; Rodriguez-Abetxuko *et al.*, 2020).

A imobilização de compostos bioativos em filmes de polissacarídeos propicia o desenvolvimento de materiais biomédicos, como curativos para feridas. Tal incorporação confere proteção e preservação da atividade biológica, além de direcionamento de enzimas e compostos no local da ferida, maximizando a eficácia terapêutica (Arif, 2024). A incorporação em filmes tende a minimizar os riscos e reações adversas, pela integração com os tecidos biológicos e por serem biocompatíveis e biodegradáveis (Li *et al.*, 2022; Pal *et al.*, 2023; Sabando *et al.*, 2020). A Tabela 1 aponta algumas enzimas que foram imobilizadas em filmes de polissacarídeos com o objetivo de cicatrização de feridas.

Tabela 1 – Enzimas imobilizadas em filmes de polissacarídeos com o objetivo de cicatrização de feridas

Enzima imobilizada visando a cicatrização de feridas	Filme de polissacarídeo	Tipos de imobilização	Referência
Alginate liase	Membrana de celulose bacteriana	Adsorção física	Charesa et al., 2023
Amilase, celobiohidrolase, pectinase, subtilisina A, β -N-acetil-glucosaminidase	Quitosana	Física e química	Lahiri et al., 2022
Proteases, lipases e amilases	Não foi mencionado explicitamente	NRE	Fallon et al., 2013
Protease alcalina	Xantana	NRE	Davidenko, 1999
Protosubtilina G10Kh, tripsina e fibrinolisinase	Hidrato de celulose	Covalente	Kovalenko, 1998
Proteolítica	Casca da semente de Plantago ovata	NRE	Westerhof & Vershoor, 1993
NRE – Não relatado explicitamente			

Fonte: autora, 2024.

Dentre as enzimas, a presença da collagenase no filme polissacarídico permite uma degradação eficiente do colágeno excessivo presente no tecido cicatricial, facilitando a regeneração e remodelação adequadas da ferida (Slovakova *et al.*, 2022).

A collagenase pode ser imobilizada em filmes, géis e hidrogéis para diversas aplicações. A imobilização de collagenase em filmes de polissacarídeo oferece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de curativos avançados para feridas. Esses filmes podem ser aplicados diretamente sobre a ferida, proporcionando uma liberação controlada da enzima no local da

lesão. Essa estratégia também permite uma maior retenção da enzima no local, maximizando sua eficácia terapêutica e minimizando a necessidade de reaplicações frequentes (Shao *et al.*, 2023; Antunes *et al.*, 2022; Slovakova *et al.*, 2022).

3.7 COLAGENASES

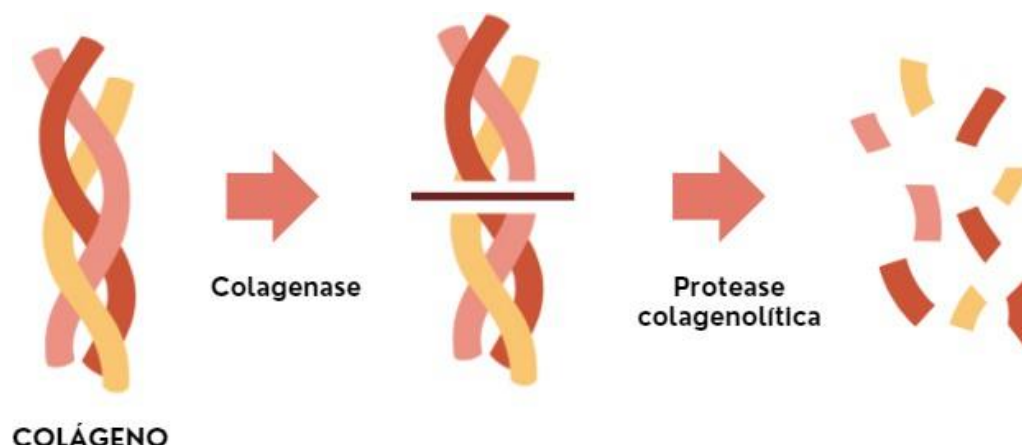
As proteases collagenolíticas são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas, apresentando relevância nas aplicações biotecnológicas. Essas proteases apresentam potencial biotecnológico em virtude das possibilidades de aplicações, tal como a hidrólise de diversos tipos de colágeno (Watanabe, 2004; Sorapukdee *et al.*, 2020).

Essas enzimas são utilizadas em variadas condições de pH e temperatura, assim, potencialmente ajustadas para estabilidade e especificidade (Adrio & Demain, 2014; Lima *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2020). Sendo utilizadas na degradação de tecido necrótico, composição de fármacos com ação cicatrizante e tratamento de lesões (Lima *et al.*, 2014).

Tais proteases collagenolíticas podem ser obtidas de origem animal, vegetal e microbiana (Fernandes, 2020; Cardoso, 2020). Sendo as de fontes microbianas as mais utilizadas pela facilidade de manuseio, reprodutibilidade e diversidade (Silveira, 2015). Possibilitando um menor tempo de geração da enzima, as quais podem ser cultivadas em larga escala por meio de métodos de fermentação, resultando em viabilidade para aplicações biotecnológicas (Abo-Elmagd; Housseiny, 2012; Fernandes, 2020).

Por possuir uma estrutura rígida, um número limitado de proteases possuem a capacidade de clivar a molécula de colágeno. Tais proteases são conhecidas como collagenases, pois clivam a tripla hélice de colágeno. Em condições fisiológicas, as collagenases desempenham um papel fundamental em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos (Watanabe 2004; Tohar *et al.*, 2021). As proteases collagenolíticas podem ser confundidas com a collagenase pois são capazes de clivar regiões não helicoidais da molécula de colágeno, ou seja substratos que não são específicos para as collagenases. Tornando-se difícil diferenciar as collagenases de proteases collagenolíticas, em razão da estrutura diversa do colágeno (Watanabe 2004; Bhagwat & Dandge, 2018) (Figura 6). A depender da sua origem, o mecanismo de ação da collagenase pode variar, podem clivar um sítio ou mais sítios (Silveira, 2015).

Figura 6 – Degradação do colágeno por ação da collagenase e protease collagenolítica



Fonte: adaptado de Oliveira *et al.*, 2017

As collagenases podem ser classificadas em metalocollagenases ou serinocollagenases. A metalocollagenase ou collagenase verdadeira, é descrita assim em razão da degradação da parte helicoidal do colágeno. São endopeptidase e promovem a degradação da matriz extracelular. Já as serinocollagenases ou falsa collagenase, degradam a parte não helicoidal do colágeno. (Sakurai *et al.*, 2009; Daboor *et al.*, 2010; Oliveira, 2015; Oliveira *et al.*, 2017).

As collagenases podem ser utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas, na abordagem de condições e doenças relacionadas ao colágeno (Shekhter *et al.*, 2019). Além de apresentar um potencial preventivo no tratamento de câncer, atua no tratamento de feridas e queimaduras (Badalamente *et al.*, 2018; Patry *et al.*, 2017; Alipour *et al.*, 2016). A collagenase pode atuar como agente de desbridamento enzimático, agindo nos eventos celulares, tais como a angiogênese e vasodilatação, até a cicatrização efetiva da ferida (Kandhwal, 2022). Resultando em um menor tempo de processo cicatricial e afetando positivamente no aspecto na cicatriz (De Francesco *et al.*, 2022; Herman *et al.*, 2020).

3.8 MICRORGANISMO PRODUTOR DE COLAGENASE

Dentre os microrganismos produtores de collagenase, *Clostridium sp.* foi o primeiro microrganismo reconhecido para a produção de collagenases. Mas, por apresentar uma natureza patogênica, limita a aplicação das enzimas. Pois sugere risco e uma necessidade maior de processos de purificação (Sakurai *et al.*, 2009; Wanderley, 2017; Bhagwat & Dandge, 2018).

As actinobactérias são produtoras de enzimas extracelulares, sendo elas: protease, celulase, amilase, quitinase, lipase, xilanase e pectinases (Hazarika & Thakur, 2020). Dentre as

actinobactérias, o gênero *Streptomyces* também são produtores de collagenases e destacam-se como fonte de produtos naturais (Barros, 2011; Costa *et al.*, 2023).

As actinobactérias são aceitas no grupo das bactérias e assim como tal, não apresentam parede celular distinta (Hazarika & Thakur, 2020). Tem potencial biotecnológico por apresentarem: variedade de fontes; e metabólitos bioativos, tais como antibióticos, anticancerígenos, antifúngicos, antivirais, anti-hipertensivos, imunossupressores e antiparasitários. Sendo assim, uma das principais alternativas para a indústria farmacêutica. Dois terços dos antibióticos atualmente, são provenientes das actinobactérias (Van Bergeijk *et al.*, 2020; Gohain *et al.*, 2020; Procópio *et al.*, 2012; Quinn *et al.*, 2020). As espécies de *Streptomyces* apresentam grande potencial biotecnológico, pela produção de enzimas de aplicação farmacêutica, industrial e de pigmentos (Ferreira *et al.*, 2016; Barreiro, 2021; Ruiz & Espinel, 2022).

Streptomyces são organismos micelais que se reproduzem por esporulação (Van Bergeijk *et al.*, 2020; Jose, Maharshi & Jha, 2021; Bush *et al.*, 2022). O esporo do *Streptomyces* inicia a germinação por extrusão de tubos germinativos. Tais tubos alongam-se e crescem em redes de hifas, crescimento aéreo, as quais são denominadas de micélio vegetativo (Angert, 2005; Kotun, 2013; Li *et al.*, 2018).

Streptomyces desempenham um papel significativo na produção de collagenase. Collagenase produzida por *Streptomyces* apresentam várias aplicações em indústrias de couro, alimentos, produtos farmacêuticos e biomédicos. Sendo uma fonte mais barata de enzimas collagenases, pois sua produção pode ocorrer por resíduos marinhos, resíduos de quitina, farelo de soja, amido e penas de aves. São microrganismos valiosos para produção de collagenases com diversas características (Shaik *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2024; Cuebas-Irizarry & Grunden, 2024).

Descobriu-se que essas bactérias produzem enzimas collagenases com características diferentes, como estabilidade em altas temperaturas e uma faixa de pH de 6 – 9 (Abdel-Fattah, 2013; Batista *et al.*, 2017; Sakurai *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2024; Endo *et al.*, 1987; Dhanaseeli & Balasubramanian, 2014; Jain & Jain *et al.*, 2010; Hamed *et al.*, 2018). A Tabela 2 mostra várias espécies de *Streptomyces* identificadas como produtoras de collagenases.

Tabela 2 – Espécie de *Streptomyces* produtoras de collagenases

Espécies produtoras de collagenases	Ótimo pH	Ótima temperatura	Atividade enzimática	Referências
<i>Streptomyces antibioticus</i> UFPEDA 3421	7	60 °C	377,5 U/ml	Costa <i>et al.</i> , 2024
<i>Streptomyces coelicolor</i> CGMCC 4.7172	7 – 7,2	30 °C	NRE	Li, 2021
<i>Streptomyces sp</i>	7	30 °C	NRE	Dhanaseeli & Balasubramanian, 2014
<i>Streptomyces spp</i>	8	37 – 50 °C	21,13 U/ml	Barros, 2011
<i>Streptomyces exfoliatus</i> CFS 1068	7	30 °C	19.91± U/ml	Jain & Jain, 2010
<i>Streptomyces parvulus</i>	9	37 °C	938 U/mg	Sakurai <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces sp. cepa 3B</i>	7.5	37 °C	3350 U/mg ^a e 3600 U/mg ^b	Petrova , Derekova & Vlahov, 2006
<i>Streptomyces sp 1349</i>	6 – 7 e 9 – 10	37 e 60 °C	NRE	Ivanko, Varbanets & Valahurova <i>et al.</i> , 2002
<i>Streptomyces cremeus 3 e Streptomyces candidus 91</i>	7,5	40 °C	220 ± 0.8 U/ml ^c e 216 ± 0.4 U/ml ^d	Kabadjova <i>et al.</i> , 1996
<i>Streptomyces sp. C-51</i>	8 – 9	35 – 40 °C	NRE	Endo <i>et al.</i> , 1987
<i>Streptomyces sp. A8</i>	7,2	28 °C	2083 U/mg	Chakraborty & Chandra, 1986

NRE – Não relatado explicitamente

^a Collagenase I

^b Collagenase II

^c *Streptomyces cremeus*

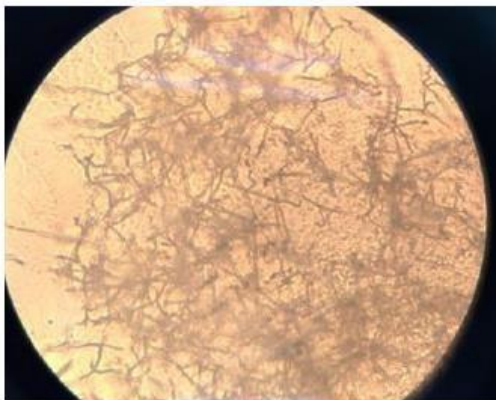
^d *Streptomyces candidus 91*

Fonte: autora, 2024.

A literatura aponta outras espécies de *Streptomyces* produtores de collagenases: *Streptomyces sp 1382* (Ivanko, Varbanets & Valahurova *et al.*, 2002); *Streptomyces sp 594* (De Azeredo, 2003); e *Streptomyces griseus* (Rassulin & Shibnev, 1970); *Streptomyces platensis* (Shi *et al.*, 2016), *Streptomyces griseus trypsin* (Koo *et al.*, 1998), *Streptomyces lividans* (Koo *et al.*, 1998; Hamed *et al.*, 2018) entretanto, ainda é objeto de estudo as condições para fermentação, temperatura, pH ótimos e atividade enzimática.

Streptomyces parvulus DPUA 1573 (Figura 7) é uma cepa bacteriana pertencente ao gênero *Streptomyces*, amplamente conhecido por sua capacidade de produzir uma variedade de compostos bioativos com aplicações industriais e farmacêuticas (De Lima Júnior *et al.* 2023). Essa cepa específica, isolada e caracterizada por suas propriedades únicas, tem despertado interesse científico devido ao seu potencial na produção de antibióticos, enzimas e outros metabólitos secundários (Batista *et al.*, 2017; El-Naggar, 2021).

Figura 7 – Micrografia de uma placa contendo o *Streptomyces parvulus* (DPUA 1573) visualizado em microscópio óptico



Fonte: autora, 2024.

O *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 se destaca pela produção de enzimas, incluindo a collagenase. A collagenase produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 possui potencial no tratamento de feridas devido à sua capacidade de desbridamento enzimático, removendo tecido necrosado e facilitando a cicatrização. Além disso, o uso de collagenase pode reduzir a necessidade de desbridamento cirúrgico, um processo mais doloroso e invasivo. A cepa DPUA 1573 demonstra uma notável resiliência e capacidade de adaptação, o que a torna um candidato ideal para exploração biotecnológica (Batista *et al.*, 2017; Costa *et al.*, 2024).

Há possibilidade de combinar a collagenase com outros agentes terapêuticos, como antibióticos, antioxidantes ou fatores de crescimento, para potencializar os efeitos terapêuticos e promover uma cicatrização mais rápida e eficaz. Essa abordagem integrada pode ser especialmente benéfica no tratamento de feridas crônicas ou de difícil cicatrização, onde múltiplos fatores podem estar contribuindo para o retardo no processo de cicatrização.

3.9 REFERÊNCIAS

- ABAZARI, Morteza et al. A systematic review on classification, identification, and healing process of burn wound healing. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 21, n. 1, p. 18-30, 2022.
- ABDEL-FATTAH, Azza M. Production and partial characterization of collagenase from marine *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza using chitin wastes. **Egyptian Pharmaceutical Journal**, v. 12, n. 2, p. 109-114, 2013.
- ABHYANKAR, Suhas Vidyadhar; VARTAK, Arvind Madhusudan; DAFTARY, Gautam Vinod. Potential role of systemic enzyme therapy with trypsin, bromelain and rutoside combination in burns. **International Surgery Journal**, v. 8, n. 7, p. 2254-2259, 2021.
- ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase and protease by *Ulocladium botrytis* Preuss ATCC 18042 using water hyacinth as a substrate under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1547–1556, 2012.
- ADRIO, J. L. DEMAÍN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes **Biomolecules**. V.4, nº 1, p. 117-139. 2014.
- AGUSTINA, Lia; MIATMOKO, Andang; HARIYADI, Dewi Melani. Challenges and strategies for collagen delivery for tissue regeneration. **Journal of Public Health in Africa**, v. 14, n. Suppl 1, 2023.
- AJAYI, Ebenezer IO; OLADELE, Johnson O.; NKUMAH, Abraham O. Application of algae in wound healing. **Next-Generation Algae**, v. 2, p. 251-284, 2023.
- ALBORZI, Zhaleh; IZADI-VASAFI, Hossein; GHAYOUMI, Faezeh. Wound dressings based on chitosan and gelatin containing starch, sesame oil and banana peel powder for the treatment of skin burn wounds. **Journal of Polymer Research**, v. 28, p. 1-16, 2021.
- ALBUQUERQUE, P. B. S. **Avaliação reológica da galactomanana extraída das sementes de *Cassia grandis***. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.
- ALBUQUERQUE, P. B. S.; SILVA, C. S.; SOARES, P. A. G.; BARROS, W.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Investigating a galactomannan gel obtained from *Cassia grandis* seeds as immobilizing matrix for Cramoll lectin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 454-461, 2016.
- ALBUQUERQUE, P.B.S. et al. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. **Carb. Polym.** V. 104, p. 127-134, 2014.
- ALBUQUERQUE, Priscilla BS et al. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **International journal of biological macromolecules**, v. 102, p. 749-757, 2017.

ALBUQUERQUE, Priscilla BS et al. Immobilization of bioactive compounds in Cassia grandis galactomannan-based films: Influence on physicochemical properties. **International journal of biological macromolecules**, v. 96, p. 727-735, 2017.

ALHAWARRI, Maram B. et al. Potential Anti-Cholinesterase Activity of Bioactive Compounds Extracted from Cassia grandis Lf and Cassia timoriensis DC. **Plants**, v. 12, n. 2, p. 344, 2023.

ALI, Meher B.; ALI, Mashal B. Psychological and physiological complications of post-burn patients in Pakistan: a narrative review. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 22, n. 1, p. 8, 2022.

ALI, Muhammad et al. Physico-chemical based mechanistic insight into surfactant modulated sodium Carboxymethylcellulose film for skin tissue regeneration applications. **Journal of Polymer Research**, v. 27, p. 1-11, 2020.

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

AMADO, Laís Ravazzi. Filmes à base de proteína isolada de soja e alginato de sódio—Aspectos das misturas de biopolímeros, propriedades dos filmes e efeitos de extrato de beldroega nos filmes. 2022.

ANDRADE, M. V. S. Evaluation of the bleeding intensity of patients anticoagulated with warfarin or dabigatran undergoing dental procedures, **Arq. Bras. Cardiol.** v. 111, n.3, p.394-399. 2018.

ANGERT, Esther R. Alternatives to binary fission in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 214-224, 2005.

ANTUNES, JEROME 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.

ARAÚJO, Malanny Santos et al. ANÁLISE HOSPITALAR POR QUEIMADURAS E CORROSÕES NO BRASIL: UM ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 9, p. 4142-4152, 2023.

ARIF, Zia Ullah. The Role of Polysaccharide-based Biodegradable Soft Polymers in the Healthcare Sector. **Advanced Industrial and Engineering Polymer Research**, 2024.

ARORA, Pranay. Life below land: the need for a new sustainable development goal. **Frontiers in Environmental Science**, v. 11, p. 1215282, 2023.

ARRUDA, Fabiano Calixto Fortes de et al. Comparação de escores de gravidade para previsão de mortalidade e tempo de internação em unidade de queimados. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 16, n. 3, p. 142-149, 2017.

ASH, Krishna; MISHRA, Sarvesh Kumar. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 12, n. 02, p. 311-323, 2023.

BADALAMENTE, Marie A.; HURST, Lawrence C. Collagenase: preclinical evaluation and clinical trials in the USA and Australia. *Collagenase in Dupuytren Disease*, p. 7-16, 2018.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R., **Rev Bras Cienc Farm**. v. 41, p. 27-51, 2005.

BARREIRO, M. E. L. Efeito do banho ultrassônico na atividade catalítica de uma Colagenase obtida de *Streptomyces* sp. UFPEDA3421: imobilização em Filme polissacarídico com potencial aplicação biomédica. **Dissertação**, 2021.

BARROS, M. C. S. Produção, caracterização e purificação de colagenases a partir de cepas de *Streptomyces* spp. da região amazônica. **Tese**, 2011.

BÁRTOLO, Inês et al. Keratinocyte growth factor-based strategies for wound re-epithelialization. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 28, n. 3, p. 665-676, 2022.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes. A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

BATISTA, J. M. S. et al. Production and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, p. 123-129, 2017.

BEZERRA, Thalia Amaro de Souza et al. Epidemiological study of the evolution of the number of cases and the cost of hospitalization due to burns and corrosions in children in Brazil (2010-2019). **Seven Editora**, 2023.

BHAGWAT, P.K.; DANDGE, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, v. 15, p. 43-55, 2018.

BHARDWAJ, Nisha; AGRAWAL, Komal; VERMA, Pradeep. Enzyme Immobilization: An Effective Platform to Improve the Reusability and Catalytic Efficiency of Enzymes. **Genomics Approach to Bioremediation: Principles, Tools, and Emerging Technologies**, p. 35-51, 2023.

BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, S.; GACHHUI, R.; HAZRA, S.; MUKHERJEE, J. U32 collagenase from *Pseudoalteromonas agarivorans* NW4327: Activity, structure, substrate interactions and molecular dynamics simulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 635-650, 2019.

BOISSIERE, F. et al. Thermal and chemical burns caused by e-cigarette battery explosions. In: **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique**. Elsevier Masson, 2020. p. 24-30.

BONIAKOWSKI, Anna E. et al. Macrophage-mediated inflammation in normal and diabetic wound healing. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 17-24, 2017.

BRITTO, D. de et al. Preparo de material nanoencapsulado a partir de vitamina C extraída de resíduo agroindustrial de acerola. 2020.

BUSH, Matthew J. et al. Hyphal compartmentalization and sporulation in *Streptomyces* require the conserved cell division protein SepX. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 71, 2022.

CARDOSO, K. B. B. Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus ochraceus* URM604 e *Aspergillus sclerotiorum* URM5792. **Dissertação**, 2020.

CARVALHO, Elisangela Nunes et al. Retrospective evaluation of characteristics of patients with burn injuries treated at the largest reference hospital in Brazil. **Plastic and Aesthetic Nursing**, v. 43, n. 1, p. 22-28, 2023.

CERQUEIRA, M. A.; BOURBON, A. I.; PINHEIRO, A. C.; MARTINS, J. T.; SOUZA, B. W. S.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. *Trends in Food Science e Technology*, v. 22, n. 12, p. 662-671, 2011.

CHAKRABORTY, R.; CHANDRA, A. L. Purification and characterization of a streptomycete collagenase. **Journal of applied bacteriology**, v. 61, n. 4, p. 331-337, 1986.

CHAREZA, Magdalena et al. Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4740, 2023.

CHOGAN, Faraz et al. Skin tissue engineering advances in burns: a brief introduction to the past, the present, and the future potential. **Journal of burn care & research: official publication of the American Burn Association**, v. 44, n. Suppl 1, p. S1, 2023.

CLARO, Francine Ceccon et al. Low cost membrane of wood nanocellulose obtained by mechanical defibrillation for potential applications as wound dressing. **Cellulose**, v. 27, p. 10765-10779, 2020.

COSTA, Elizianne Pereira et al. Extracellular collagenase isolated from *Streptomyces antibioticus* UFPEDA 3421: purification and biochemical characterization. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 260-271, 2024.

CUEBAS-IRIZARRY, Mara F.; GRUNDEN, Amy M. *Streptomyces* spp. as biocatalyst sources in pulp and paper and textile industries: Biodegradation, bioconversion and valorization of waste. **Microbial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. e14258, 2024.

CUKOR, Judith et al. The treatment of posttraumatic stress disorder and related psychosocial consequences of burn injury: a pilot study. **Journal of Burn Care & Research**, v. 36, n. 1, p. 184-192, 2015.

CUNHA, P. L. R.; VIEIRA, I. G. P.; ARRIAG, A. M. C.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 880-885, 2009.

DABOOR, S. M., BUDGE, S. M., GHALY, A. E., BROOKS, S. & DAVE, D. Extraction and purification of collagenase enzymes: a critical review. **J. Biochem Biotechnol.**, 6 (4), 239-263, 2010.

DANGI, Deepika et al. Synthesis and characterization of galactomannan polymer hydrogel and sustained drug delivery. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 4, p. 100230, 2022.

DARONCH, Oona Tomiê et al. Análise de pacientes idosos internados por queimaduras no Brasil. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 38, n. 4, p. e0762, 2023.

DAS, Shilpa et al. Plant polysaccharides for drug delivery in wound healing. In: *Plant Polysaccharides as Pharmaceutical Excipients*. Elsevier, 2023. p. 485-512.

DAVIDENKO, T. I. Immobilization of alkaline protease on polysaccharides of microbial origin. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 33, n. 9, p. 487-489, 1999.

DE AZEREDO, Luciana AI et al. Protease production by *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian Cerrado soil: optimization of culture medium employing statistical experimental design. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 108, p. 749-755, 2003.

DE BARROS, Carolina Fernanda; DE LIMA, Isabela Angeli; BUNHAK, Élcio José. Filmes poliméricos no manejo de feridas: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e10111628757-e10111628757, 2022.

DE FRANCESCO, Francesco; DE FRANCESCO, Marialuisa; RICCIO, Michele. Hyaluronic acid/collagenase ointment in the treatment of chronic hard-to-heal wounds: An observational and retrospective study. *Journal of Clinical Medicine*, v. 11, n. 3, p. 537, 2022.

DE LIMA JÚNIOR, Apolonio Alves et al. Genus *Streptomyces*: Recent advances for biotechnological purposes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 1504-1517, 2023.

DENTI, Andressa Franco. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, v. 45, n. 171, p. 97-110, 2021.

DHAL, Chetan; MISHRA, Renuka. In vitro and in vivo evaluation of gentamicin sulphate-loaded PLGA nanoparticle-based film for the treatment of surgical site infection. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 10, p. 1032-1043, 2020.

DHANASEELI, P. Bosco; BALASUBRAMANIAN, V. Screening, production and optimization of protease enzyme from *Streptomyces* species. **Biosci. Biotech. Res. Asia**, v. 11, p. 369-376, 2014. doi: 10.1099/jmm.0.001232. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32692643; PMCID: PMC7642979.

ELFAWY, Loai A. et al. Sustainable approach of functional biomaterials–tissue engineering for skin burn treatment: a comprehensive review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 701, 2023.

EL-NAGGAR, Noura El-Ahmady. Streptomyces-based cell factories for production of biomolecules and bioactive metabolites. In: **Microbial Cell Factories Engineering for Production of Biomolecules**. Academic Press, 2021. p. 183-234.

EL-SHERBENI, S. A.; NEGM, W. A. The wound healing effect of botanicals and pure natural substances used in in vivo models. **Inflammopharmacology**, v. 31, n. 2, p. 755-772, 2023.

ENDO, Akira et al. Purification and properties of collagenase from a Streptomyces species. **The Journal of Biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 163-170, 1987.

FAHIMIRAD, Shohreh; AJALLOUEIAN, Fatemeh. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. **International journal of pharmaceutics**, v. 566, p. 307-328, 2019

FALLON, Joan M. et al. **Enzyme compositions and use thereof for wound healing**. U.S. Patent Application n. 13/757,412, 8 ago. 2013.

FARZAN, Ramyar et al. A systematic review of social support and related factors among burns patients. **International Wound Journal**, v. 20, n. 8, p. 3349-3361, 2023.

FERNANDES, L. M. G. Produção e extração de proteases collagenolíticas obtidas de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 e sua imobilização em alginato. **Dissertação**, 2020.

FERREIRA, C. M.; D'ASSUMPÇÃO, E. A. Cicatrizes hipertróficas e queloides. **Rev. Soc. Bras. Cir. Plást.** V. 21, n. 1, p. 40-48, 2006.

FERREIRA, H. K. L. et al. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de Streptomyces sp G-27 contra microrganismos de interesse clínico. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade**, v. 3, n. 6, p. 367-373, 2016.

FERREIRA, Isabele Albuquerque Alcoforado; WANDERLEY, Maria Carolina de Albuquerque; PORTO, Ana Lucia Figueiredo. Primeiro relato de produção de collagenase por fungo isolado do solo da Caatinga-Rhizopus microsporus UCP 1296. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e398111234618-e398111234618, 2022.

FUENTES, Jhuniar Abrahan Marcía et al. Quantification of bioactive molecules, minerals and bromatological analysis in Ficarao (*Cassia grandis*). **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 3, 2020.

GAYATHRI, Hema S. Vaani V. Unni; CHANDRAN, Niranjana B. Smitha; SAMBHUDEVAN, Sreedha. Bio-based polymers containing traditional medicinal fillers for wound healing applications—An evaluation of neoteric development and future perspectives. **Biotechnol. J.**, v. 2300006, 2023.

GERSTL, Jakob VE et al. The global macroeconomic burden of burn injuries. **Plastic and reconstructive surgery**, p. 10.1097, 2021.

GLOBAL MARKET PROTEASE, 2022. Disponível em:
<https://www.alliedmarketresearch.com/protease-market-A12830>

GOHAIN, Anwesha et al. Actinobacteria: diversity and biotechnological applications. **Recent advancements in microbial diversity**, p. 217-231, 2020.

GOMES, Bruna Silva; DO BOMFIM, Fernando Russo Costa; DE JESUS LOPES FILHO, Gaspar. Photobiomodulation in wound healing process-literature review, 2020.

GOMES, Laiane Keylla Silva et al. Preparação e caracterização de filmes nanocompósitos à base de galactomanana e argilominerais para fotoproteção em frutas. 2018.

GOMES, Laiane Keylla Silva et al. Preparação e caracterização de filmes nanocompósitos à base de galactomanana e argilominerais para fotoproteção em frutas. 2018.

GONÇALVES, Francielle Cristine Pereira. Obtenção e caracterização de filmes à base de blendas de fécula de batata, quitosana e alginato de sódio. 2021.

GORA, Mehreen Manzoor et al. Biodiversity for Sustainable Development. In: **Biodiversity**. CRC Press, 2022. p. 369-379.

GROSU, Oxana-Madalina et al. Experimentally induced burns in rats treated with innovative polymeric films type therapies. **Biomedicines**, v. 11, n. 3, p. 852, 2023.

GU, G. X.; RAN, M. Z.; LI, M. M. Research advances on mental disorders in patients with extensive burns. **Zhonghua Shao Shang za zhi= Zhonghua Shaoshang Zazhi= Chinese Journal of Burns**, v. 39, n. 10, p. 994-998, 2023.

CHAUDHRY, N. et al. Psychosocial and Physical Rehabilitation of Burn Survivors: A large multicentre cluster randomised controlled trial from Pakistan. **European Psychiatry**, v. 66, n. Suppl 1, p. S906, 2023.

GUEST, Julian F.; FULLER, Graham W.; EDWARDS, Jacky. Cohort study evaluating management of burns in the community in clinical practice in the UK: costs and outcomes. **BMJ open**, v. 10, n. 4, p. e035345, 2020.

GUO, S. al; DIPIETRO, Luisa A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GUPTA, Vatsla; BISWAS, Deblina; ROY, Swarup. A comprehensive review of biodegradable polymer-based films and coatings and their food packaging applications. **Materials**, v. 15, n. 17, p. 5899, 2022.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.128. p. 254-257. 2019.

HACKENHAAR, C. R. Desenvolvimento de uma matriz de alginato e gelatina entrecruzada com genipina para imobilização de β -galactosidade. **Dissertação**, 2021.

HAMED, Mohamed Belal et al. Streptomyces protein secretion and its application in biotechnology. **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 22, p. fny250, 2018.

HAZARIKA, Shabiha Nudrat; THAKUR, Debajit. Actinobacteria. In: **Beneficial microbes in agro-ecology**. Academic Press, 2020. p. 443-476.

HERMAN, Ira M.; NIRANJAN, Priya; GROVER, Komel. Protease technology in wound repair. In: *Wound Healing, Tissue Repair, and Regeneration in Diabetes*. Academic Press, 2020. p. 357-391.

HMOOD, A. A. et al. Biological activities and wound healing potential of a water-soluble polysaccharide isolated from *Glycyrrhiza glabra* in Wistar rat. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, 2022.

HSU, Andrew; MUSTOE, Thomas A. The principles of wound healing. **Plastic surgery secrets plus**, p. 3-7, 2010.

INTISAR, Azeem et al. Enzyme immobilization on alginate biopolymer for biotechnological applications. In: **Microbial Biomolecules**. Academic Press, 2023. p. 471-488.

IVANKO, O. V.; VARBANETS, L. D.; VALAHUROVA, O. V. Collagenase activity of *Streptomyces* sp. 1349. **Mikrobiolohichni Zhurnal (Kiev, Ukraine: 1993)**, v. 64, n. 6, p. 21-27, 2002.

JAIN, Richa; JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. 2010.

JAISWAL, Lily; SHANKAR, Shiv; RHIM, Jong-Whan. Carrageenan-based functional hydrogel film reinforced with sulfur nanoparticles and grapefruit seed extract for wound healing application. **Carbohydrate polymers**, v. 224, p. 115191, 2019.

JESIONOWSKI, Teofil; ZDARTA, Jakub; KRAJEWSKA, Barbara. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, v. 20, p. 801-821, 2014.

JOSE, Polpass Arul; MAHARSHI, Anjisha; JHA, Bhavanath. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiological Research*, v. 246, p. 126708, 2021.

JUN, L. Y. et al. An overview of immobilized enzyme technologies for dye and phenolic removal from wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 102961, 2019.

KABADJOVA, P. et al. Isolation and distribution of *Streptomyces* populations with heat-resistant collagenolytic activity from two protein-rich areas in Bulgarian soils. **Folia microbiologica**, v. 41, p. 423-429, 1996.

KABADJOVA, P.; VLAHOV, S. Regulation of extracellular collagenase production in *Streptomyces candidus* 91. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 11, n. 1-2, p. 39-46, 1997.

KANDHWAL, Mimansa et al. Role of matrix metalloproteinase in wound healing. **American Journal of Translational Research**, v. 14, n. 7, p. 4391, 2022.

KOO, Bon-Joon et al. Optimal production conditions of *Streptomyces griseus* trypsin (SGT) in *Streptomyces lividans*. **BMB Reports**, v. 32, n. 1, p. 86-91, 1999.

KOO, BON-JOON; KWANG, HEE BAE. Purification and characterization of Streptomyces griseus trypsin overexpressed in Streptomyces lividans. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 333-340, 1998.

KOSHY, Jijo Thomas et al. Biopolymer Based Multifunctional Films Loaded with Anthocyanin Rich Floral Extract and ZnO Nano Particles for Smart Packaging and Wound Healing Applications. **Polymers**, v. 15, n. 10, p. 2372, 2023.

KOTUN, A. M. Genetic and biochemical analyses of Streptomyces coelicolor FtsZ, SepF, and other possible FtsZ-interacting proteins. **Dissertação**, 2013.

KOVALENKO, G. A. Immobilized proteolytic enzymes for external use. **Pharmaceutical chemistry journal**, v. 32, n. 4, p. 213-216, 1998.

LANDÉN, Ning Xu; LI, Dongqing; STÅHLE, Mona. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, p. 3861-3885, 2016.

LAHIRI, Dibyajit et al. Immobilized enzymes as potent antibiofilm agent. **Biotechnology Progress**, v. 38, n. 5, p. e3281, 2022.

LAVUDI, Harikrishna Naik et al. Viscous Behaviour and Interactive Nature of Indigenous Legume Seed Galactomannans and Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery. **Legume Research-An International Journal**, v. 1, p. 8. 2023

LAVUDI, Harikrishna Naik; SUTHARI, Sateesh. Application of Legume Seed Galactomannan Polysaccharides. Sustainable Agriculture Reviews 45: Legume Agriculture and Biotechnology Vol 1, p. 97-113, 2020.

LI, H., XUE, Y., JIA, B., BAI, Y., ZUO, Y., WANG, S., ZHAO, Y., YANG, W., TANG, H. The preparation of hyaluronic acid grafted pullulan polymers and their use in the formation of novel biocompatible wound healing film. **Carbohydrate Polymers**, 188, 92–100, 2018.

LI, Ruotao et al. Bioactive materials promote wound healing through modulation of cell behaviors. **Advanced Science**, v. 9, n. 10, p. 2105152, 2022.

LI, Xia et al. Collagen peptide provides Streptomyces coelicolor CGMCC 4.7172 with abundant precursors for enhancing undecylprodigiosin production. **Journal of Leather Science and Engineering**, v. 3, p. 1-10, 2021.

LI, Xuehua et al. A polysaccharide/chitin hydrogel wound dressing from a Periplanatta americana residue: coagulation, antioxidant activity, and wound healing properties. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, p. 1-24, 2023.

LIMA, Lorena Azevedo et al. Produção de protease colagenolítica por Bacillus stearothermophilus de solo amazônico. **Acta Amazonica**, v. 44, p. 403-410, 2014.

LITTLE, Darby; MASON, Stephanie A. 110 Seven-Year Analysis of National Rehabilitation Trends and Outcomes Among Burn Patients. **Journal of Burn Care & Research**, v. 45, n. Supplement_1, p. 89-89, 2024.

MADEA, Burkhard; DOBERENTZ, Elke. Injuries Due to Heat. **Handbook of Forensic Medicine**, v. 2, p. 607-625, 2022.

MAGHRABY, Yasmin R. et al. Enzyme immobilization technologies and industrial applications. *ACS omega*, v. 8, n. 6, p. 5184-5196, 2023.

MAGNANI, Dicarla Motta; SASSI, Fernanda Chiarion; ANDRADE, Claudia Regina Furquim de. Reabilitação motora orofacial em queimaduras em cabeça e pescoço: uma revisão sistemática de literatura. **Audiology-Communication Research**, v. 24, p. e2077, 2019.

MAIA, Allan Lemos et al. Curativo com filme e gel de biopolímero de celulose bacteriana no tratamento de feridas isquêmicas após revascularização de membros inferiores. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 46, p. e20192260, 2019.

MARCIA, Jhunion et al. Attributes of *Lactobacillus acidophilus* as Effected by Carao (*Cassia grandis*) Pulp Powder. *Fermentation*, v. 9, n. 5, p. 408, 2023.

MARCÍA-FUENTES, Jhunion et al. The Carao (*Cassia grandis* L.): Its Potential Usage in Pharmacological, Nutritional, and Medicinal Applications. *Innovations in Biotechnology for a Sustainable Future*, p. 403-427, 2021.

MEDEIROS, Aldo Cunha; FILHO, Antônio Medeiros Dantas. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal of surgical and clinical research*, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016. Disponível em: <http://revista.spdv.com.pt/index.php/spdv/article/view/71>. Acesso em: 13 nov. 2021.

MEGO, IVÁN ORLANDO GONZALES et al. Burns unit at the Hospital de Clínicas of the Universidade Federal de Uberlândia, Brazil: an epidemiological study. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 37, p. 189-193, 2022.

MEHMOOD, Yasir et al. Amikacin-Loaded Chitosan Hydrogel Film Cross-Linked with Folic Acid for Wound Healing Application. *Gels*, v. 9, n. 7, p. 551, 2023.

MENDES, Adriano A. et al. Application of chitosan as support for immobilization of enzymes of industrial interest. **Química Nova**, v. 34, p. 831-840, 2011.

MESQUITA, M. V. N. et al. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas Enzymatic immobilizations in polymeric matrixes. **Boletim Informativo Geum**. V. 9, n. 2, p. 38–50, 2018.

METSAVAHT, Leandra d'Orsi. Queimaduras e suas cicatrizes. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 4, p. 281-284, 2017.

MIRANDA, Mayker Lazaro Dantas; FERNANDES, Cassia. Films and Edible Coatings in the Development of Biodegradable Packaging: Sustainable and Eco-friendly Alternatives. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 3, 2022.

MUNIZ, Jéssica; DE MENEZES, Livia Rodrigues. Dressing systems based on chitosan as active transport platforms in the treatment of burnt skin: Mini-review. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 33, n. 10, p. 3112-3124, 2022.

MURI, Estela Maris Freitas. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídeomiméticos. **Química Nova**, v. 37, p. 308-316, 2014.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subullissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. *Advances in Enzyme Research*, vol. 03, no. 03, p. 81-91.2015.

NEAGU, Tiberiu Paul et al. Factors involved in burn wound healing—short review. **Romanian Journal of medical Practice**, v. 17, n. 4, p. 92, 2022.

NIGRO, MARCELUS VINICIUS DE ARAÚJO SANTOS et al. Epidemiological profile of 0-18-year-old child victims of burns treated at the Plastic Surgery and Burns Service of a University Hospital in Southern Brazil. **Revista brasileira de cirurgia plástica**, v. 34, p. 504-508, 2023.

OH, Jamie et al. 95 Shifting Payor Mix May Challenge Financial Sustainability of Burn Centers. **Journal of Burn Care & Research**, v. 44, n. Supplement_2, p. S54-S54, 2023.

OLIVEIRA, V. M. et al. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet**. V. 11, Nº 3. p. 243-255, 2017.

OLIVEIRA, Vagne de Melo. Obtenção de proteases a partir do trato digestivo de peixes neotrópicos para aplicação na produção de peptídeos de colágeno. **Tese**, 2015.

PAL, Kunal et al. Essential oil-loaded biopolymeric films for wound healing applications. In: **Advances in Biomedical Polymers and Composites**. Elsevier, 2023. p. 541-562.

PATEL, Kartik; AMARESAN, Natarajan. Mass Multiplication, Production Cost Analysis and Marketing of Protease. In: **Industrial Microbiology Based Entrepreneurship: Making Money from Microbes**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 11-24.

PATRICK, Amanda; CHEN-CHARPENTIER, Benito. Ready to rebuild: Modeling proliferation and remodeling stages of the wound healing process. **Authorea Preprints**, 2023.

PATRY, Jérôme; BLANCHETTE, Virginie. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *International wound journal*, v. 14, n. 6, p. 1055-1065, 2017.

PAZ, David et al. Probiotic Characteristics of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* as Influenced by Carao (*Cassia grandis*). *Fermentation*, v. 8, n. 10, p. 499, 2022.

PEREIRA, Waldir Eduardo Simioni et al. A collagenolytic aspartic protease from *Thermomucor indica-seudaticae* expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 3, p. 1258-1270, 2020.

PETROVA, D.; DEREKOVA, A.; VLAHOV, S. Purification and properties of individual collagenases from *Streptomyces* sp. strain 3B. **Folia microbiologica**, v. 51, p. 93-98, 2006.

PHILIPPS-WIEMANN, Petra. Proteases—general aspects. In: **Enzymes in Human and Animal Nutrition**. Academic Press, 2018. p. 257-266.

PHIMNUAN, Preeyawass et al. Beneficial effects of a Blended fibroin/aloe gel extract film on the Biomolecular Mechanism (s) via the MAPK/ERK Pathway relating to Diabetic wound healing. **ACS omega**, v. 8, n. 7, p. 6813-6824, 2023.

PONPHAIBOON, Juthaporn et al. Advances in natural product extraction techniques, electrospun fiber fabrication, and the integration of experimental design: a comprehensive review. **Molecules**, v. 28, n. 13, p. 5163, 2023.

POTTER, Daniel A.; VEITCH, David; JOHNSTON, Graham A. Scarring and wound healing. **British Journal of Hospital Medicine**, v. 80, n. 11, p. C166-C171, 2019.

POTTER, Melissa et al. An evaluation of clinical psychology input into burns multidisciplinary follow-up clinics. **Scars, Burns & Healing**, v. 9, p. 20595131221141083, 2023.

PRABHU, S. R. Healing: Tissue Regeneration and Repair. In: **Textbook of General Pathology for Dental Students**. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023. p. 49-56.

PRIYA, B. Sathya; STALIN, T.; SELVAM, K. Efficient utilization of xylanase and lipase producing thermophilic marine actinomycetes (*Streptomyces albus* and *Streptomyces hygroscopicus*) in the production of ecofriendly alternative energy from waste. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 78, p. 14320-14325, 2012.

PROCÓPIO, R. E. L.; SILVA, I. R.; MARTINS, M. K.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, J. M. Antibiotics produced by *Streptomyces*. **Braz J Infect Dis**. v.16, n.5, 2012.

PUNEKAR, N. S.; PUNEKAR, N. S. On Enzyme Nomenclature and Classification. **ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms**, p. 33-41, 2018.

QUINN, G. A., BANAT, A. M., ABDELHAMEED, A. M., BANAT, I. M. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. **J Med Microbiol**. 2020 Aug;69(8):1040-1048.

QURAISHI, Aftab; BHUVANESHWARI, J.; ROOPA, C. A systematic review on wound healing. **International Journal of Indigenous Herbs and Drugs**, p. 62-68, 2023.

RAFEEQ, Hamza et al. Biological macromolecules for enzyme immobilization. In: **Biological Macromolecules**. Academic Press, 2022. p. 529-546.

RAMANAN, Siddharth Venkat; RAJAN, Jayanth; RAJAN, Shobana. The Coagulation Cascade. In: **Transfusion Practice in Clinical Neurosciences**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 257-264.

RAPPOPORT, Dmitriy; JINICH, Adrian. Enzyme Substrate Prediction from Three-Dimensional Feature Representations Using Space-Filling Curves. **Journal of chemical information and modeling**, v. 63, n. 5, p. 1637-1648, 2023.

RASSULIN, Yu A.; SHIBNEV, V. A. The collagenolytic action of the proteolytic complex of streptomyces griseus on synthetic substrates. **Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science**, v. 19, p. 2228-2230, 1970.

RICCIO, Bruno Vincenzo Fiod et al. Exploiting polymeric films as a multipurpose drug delivery system: a review. **AAPS PharmSciTech**, v. 23, n. 7, p. 269, 2022.

RODRIGUEZ-ABETXUKO, Andoni et al. Tunable polymeric scaffolds for enzyme immobilization. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 830, 2020.

RUIZ, Paola Andrea Santos; ESPINEL, Laura Nathaly Barrios. Aplicación de pigmentos producidos por Streptomyces coelicolor en la síntesis de nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana. **Hechos Microbiológicos**, v. 13, n. 1, p. 37-46, 2022.

SABANDO, Constanza et al. A novel hydrocolloid film based on pectin, starch and Gunnera tinctoria and Ugni molinae plant extracts for wound dressing applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 280-292, 2020.

SAINI, Anita; AGGARWAL, Neeraj K.; YADAV, Anita. Cellulolytic potential of actinomycetes isolated from different habitats. **Bioeng. Biosci**, v. 4, n. 5, 2016.

SAKURAI, Yasuko et al. Purification and characterization of a major collagenase from Streptomyces parvulus. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 21-28, 2009.

SALOMATINA, E. V. et al. Biocompatible compositions based on chitosan and copolymer (lactide–titanium oxide) for engineering of tissue substitutes for wound healing. **Polymer Bulletin**, v. 77, p. 5083-5101, 2020.

SANJANWALA, Dhruv et al. Polysaccharide-based hydrogels for drug delivery and wound management: a review. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 19, n. 12, p. 1664-1695, 2022.

SANTOS, João Vasco et al. Burden of burns in Brazil from 2000 to 2014: a Nationwide Hospital-Based Study. **World journal of surgery**, v. 41, p. 2006-2012, 2017.

SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; RICARDO BRAGA-JR, A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181 0188. 2018.

SANTOS, Petrios Zacarias de Medeiros Santos. **Perfil epidemiológico de pacientes queimados hospitalizados durante a pandemia de COVID-19 no Rio Grande do Norte**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SEIXAS, José Roberto Pimentel Cabral de. **Obtenção, caracterização e avaliação da citotoxicidade de membrana à base de galactomanana contendo lactoferrina incorporada**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

SHAIK, Mobeen et al. Isolation and characterization of bioactive metabolites producing marine *Streptomyces parvulus* strain sankarensis-A10. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 87-94, 2017.

SHANKAR, Ravi; UPADHYAY, Prabhat Kumar; KUMAR, Manish. Protease enzymes: Highlights on potential of proteases as therapeutics agents. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, p. 1281-1296, 2021.

SHANMUGAPRIYA, K. *et al.* Fabrication of multifunctional chitosan-based nanocomposite film with rapid healing and antibacterial effect for wound management. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2018. v. 118, p. 1713–1725.

SHAO, Meiling et al. Synthesis and properties of biodegradable hydrogel based on polysaccharide wound dressing. **Materials**, v. 16, n. 4, p. 1358, 2023.

SHAO, Yanxiong; ZHOU, Haiwen. Clinical evaluation of an oral mucoadhesive film containing chitosan for the treatment of recurrent aphthous stomatitis: A randomized, double-blind study. **Journal of dermatological treatment**, 2019.

SHARMA, P. DUTTA, J., THAKUR, D. Chapter 21 - Future Prospects of Actinobacteria in Health and Industry. *In: New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Actinobacteria: Diversity and Biotechnological Applications*. Pg. 305-324. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00021-7

SHEKHETER, Anatoly B. et al. Collagenolytic enzymes and their applications in biomedicine. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 487-505, 2019.

SHEOKAND, Bharti et al. Natural polymers used in the dressing materials for wound healing: Past, present and future. **Journal of Polymer Science**, v. 61, n. 14, p. 1389-1414, 2023.

SHI, Jun et al. Titer improvement and pilot-scale production of platensimycin from *Streptomyces platensis* SB12026. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 7, p. 1027-1035, 2016.

SILVA NETO, J. F. et al. Extraction, purification and electrical characterization of gross galactomannan and purified galactomannan obtained from *Adenanthera pavonina* L. Seeds. *Chemistry & Biodiversity*, v. 20, n. 2, p. e202200888, 2023.

SILVA, Aderbal et al. Testes para quebra de dormência de sementes de *Cassia grandis* L. f. e, morfologia de sementes, frutos e plântulas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, 2012.

SILVA, Liliada G. et al. Bacterial cellulose an effective material in the treatment of chronic venous ulcers of the lower limbs. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 7, p. 79, 2021.

SILVEIRA, Luciana Lopes. Purificação e Caracterização de Protease com Atividade Colagenolítica produzida por *Actinomadura* sp. **Dissertação**, 2015.

SINGU, Bhupender; ANNAPURE, Uday. Role of enzymes in pharmaceutical and biotechnology industries. **Enzymes in Food Technology: Improvements and Innovations**, p. 167-185, 2018.

SLJIVIC, Sanja et al. 782 achieving optimal care in burns using enhanced recovery after surgery guidelines. **Journal of Burn Care & Research**, v. 43, n. Supplement_1, p. S197-S198, 2022.

SLOVAKOVA, Marcela et al. Clostridial collagenase immobilized on chitosan nanofibers for burn healing. **Military Medical Science Letters**, volume 91, issue: 4, 2022.

SORAPUKDEE, Supaluk et al. Collagenolytic proteases from *Bacillus subtilis* B13 and *B. siamensis* S6 and their specificity toward collagen with low hydrolysis of myofibrils. **Lwt**, v. 126, p. 109307, 2020.

SOUZA, L. T. DE A. et al. **Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte**. São Paulo: Blucher, 2017.

SU, Chen-Yi et al. Histopathological study on collagen in full-thickness wound healing in Fraser's dolphins (*Lagenodelphis hosei*). **Animals**, v. 13, n. 10, p. 1681, 2023.

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.

SZYMAŃSKI, Łukasz et al. Differential Effects of Overexpression of Wild Type and Kinase-Dead MELK in Fibroblasts and Keratinocytes, Potential Implications for Skin Wound Healing and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 9, p. 8089, 2023.

TAN, Z. et al. Expanding the Biocatalytic Scope of Enzyme-Loaded Polymeric Hydrogels. *Gels* 2021, 7, 194. 2021.

TEIXEIRA, J. A. C. ; PORTO, A. L. F. . Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. *Protein Expression and Purification*, p. 8-14, 2017. DOI: 10.1016/j.pep.2017.02.010.

TOHAR, Ran et al. Screening collagenase activity in bacterial lysate for directed enzyme applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 8552, 2021.

TURGEON, Lori et al. 41 An Examination of Factors Predicting Inpatient Rehabilitation Stay After Burn Injury. **Journal of Burn Care & Research**, v. 44, n. Supplement_2, p. S13-S13, 2023.

VALLADARES, Fernando. More biodiversity to improve our health: The benefits to human well-being of favouring functional and diverse ecosystems. **Metode Science Studies Journal**, n. 13, p. 111–117, 2023.

VAN BERGEIJK, D.A., TERLOUW, B.R., MEDEMA, M.H., VAN WEZE, G. P. Ecology and genomics of Actinobacteria: new concepts for natural product discovery. **Nat Rev Microbiol** 18, 546–558 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0379-y>

VELOSO, Enide Neiva Santos Martins et al. HOSPITALIZAÇÕES PARA TRATAMENTO DE QUEIMADURAS E CORROSÕES NO BRASIL: 2008-2022. **COORTE-Revista Científica do Hospital Santa Rosa**, n. 16, 2023.

VERMA, Kush et al. Assessing Return to Work Outcomes for Individuals Affected by Burn Injuries: A Comprehensive Study. **Cureus**, v. 16, n. 2, 2024.

VITOLO, M. Enzimas: as proteínas catalisadoras. In: VITOLO, M.; PESSOA JR., A.; SOUZA, G. M.; CARVALHO, J.C.M.; STEPHANO, M.A.; SATO, S. Biotecnologia Farmacêutica: Aspectos sobre aplicação industrial. São Paulo: Editora Blucher, Cap. 5, p.203-228. 2015.

VOLETY, Rohit; JEEVA, J. B. Classification of burn images into 1st, 2nd, and 3rd degree using state-of-the-art deep learning techniques. **ECS Transactions**, v. 107, n. 1, p. 18323, 2022.

VOSS, Guilherme T. et al. Polysaccharide-based film loaded with vitamin C and propolis: A promising device to accelerate diabetic wound healing. **International journal of pharmaceutics**, v. 552, n. 1-2, p. 340-351, 2018.

WALLACE, Heather A.; BASEHORE, Brandon M.; ZITO, Patrick M. Wound healing phases. **Europe PMC**. 2017.

WANDERLEY, M. C. A.; DUARTE NETO, J. M. ; LIMA, C. A. ; SILVERIO, S. I. C.; LIMA FILHO, J. L. ; TEIXEIRA, J. A. C. ; PORTO, A. L. F. . Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium* sp. UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 4, p. 001-010, 2016.

WANDERLEY, Maria Carolina de Albuquerque et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, p. 13-24, 2017.

WANG, Yunchuan et al. Adipose Mesenchymal Stem Cell–Derived Exosomes Promote Keratinocytes And Fibroblasts Embedded in Collagen/Platelet-Rich Plasma Scaffold And Accelerate Wound Healing. **Advanced Materials**, p. 2303642, 2023.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 63, n. 5. p. 520 526, 2004.

WATHONI, N. *et al.* Sacran hydrogel film containing keratinocyte growth factor accelerates wound healing by stimulating fibroblast migration and re-epithelization. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 2019. v. 67, n. 8, p. 849–854.

WESTERHOF, Wiete; VERSCHOOR, Jacob. **Use of polysaccharides in preparation for wound treatment**. U.S. Patent n. 5,204,103, 20 abr. 1993.

WOONNOI, Wanwipha et al. In vitro antioxidant and wound healing activity of *Sargassum polycystum* hydroethanolic extract in fibroblasts and keratinocytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 13, n. 5, p. 222-232, 2023.

YANG, Chao-Hsun; LIU, Wen-Hsiung. Purification and properties of a maltotriose-producing α -amylase from *Thermobifida fusca*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2-3, p. 254-260, 2004.

YANG, Fan et al. The biological processes during wound healing. **Regenerative medicine**, v. 16, n. 4, p. 373-390, 2021.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**. v. 171, n. 5. p. 299-323. 2011.

YUAN, Zhen et al. A cellulose/Konjac glucomannan–based macroporous antibacterial wound dressing with synergistic and complementary effects for accelerated wound healing. **Cellulose**, v. 28, p. 5591-5609, 2021.

ZHANG, Chuwei et al. Chitosan degradation products promote healing of burn wounds of rat skin. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1002437, 2022.

ŻWIEREŁŁO, Wojciech et al. Burns: Classification, pathophysiology, and treatment: A review. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, p. 3749, 2023.

4 RESULTADOS

CAPÍTULO I

Capítulo publicado no livro: Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde

ISBN: 978-65-85712-37-8

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

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.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

RESUMO

Feridas são lesões na pele causadas por diversos fatores, tornando-a vulnerável a infecções por microrganismos patogênicos. Essas infecções podem levar a complicações e retardar o processo de cicatrização. O controle microbiano é fundamental para mitigar os riscos de infecção, e estratégias como esterilização, desinfecção e o uso de agentes antimicrobianos são aplicadas. Este capítulo aborda em uma revisão narrativa, os principais desafios na cicatrização de feridas, e as técnicas que vêm sendo utilizadas e melhoradas para enfrentá-lo. O colágeno desempenha um papel fundamental no processo de cicatrização, e a collagenase é uma enzima que atua na degradação do colágeno, facilitando a regeneração do tecido. Estratégias para tratamento de feridas incluem diferentes tipos de curativos e substitutos de pele têm sido promissoras no desenvolvimento de produtos para acelerar a cicatrização. Avanços nessas áreas podem levar a terapias mais eficazes, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com feridas crônicas ou de difícil cicatrização.

Palavras-chave: microbiologia cutânea; biologia das feridas; collagenases; cicatrização de tecidos; abordagem terapêutica.

1 INTRODUÇÃO

Feridas são lesões que afetam a integridade da pele e podem ser causadas por diversos fatores, como cortes, queimaduras e contusões que podem levar a casos de ulcerações. A partir do momento que a pele é lesada, a ferida torna-se suscetível à invasão de microrganismos com potencial patogênico (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A presença de microrganismos patogênicos podem causar problemas severos a indivíduos acometidos, incluindo infecções sistêmicas e retardo na cicatrização (PERCIVAL, *et al.*, 2015). Dessa

forma, feridas representam um desafio significativo para a saúde humana, exigindo não somente cuidados adequados quanto também estratégias eficientes para o controle microbiano tópico e possibilitar uma cicatrização adequada. O desenvolvimento da cicatrização é subdividido em três fases que podem ocorrer concomitantemente, sendo elas: inflamação, proliferação e remodelamento (ISAAC *et al.*, 2010).

Estratégias para o controle microbiano são fundamentais na busca por mitigar as ameaças causadas por microrganismos patogênicos, responsáveis por diversas doenças infecciosas. Dentre elas a esterilização e desinfecção na superfície de objetos e materiais biológicos e também em uma frente farmacológica, a utilização de agentes antimicrobianos como antibióticos e antivirais que tem como o objetivo neutralizar especificamente potenciais patógenos, enquanto as demais células do tecido permanecem íntegras. Além disso, destacam-se técnicas inovadoras como a utilização de biomateriais e nanopartículas para o controle microbiano (BERTOGLIO *et al.*, 2020).

Para aperfeiçoar o processo de cicatrização de feridas, o controle dos microrganismos no local é primordial. Portanto, a limpeza e desinfecção adequadas da ferida são essenciais para reduzir a carga bacteriana, sendo que abordagens multidisciplinares são necessárias. Após uma limpeza apropriada, estratégias como o uso de curativos adequados desempenham papel fundamental para evitar contaminações adicionais e auxiliar no processo de cicatrização (ARAGÃO, 2013). Além disso, a utilização de biopolímeros (CHOPRA *et al.*, 2022) também contribui para a melhora da cicatrização. Outras estratégias são aplicadas dependendo das circunstâncias em que a ferida se encontra, tais como enxertos de pele, terapia com luz de baixa intensidade e terapia com oxigênio hiperbárico. Essas abordagens

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

combinadas possibilitam uma resposta eficaz no processo de cura de feridas, promovendo a regeneração saudável dos tecidos lesados.

Em suma, diante da complexidade das feridas e da ameaça representada pela invasão de microrganismos patogênicos, é evidente a necessidade de estratégias eficientes para o controle microbiano e promoção da cicatrização adequada. A esterilização, desinfecção e o uso de agentes antimicrobianos têm se mostrado fundamentais na mitigação dos riscos de infecções e complicações. Além disso, o emprego de técnicas inovadoras, como biomateriais e nanopartículas, vem se destacando na busca por soluções mais eficazes. A abordagem multidisciplinar, que envolve a limpeza e desinfecção adequadas da ferida, o uso de curativos apropriados e a aplicação de biopolímeros, enxertos de pele e outras terapias, possibilita uma resposta mais eficaz no processo de cura, permitindo a regeneração saudável dos tecidos lesados. Assim, investir em pesquisas e aprimorar as abordagens terapêuticas é de extrema importância para enfrentar o desafio das feridas e promover uma melhor qualidade de vida aos pacientes.

2.DESENVOLVIMENTO

2.1 Microrganismos patogênicos encontrados em feridas

Um dos principais desafios no tratamento e cicatrização de feridas sejam estas cortes, abrasões ou queimaduras, é o risco de infecção uma vez que fornecem um ambiente propício para o crescimento e proliferação de microrganismos (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Estas infecções são alarmantes visto que os microrganismos podem trazer complicações adicionais, dificultando ainda mais o processo de cicatrização. Em condições favoráveis ao seu crescimento podem prejudicar a proliferação e migração celular necessárias para a regeneração do tecido, desencadear uma resposta inflamatória crônica,

destruir o tecido saudável, enfraquecer o sistema imunológico local, tornar a área suscetível a infecções secundárias de outros microrganismos. Além de se espalhar além da área da ferida, afetando tecidos adjacentes e órgãos internos resultando em complicações sistêmicas graves que representam risco à saúde do indivíduo infectado (MA & AN *et al.*, 2018).

Os patógenos mais comuns são as bactérias, destacando-se os gêneros *Pseudomonas*, *Providencia*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Hafnia* e *Escherichia* (LIMA *et al.*, 2021; SOLANKI & NAGORI, 2013). Essas bactérias podem invadir o tecido danificado, formando colônias e liberando toxinas nocivas e causando infecções localizadas ou generalizadas. Algumas cepas de bactérias, como as resistentes a antibióticos, representam um desafio adicional, tornando o tratamento mais complexo e potencialmente comprometendo a eficácia dos medicamentos (OLI *et al.*, 2017). Assim como as bactérias, os fungos podem se beneficiar do ambiente nutritivo e úmido para sua proliferação. *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* são exemplos comuns de fungos patogênicos que pode causar infecções oportunistas (TSEUNG, K.S.Y., & ZHAO, 2016).

Além disso, com a falta de desenvolvimento de novos agentes antibióticos, a resistência aos medicamentos nos infectados ainda é um problema difícil de resolver. Este aumento na resistência vem associado à fascinante descoberta de que microrganismos patogênicos são capazes de produzir um complexo multicelular conhecido como biofilme (TSEUNG & ZHAO, 2016), comunidades complexas e altamente organizadas de microrganismos em uma superfície biótica ou abiótica com a ajuda de uma matriz extracelular hidrofóbica, dentre as principais características de um biofilme estão: Matriz extracelular (composta por polissacarídeos resistentes e de alta aderência como galactomanana, DNA extracelular, Proteínas que atuam na proteção da

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

colônia, como a Catalase B e Melanina); Células persistentes (variantes fenotípicas que entram em um estado de aparente dormência, não se reproduzem e exibem tolerância a múltiplos fármacos, sendo capazes de sobreviver mesmo quando expostas a diferentes antimicrobianos conhecidos) (ABRANTES & NOGUEIRA, 2022); Bombas de efluxo (proteínas de transporte que auxiliam na remoção de substratos tóxicos de dentro das células para o ambiente externo, auxiliando na manutenção da homeostase) (ALAV, SUTTON & RAHMAN, 2018); Proteína de choque térmico 90 (Hsp90) (atuando na sinalização celular e manutenção do biofilme) (LOTTERMAN *et al.*, 2003); e Ergosterol (proveniente da parede celular fúngica) (TSEUNG & ZHAO, 2016).

A prevenção e o tratamento adequados de infecções em feridas são fundamentais para minimizar os perigos dos microrganismos patogênicos. Isso inclui a limpeza adequada da ferida, o uso de técnicas assépticas durante procedimentos médicos e a administração apropriada de terapia antimicrobiana quando necessário. Além disso, a identificação precoce de sinais de infecção, como aumento da dor, vermelhidão, inchaço ou secreção purulenta, é crucial para intervir prontamente e evitar complicações (ARIKAN *et al.*, 2018; MEO *et al.*, 2021).

2.2. Cicatrização de feridas

A cicatrização de feridas é um processo natural, que visa restaurar a função e integridade da pele (MOREIRA *et al.*, 2015). O processo cicatricial ocorre após uma lesão pela ação de agentes mecânicos ou térmicos, que levam à ruptura da pele ou de outros órgãos e danos ao tecido e sua vascularização (RODRIGUES *et al.*, 2019). É um processo complexo e dinâmico, no qual ocorre em fases distintas: homeostasia, fase inflamatória, fase proliferativa e fase de

remodelação (ISAAC *et al.*, 2010). Em todas as fases há vários tipos de células, enzimas e proteínas (RIDIANDRIES *et al.*, 2018).

A resolução da lesão começa mediante a hemostasia através da vasoconstrição e formação de coágulo, levando à cessação do sangramento. A vasoconstrição ocorre de maneira rápida e posteriormente há uma resposta inversa, a vasodilatação (BESERRA *et al.*, 2020).

A fase inflamatória é caracterizada pela resposta inflamatória inicial. O processo de inflamação é desencadeado após a lesão tecidual e segue uma sequência de eventos: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, para o local lesado (EMING *et al.*, 2017), podendo resultar em vermelhidão e coceira na região (WALLENGREN, SUNDLER, WASSBERG, 2011). Além disso, citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento também são secretados (STADELMANN *et al.*, 1998; MIRZA & KOH, 2011).

Na fase proliferativa, há a epitelização, formação de novos vasos sanguíneos, formação de tecido de granulação e deposição do colágeno. Dentre as principais células estão os fibroblastos e as células endoteliais (AMINI-NIK *et al.*, 2012). Os fibroblastos são responsáveis pela produção de colágeno, uma proteína que dá suporte estrutural à pele. Assim como também sintetizam outras substâncias, como a matriz extracelular, que fornece o ambiente necessário para a migração de células, a angiogênese e a epitelização (BARRIENTOS *et al.*, 2014; DARBY *et al.*, 2014).

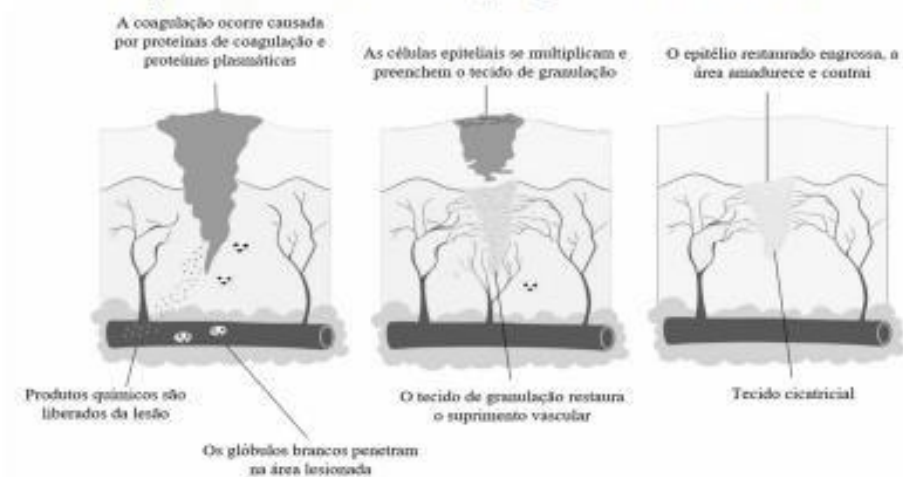
Por último, a fase de remodelação envolve a reorganização e maturação do tecido cicatricial formado. Há a remodelação do tecido de granulação e é caracterizada pela deposição direcionada do colágeno, o que culmina na maturação do processo cicatricial. (MEDEIROS & DANTAS-FILHO, 2016). As metaloproteinases da matriz (MMPs)

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

desempenham um papel essencial na degradação da matriz extracelular imatura e na reorganização das fibras de colágeno do tipo III em colágeno do tipo I. O colágeno tipo III é substituído gradativamente pelo colágeno tipo I, assim aumentando a resistência. Ao mesmo tempo, os inibidores teciduais (TIMPs) atuam como reguladores da atividade das MMPs, garantindo um equilíbrio adequado na remodelação tecidual (ATKINSON E D'ORTHO, 2002; MEDEIROS & DANTAS-FILHO, 2016).

O colágeno desempenha um papel fundamental na cicatrização de feridas devido às suas propriedades estruturais e funcionais. Como principal proteína do tecido conjuntivo, o colágeno fornece suporte e estabilidade para as células e tecidos, além de contribuir para a integridade da matriz extracelular. Sua presença e regulação adequada são essenciais para um processo de cicatrização eficiente e a formação de uma cicatriz funcional (FLETCHER, 2000).

Com isso, há um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno pela ação da collagenase (BESERRA *et al.*, 2020). Durante o processo de cicatrização, a collagenase é produzida por diferentes tipos de células, como fibroblastos e macrófagos, e é liberada no local da ferida (RILEY & HERMAN, 2005). Na fase inflamatória, a enzima auxilia na remoção de detritos celulares e na preparação do leito da ferida para a formação de novo tecido. Atuando também na remodelação e reorganização das fibras de colágeno durante as fases subsequentes da cicatrização (RILEY & HERMAN, 2005), um resumo desta ação pode ser visto na figura 1.

Figura 1. Processo de cicatrização após uma lesão tecidual

Fonte: autores (2023).

2.3. Colágeno, Colagenase e Peptídeos

O colágeno é uma das proteínas mais abundantes em animais, representando 30% do total de proteínas distribuídas pelo corpo. São compostas por três subunidades proteicas em forma de tripla hélice, que se enovelam em torno do mesmo eixo. Durante o processo de cicatrização, o colágeno desempenha diversas funções essenciais, tais como: matriz para migração celular; ativação de cascata de sinalização; estimulação da síntese de colágeno; resistência e remodelação do tecido (SHARMA *et al.* 2022), sendo extremamente importante para a regeneração tecidual, um resumo do papel do colágeno pode ser observado na Figura 2. Além das funções essenciais acima mencionadas, é imperativo enfatizar a importância fundamental da enzima colagenase no processo de cicatrização de feridas, a partir da orientação a remodelação do tecido reparado (MATHEW-STEINER, ROY & SEN, 2021).

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

Figura 2. Representação gráfica da atuação do colágeno e de peptídeos de colágeno em diferentes fases da regeneração tecidual.



Fonte: Os autores (2023).

A collagenase é uma proteína específica que possui a capacidade de desintegrar as fibras de colágeno, facilitando assim a remoção do tecido danificado e desorganizado. Esse processo de degradação regulada do colágeno é fundamental na preparação da base para a cura, permitindo a migração sistemática de células especializadas, como fibroblastos, para a área afetada (SIADAT & RUBERTI, 2023). Estas enzimas conduzem processos fisiológicos (desenvolvimento e reparo tecidual) e patológicos (tumorigênese e metástase). Eles também contribuem para a liberação de fragmentos bioativos (também denominados matricriptinas), como endostatina e tumstatina, de colágenos completos (SCHIMIDT *et al.*, 2006). Esses fragmentos orientam especificamente a poda dos vasos sanguíneos que, por sua vez, permite o restabelecimento da arquitetura do tecido durante a cicatrização (WIETECH, CERNY & DIPIETRO, 2013; SINHA *et al.*, 2018). Consequentemente, a collagenase assume um papel crítico na remodelação do tecido danificado, o que facilita a regeneração e o reforço estrutural do novo tecido cicatricial. A interação entre colágeno e collagenase tem o potencial terapêutico para otimizar o processo de

cicatrização em diversas condições clínicas, desde feridas crônicas até procedimentos cirúrgicos complexos (MATHEW-STEINER, ROY & SEN, 2021).

Os microrganismos têm sido largamente empregados por apresentarem elevada velocidade de síntese, estabilidade e rendimento elevado de substrato em produto, além de pouco tempo de geração, diversidade e facilidade de manipulação genética e de condições ambientais, além disso as collagenases de origem animal clivam a hélice do colágeno em um único ponto enquanto collagenases microbianas atacam múltiplos sítios ao longo da hélice e por este motivo vem sendo largamente aplicadas em processos de cicatrização e na obtenção de peptídeos bioativos de colágeno (VILLEGAS *et al.*, 2018).

Por sua vez, os peptídeos de colágeno podem atuar aumentando a permeabilidade vascular e consequentemente induzindo a aceleração do processo de reparo tecidual (VILLEGAS *et al.*, 2018). Durante este período, de intensa atividade vascular, e variação na permeabilidade, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e células epiteliais começam a cobrir o local da lesão e assim, essas células restabelecem a continuidade do tecido através da deposição da matriz, angiogênese e epitelização.

Collagenases microbianas são relatadas a partir de bactérias, fungos e microalgas. Entre as bactérias, são relatadas: *Bacillus alvei* DC-1 (KAWAHARA, KSUMOTO & OBATA, 1993), A espécie gram positiva *Bacillus cereus* CNA1 e Gram negativa *Klebsiella pneumoniae* CNL3 (SUPHATHARAPRATEEP, CHEIRSILP & JONGJAREONRAK, 2011), e *Clostridium histolyticum*, a primeira collagenase microbiana a ser estudada em detalhes e está entre os produtos enzimáticos mais comercializados (DIAO, 2017). Estudos recentes destacam a utilização de collagenases produzidas por *Clostridium histolyticum* no tratamento da doença de Peyronie, reduzindo o tecido cicatricial fibroso

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

(ZIEGELMANN *et al.*, 2023), e de Fibromatose plantar (LEHRMAN *et al.*, 2019), demonstrando o potencial para o uso da collagenase para além dos tratamentos em feridas superficiais. O potencial de fungos na produção desta enzima é notado há vários anos, alguns exemplos são o *Aspergillus niger* (BARTHOMEUF, POURRAT, H. & POURRAT, A., 1992) e *Entomophthora coronata* (HURION, FROMENTIN & KEIL, 1979). Atualmente, as pesquisas envolvem principalmente espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Arthrotrichum*, *Monacrosporium*, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Lecanicillium*, *Entomophthora*, *Micromyces* e *Lagenidium* (WANDERLEY *et al.*, 2017). Em contrapartida, são escassos os estudos relatando collagenases produzidas por microalgas, como exemplo *Chlorella vulgaris* (WANDERLEY *et al.*, 2020).

2.4. Estratégias para tratamento feridas

A eficácia no tratamento de feridas é uma preocupação fundamental na área da saúde, pois lesões cutâneas podem variar em gravidade e complexidade. Diversas estratégias têm sido desenvolvidas para acelerar a cicatrização e promover a regeneração dos tecidos. Desde a utilização de curativos tradicionais até avançadas coberturas com propriedades antimicrobianas, a pesquisa contínua e a inovação têm levado a abordagens cada vez mais eficazes para melhorar os resultados de cicatrização de feridas (PENG-HUI *et al.*, 2018).

Existem várias opções de coberturas e substitutos de pele disponíveis comercialmente para otimizar o processo de cicatrização. As coberturas de Rayon são consideradas um curativo estéril de alta qualidade e possui esse nome por ser composto por malha de acetato e celulose, reduzindo sua capacidade de aderir à ferida e assim evitando danos durante a remoção. Além disso, são impregnadas com ácidos graxos essenciais (AGE), estimulando o processo de cicatrização, uma vez que servem como hidratantes e estimulam a atividade celular no

local, acelerando e promovendo o processo natural de cicatrização da pele. Entretanto, feridas muito profundas ou complexas podem exigir abordagens ou produtos especializados (NAEEM; ASSIM & TUFAIL, 2020).

Algumas outras coberturas possíveis incluem: Coberturas baseadas em alginato de cálcio, que entre suas vantagens oferece uma alta absorção de exsudato e facilidade de remoção, entretanto precisam ser trocadas com frequência e podem aderir a ferida caso não haja umidade suficiente no local (LI *et al.* 2011). Coberturas do tipo hidrocolóide, compostas por massa hidrofílica gelável aplicada na forma semissólida a um carreador flexível semipermeável, formando um ambiente úmido e protegido de contaminantes externos, mas também exigem trocas frequentes e podem gerar desconforto se usadas em feridas próximas à pelos ou cabelo (THOMAS, 2008).

O desenvolvimento de estratégias para cicatrização de feridas é uma problemática de grande interesse na área da medicina e farmácia. Ao longo do tempo, diferentes curativos formados a partir de polímeros naturais vêm sendo aplicados buscando reduzir o impacto de resíduos no meio ambiente, bem como a toxicidade do material ao paciente. Alguns exemplos são: Alginato, Quitosana, Seda, Ácido hialurônico e Colágeno apresentados como materiais viáveis para composição de curativos e engenharia de tecidos, garantindo permeabilidade adequada, proteção antimicrobiana e aceleração da cicatrização sem a presença de efeitos citotóxicos (COSTA *et al.*, 2023) Estudos têm demonstrado que esses polímeros, especialmente o colágeno, desempenham um papel importante nos processos de remodelação tecidual e reepitelização durante a cicatrização (COSTA *et al.*, 2023).. Essas evidências esclarecem o potencial desses hidrolisados como agentes importantes no tratamento de lesões, minimizando os riscos consequentes e melhorando a qualidade de vida dos pacientes

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

Matrizes poliméricas à base de colágeno são particularmente interessantes graças a sua biocompatibilidade, suporte estrutural e estímulo à cicatrização (TENOROVÁ *et al.*, 2019). Diante disto, é notável o empenho para o desenvolvimento de produtos e processos a fim de suprir a necessidade no tratamento de feridas que possam atuar de forma ampla, não gerem desconforto no paciente e possuem ação antimicrobiana, acelerando assim o processo de cicatrização. Nesse contexto, os microrganismos surgem como uma abordagem promissora, uma vez que são capazes de produzir enzima com atividade hidrolisante do colágeno, e consequentemente, peptídeos de colágeno. A prospecção no uso desses agentes cicatrizantes e em novas formulações de coberturas de feridas representa um campo de pesquisa em ascensão, com potencial para revolucionar as terapias e melhorar significativamente a qualidade de vida dos pacientes com feridas crônicas ou de difícil cicatrização.

As estruturas poliméricas para liberação medicamentosa são amplamente estudadas para melhorar a eficácia e segurança na entrega medicamentosa, especialmente na cicatrização de feridas. Essas estruturas podem ser projetadas para a liberação medicamentosa de forma controlada no local específico da ferida, redução da frequência de administração medicamentosa, minimização de cicatrizes, o que favorece a cicatrização (FAHIMIRAD & AJALLOUEIAN, 2019). Diversos polímeros estão disponíveis no mercado para a abordagem de feridas. Os quais podem ser utilizados na forma de filmes, espuma, hidrogéis, hidrocolóides, scaffolds, hidrofibras (FAHIMIRAD & AJALLOUEIAN, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Representação gráfica das estruturas poliméricas

Fonte: autores (2023).

3. CONCLUSÃO

Existem muitos desafios a serem superados no contexto da cicatrização de feridas, especialmente no que diz respeito ao controle de patógenos. Nesse contexto, a utilização de collagenase e peptídeos de colágeno, produzidos por microrganismos, emerge como uma abordagem promissora. A collagenase, por sua capacidade de desintegrar as fibras de colágeno, auxilia na preparação do leito da ferida para o crescimento de novo tecido, enquanto os peptídeos de colágeno podem acelerar a regeneração tecidual. Além disso, a aplicação de estruturas poliméricas para liberação medicamentosa mostra-se como uma estratégia eficaz para melhorar a eficiência e segurança na entrega de medicamentos durante o processo de cicatrização. O avanço nessas áreas poderá abrir caminho para terapias mais eficazes, abrangentes e confortáveis, proporcionando uma recuperação mais rápida e completa para indivíduos que enfrentam desafios no processo de cicatrização de feridas.

4. REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. A., & NOGUEIRA, J. M. R. Biofilme e células persisters: da persistência à resistência microbiana. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 2022.

ALAV, I., SUTTON, J. M., & RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73(8), 2003-2020. 2018.

AMINI-NIK, S. et al. β -Catenin-regulated myeloid cell adhesion and migration determine wound healing. **Journal of Clinical Investigation**, 122(2), 729-742. 2012.

ARIKAN, A. A., et al. Treatment of Candida sternal infection following cardiac surgery - a review of literature. (Review Article). 2018.

ARAGÃO-NETO, A. C. Avaliação da cicatrização de feridas cutâneas tratadas com hidrogel de poliacaju e quitosana associado a laser terapêutico. Dissertação (Mestrado em programa de pós graduação em bioquímica e fisiologia) - **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2013.

ATKINSON, S. J., & D'ORTHO, M. P. Remodeling and wound healing: matrix metalloproteinases in context. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, 7(1), 33-40. 2002.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., & CURI, R. Mechanisms involved in wound healing: a revision. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 41, 27-51. 2005.

BARRIENTOS, S., BREM, H., STOJADINOVIC, O., & TOMIC-CANIC, M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 22(5), 569-578. 2014.

BARTHOMEUF, C., POURRAT, H., POURRAT, A. Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 233-236, 1992.

BERTOGLIO F., et al., Increased Antibacterial and Antibiofilm Properties of Silver Nanoparticles Using Silver Fluoride as Precursor. **Molecules** ;25:3494. 2020.

BESERRA, F. P. et al., From inflammation to cutaneous repair: Topical application of lupeol improves skin wound healing in rats by modulating the cytokine levels, NF- κ B, Ki-67, growth factor expression, and distribution of collagen fibers. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4952. 2020.

BORGES EL, SPIRA JAO, AMORIM GL, COELHO ACSM. Biofilm formation in cutaneous wounds and its behavior in the face of interventions: an integrative review. **Rev Rene**. 23:e78112. 2022.

CAMPOS, A. C. L., BORGES-BRANCO, A., & GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. ABCD. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva* (São Paulo), 20, 51-58. 2007.

CAÑEDO-DORANTES, L., & CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. **International Journal of Inflammation**. 2019.

CHOPRA H, KUMAR S, SINGH I. Strategies and Therapies for Wound Healing: A Review. **Curr Drug Targets**. ;23(1):87-98. doi: 10.2174/1389450122666210415101218. PMID: 33858310. 2022.

COSTA, B. A. et al., Bioactive collagen peptides: bibliometric approach and market trends for aquatic sources. *Food Science Today*, v. 2, n. 1, 2023

DARBY, I. A., LAVERDET, B., BONTÉ, F., DESMOULIÈRE, A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, v. 7, p. 301-311, 2014.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

DIAO, L. et al. Effect of collagenase *Clostridium histolyticum* on penile vascular and morphological parameters in patients with Peyronie's disease. *TranslAndrolUrol*; 6(5): 894-898. 2017.

EMING, S. A., MARTIN, P., & TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, 6(265), 265sr6. 2017.

FAHIMIRAD, S., & AJALLOUEIAN, F., Naturally-derived electropun wound dressings for target delivery of bio-active agents. **Int. J. Pharm.** 566, 307-328. 2019.

FLETCHER J. The role of collagen in wound healing. **Prof Nurse**. May;15(8):527-30. PMID: 12026766. 2000.

GOSWAMI, A.G., BASU S, B. T., SHUKLA, V. K. Biofilm and wound healing: from bench to bedside. **Eur J Med Res**. Apr 25;28(1):157. 2023.

GUPTA, B. S.; GUPTA, EDWARDS, J. V. Textile materials and structures for topical management of wounds. In: RAJENDRAN, S. (Ed.). **Advanced Textiles for Wound Care**. 2nd ed. Cambridge: Elsevier, p. 55-104. 2018.

ISAAC, C. et al., Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Comunicação&Educação*, 89(3-4), 125-131. 2010.

VAN WART, H. E. *Clostridium Collagenases*. **Handbook of Proteolytic Enzymes**, Volume 1, p. 607-611. 2013.

HESKETH, M. et al. Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1545. 2017.

HURION, N., FROMENTIN, H., KEIL, B. Specificity of the collagenolytic enzyme from the fungus *Entomophthoracoronata*: Comparison with the bacterial collagenase from *Achromobacteriophage*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 192, n. 2, p. 438-445, 1979.

KAWAHARA, H., KUSUMOTO, M., OBATA, H. Isolation and characterization of a new type of collagenase producing bacterium, *Bacillus alvei* DC-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 8, p. 1372-1373, 1993.

LEHRMAN, J. D., et al. The Effects of Collagenase *Clostridium histolyticum* on plantar fibromatosis: A case study. **The Journal of Foot & Ankle Surgery**, v. 58, p. 1281-1284, 2019.

LI, X. L. et al. Preparation and physical properties of cavernous calcium alginate wound dressings. **Advanced Materials Research**, v. 332-334, p. 1670-1675, 2011.

LIMA, G. K. S. et al. Identificação de microrganismos para controle de infecção em feridas crônicas. **Research, Society and Development**, 10(8), e56210817312. 2021.

LOTTERMANN, A. et al. Anticorpos contra proteínas de choque térmico, autoimunidade e aterosclerose. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 43(5). 2003.

MA, J.-G., & AN, J.-X. Deep sternal wound infection after cardiac surgery: a comparison of three different wound infection types and an analysis of antibiotic resistance. **J Thorac Dis**. Vol. 10, No. 1. 2018.

MATHEW-STEINER, S. S., ROY, S., & SEN, C. K. Collagen in wound healing. **Bioengineering**, 8(5), 63. 2021.

MEDEIROS, A. C., & DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, 7(2), 87-102. 2016.

MEO, D., Candida fracture-related infection: a systematic review. **JBJS**, 6(7), 321-328. 2021.

MIRZA, R., & KOH, T. Contributions of cell subsets to cytokine production during impaired wound healing. **CYTOKINE**, v. 56, n. 2, p. 564-569, 2011.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

MOREIRA, B. R. et al. A bioactive film based on cashew gum polysaccharide for wound dressing applications. *Carbohydrate polymers*, 122, 69-76. 2015.

NAEEM, F., ASIM, F., TUFAIL, M. Performance evaluation of anti pilling and easy-care finished rayon and rayon/cotton satin fabric. *Journal of Natural Fibers*, p. 1033-1047, 2020.

OLI, A. N. et al. Multi-antibiotic resistant extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria pose a challenge to the effective treatment of wound and skin infections. **The Pan African Medical Journal**. 2017.

OLIVEIRA, T. F. et al. Microrganismos e resistência antimicrobiana em feridas complexas. *Research, Society and Development*, 10(2), e10110212161. 2021.

PENG-HUI WANG, et al., Wound healing. **J Chin Med Assoc**. 2018. PMID: 29169897 DOI: 10.1016/j.jcma.2017.11.002

PERCIVAL, S. L., MCCARTY, S. M., & LIPSKY, B. Biofilms and wounds: an overview of the evidence. **Advances in Wound Care**, vol. 4 (num.7), 373-381. 2015.

RIDIANDRIES, A., TAN, J. T., & BURSILL, C. A. The role of chemokines in wound healing. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3217. 2018.

RILEY, K. N. & HERMAN, I. M. Collagenase promotes the cellular responses to injury and wound healing *in vivo*. **J Burns Wounds**. 4: e8. 2005.

RODRIGUES, M. et al., Wound healing: a cellular perspective. **Physiological reviews**, 99(1), 665-706. 2019.

SEM, C. K, ROY, S., MATHEW-STEINER, S.S., GORDILLO, G. M. Biofilm management. **Wound Care. PlastReconstrSurg**. Aug 1;148(2):275e-288e. 2021.

SHARMA, S., RAI, V. K., NARANG, R. K., & MARKANDEYWAR, T. S. Collagen-based formulations for wound healing: A literature review. *Life Sciences*, 290, 120096. 2022.

SCHMIDT, A. et al. Endostatin influences endothelial morphology via the activated ERK1/2-kinase endothelial morphology and signal transduction. *Microvasc Res*, v. 71, n. 3, p. 152-162, 2006.

SIADAT, S. M., RUBERTI, J. W. Mechanochemistry of collagen. **Acta-Biomaterialia**, pp. 60-62. 2023.

SINHA, M. et al., Direct conversion of injury-site myeloid cells to fibroblast-like cells of granulation tissue. *Nat Commun*, v. 9, n. 1, p. 936, 2018.

SOLANKI, R., & NAGORI, B. P. A review on microorganisms causing wound infections on skin. **Asian Journal of Pharmacy and Technology**. 2013.

STADELMANN, W. K., DIGENIS, A. G., & TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American Journal Of Surgery**, v. 176, n. 2, p. 26S-38S, 1998.

STOFFEL, J.J., RIEDI, P.L.K., ROMDHANE, B.H. A multimodel regime for evaluating effectiveness of antimicrobial wound care products in microbial biofilms. **Wound Repair Regen**. 28(4):438-47. 2020.

SUPHATHARAPRATEEP, W., CHEIRSILP, B., JONGJAREONRAK, A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 649-655,.

TENOROVÁ, K. et al., Preparation and evaluation of bilayer films based on collagen and carboxymethylcellulose for wound therapy. **CeskaSlov Farm**, v. 68, n. 6, p. 229-236, 2019.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

THOMAS, S. Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. **International Wound Journal**, v. 5, n. 5, p. 602-613. 2008.

TSEUNG, K.S.Y., & ZHAO, J.J. Update on the fungal biofilm drug resistance and its alternative treatment. **Journal of Biosciences and Medicines**, 4, 37-47. 2016.

VILLEGAS, M.R., Baeza, Collagenase nanocapsules: an approach to fibrosis treatment. **ActaBiomater.** 74, 430-438. 2018.

WALLENGREN, J., SUNDLER, F., & WASSBERG, C. Pruritus and interleukins. **Clinical and Experimental Dermatology**, 36(4), 369-374. 2011.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13-24, 2017.

WANDERLEY, M. C. A. et al., First report on *Chlorella vulgaris* collagenase production and purification by aqueous two-phase system. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. 2020.

WIETECH, M. S., CERNY, W. L., DIPIETRO, L. A. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. **Curr Top MicrobiolImmunol**, v. 367, p. 3-32, 2013.

ZIEGELMANN, M. et al., Incremental Treatment Response by Cycle With Collagenase *Clostridium Histolyticum* for Peyronie's Disease: A Pooled Analysis of Two Phase 3 Trials. **Urology**, v. 175, p. 126-131, 2023.

CAPÍTULO II

Artigo publicado na revista Cosmetics

Fator de impacto: 3.4

**PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF A BIOACTIVE POLYSACCHARIDE
FILM FROM *Cassia grandis* WITH IMMOBILIZED COLLAGENASE FROM
Streptomyces Parvulus (DPUA/1573)**

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 Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus 64049-550, Brazil; thiagopajeu@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 (E.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, E.; 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

1. Introduction

Recent years have witnessed a change in cosmetic research, focusing on improving aesthetics and health benefits such as wound healing [1]. This change has sparked greater interest in investigating natural ingredients with therapeutic properties for skincare, as well as combining various compounds to promote tissue regeneration [2]. The healing process involves dynamic tissue formation to repair damage, with phases determining scar type. The inflammatory phase aims to remove devitalized tissues, the proliferative phase focuses on tissue formation through fibroblast proliferation and collagen production, and the maturation phase involves collagen type replacement, lasting from 6 months to 2 years. Complications can affect scar characteristics [3–7]. Recognizing the vital importance of biodiversity, the international community has established the Sustainable Development Goals (SDGs), including SDG 15, which aims to protect, restore, and promote the sustainable use of terrestrial ecosystems [8,9]. There is a growing demand for sustainable alternatives across various sectors, including the materials industry. Among these alternatives is the use of natural bioactive principles, involving the extraction and utilization of compounds from natural sources such as plants and microorganisms to develop products with diverse applications [10].

Over time, various dressings made from natural polymers have been employed to mitigate the environmental impact of waste and minimize toxicity to patients. These dressings demonstrate adequate permeability, offer antimicrobial protection, and promote accelerated healing without causing cytotoxic effects [8,9]. Additionally, certain polymers play a crucial role in tissue remodeling and re-epithelialization processes during the healing process [8]. In this context, polysaccharides from natural sources have garnered attention for their biocompatibility, biodegradability, and bioactive attributes. *Cassia grandis*, a tropical leguminous plant species, is recognized for harboring polysaccharides that exhibit medicinal promise [10,11]. Referred to as pink cassia, this plant is extensively utilized in traditional medicine and pharmaceutical pursuits [12]. The seeds of *Cassia grandis* contain a gummy endosperm rich in galactomannan, an ecologically sustainable, low-cost, and non-toxic material known for its safety. Galactomannan can be used in solution or gel forms, making it versatile for various applications and facilitating large-scale use. These seeds have the capability to form polysaccharide films, which can encapsulate and release bioactive compounds. Polymeric matrices are valued for their biocompatibility, structural support, and wound-healing properties [13,14].

Polysaccharide films are promising vehicles in delivering bioactive agents such as collagenases, enzymes capable of degrading collagen, which plays a crucial role in tissue remodeling and skin regeneration [15–18]. By incorporating collagenase into the polysaccharide film, it can be released in a controlled manner at the wound site, leading to the degradation of excess collagen and facilitating tissue regeneration, thus minimizing the risk of hypertrophic or keloid scars [19,20]. Therefore, there is an effort to create products and techniques that thoroughly cater to the requirements of wound care while ensuring patient comfort and possessing antimicrobial properties. By combining the benefits of polysaccharide films with the therapeutic properties of collagenases, it is possible to advance towards more effective and personalized therapies for wound treatment, thereby improving the quality of life of patients and promoting safe and efficient healing.

Therefore, this study aimed to incorporate collagenases into polysaccharide films derived from *Cassia grandis* seeds, evaluating their physicochemical and mechanical properties, like thickness, morphology, FTIR, TGA, color, and mechanical properties, and to submit the results through analysis.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Cassia grandis seeds were collected in Recife (PE, Brazil, 8°02′50.0″ S 34°57′00.1″ W) in April 2022. Ethanol (99.8%), acetone P.A. and sodium chloride were obtained from Vetec Fine Chemicals (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), while commercial collagenase (Collagenase

type I) was purchased from Pan Biotech (Worthington, OH, USA), and azocoll from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Obtaining Galactomannan

Galactomannan was obtained from *Cassia grandis* seeds, according to Albuquerque et al. [21]. The purification process involved experimenting with *Cassia grandis* pods in distilled water at 25 °C for 18 h. Subsequently, the pods were separated in half, exposing the seeds, which were then removed and dried until they reached a constant weight. The dried seeds were boiled in distilled water in a ratio of 1:5 (*w/v*) at 100 °C for 1 h for enzyme inactivation, and then kept in water for 18 h at 25 °C to facilitate the removal of the shell. Then, the peel was removed and the waste was ground in a blender with 5% (*w/v*) 0.1 M NaCl at 25 °C. The material was then filtered through a tissue and later through a screen printing cloth and precipitated with 46% ethanol in a ratio of 1:3 (*v/v*) for 18 h. The resulting white precipitate was washed with 100% ethanol in a ratio of 1:3 (*w/v*) for 30 min and then twice with acetone in a ratio of 1:3 (*w/v*) for 30 min each and filtered. There was on-screen printing between each wash. The precipitate was then dried until it reached a constant weight, ground and called galactomannan.

2.3. Film Preparation

The film solutions were prepared in distilled water with 0.8% (*w/v*) galactomannan and 0.2% (*v/v*) glycerol, and kept under magnetic stirring (500 rpm) for 18 h at room temperature (20 ± 2 °C). A total of 15 mL of film-forming solutions were deposited in polystyrene Petri dishes with a diameter of 90 mm. The films were then dried in an oven at 33 °C for 9 h and subsequently stored at 20 °C and 54% relative humidity (RH) until further characterization [14].

2.4. Collagenase Produced by *Streptomyces parvulus*

Collagenase was obtained from *Streptomyces parvulus*, isolated from lichens from the Amazon region and belonging to the DPUA 1573 culture collection (Department of Parasitology at the Federal University of Amazonas). The isolated microorganism was maintained in ISP-2 medium [22] with 10% glycerol at −20 °C.

For the production of collagenolytic protease, MS-2 medium [23], pH 7, was autoclaved at 121 °C/1 atm for 20 min. Erlenmeyer flasks (250 mL) containing 100 mL of culture medium were used, with the inoculum corresponding to 10^8 CFU/mL.

Collagenase activity was performed using the method described by Chavira [24]. The reaction mixture consisted of 50 µL of sample and 950 µL of buffer with 5 mg (mg/L) of Azocoll solution in a 1.0 mL reaction tube and incubated at 37 °C in a water bath for 60 min.

The absorbance of the supernatant was measured at 550 nm using a UV-VIS spectrophotometer (UV-1900i Shimadzu, Barueri, Brazil). One unit of enzymatic activity (U) was defined as the amount of enzyme per mL of sample that when taken after 60 min of incubation led to an increase in absorbance of 0.001 at 550 nm, due to the formation of soluble peptides linked by azo dye. Specific activity was calculated as the ratio between the enzymatic activity and the total protein content of the sample and expressed in U/mg.

2.5. Determination of Proteins

The protein content of the samples was determined using the methods of Smith [25], using BCA Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) with bovine serum albumin as a standard. A spectroscopic analysis was conducted using a microplate reader at a wavelength of 562 nm.

2.6. Collagenase Purification

The purification of the protease with collagenolytic activity was based on a two-step procedure. The crude extract was initially precipitated with a 70% concentration of acetone. A precipitated fraction was collected using centrifugation at 10,000 rpm, 4 °C for

20 min. The supernatant was discarded and the pellet was collected and resuspended in the minimum volume of 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.5.

To obtain the protease with collagenolytic activity, anion chromatography was used on QAE-sephadex G-50 resin to separate the protein fractions eluted using Tris-HCl buffer pH 7.5 added with 0.15 M NaCl in a 1.0×12 cm. The separation protein profile was evaluated at 215 nm and 280 nm.

2.7. Immobilization of Collagenase in Polysaccharide Film

Commercial collagenase (Collagenase type I—PAN Biotech®) and collagenase obtained from *Streptomyces parvulus* were added to the film-forming solutions (*w/v*) and left under magnetic stirring (500 rpm) for 5 h, at room temperature (20 ± 2 °C). A constant amount (15 mL) of each of the film-forming solutions obtained was molded into a 90 mm diameter polystyrene Petri dish. The films were conditioned in an oven at 33 °C for 9 h and maintained at 20 °C and 54% relative humidity (RH) until further characterization [17].

2.8. Characterization of the Polysaccharide Film and the Film Incorporated with Collagenases

The galactomannan film without the addition of collagenase was called polysaccharide film (PF) and was used as a reference in all analyses. Films with incorporated collagenase were named the following: polysaccharide film with commercial collagenase enzyme (PCF) and polysaccharide film with collagenase obtained from *Streptomyces parvulus* (SCF).

2.8.1. Film Thickness

The film thickness was determined using a digital micrometer (Mitutoyo, Kanagawa, Japan). Five different points were selected at random in each film and the measurement was carried out. The average values obtained from the measurements were used in calculations related to water vapor permeability (WVP) and mechanical properties.

2.8.2. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The examination of film surfaces was conducted via scanning electron microscopy (SEM) utilizing a transmission electron microscope (TEM, Hitachi, HT7700, Tokyo, Japan). Each film was affixed to a coverslip with a thin layer of chromium and carbon to prevent the buildup of static charge during electron exposure, thus ensuring accurate scanning without distortions or artifacts. For enhanced visualization, samples underwent sputtering with colloidal gold particles and subsequent drying prior to scanning.

2.8.3. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Film characterization employed Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) using a Bruker FT-IR VERTEX 80/80 v spectrometer (Boston, MA, USA) in Attenuated Total Reflectance (ATR) mode, employing a platinum crystal accessory. Analyses covered the frequency range of 400 to 4000 cm^{-1} , with 16 scans and a resolution of 4 cm^{-1} . Before measurement, a background spectrum was obtained from a clean surface. The PF served as the reference, with spectra obtained from films containing incorporated bioactive compounds (PCF and SCF) being subtracted from the PF spectrum. Additionally, a 30 min ultraviolet radiation exposure test was conducted to assess structural changes post-sterilization.

2.8.4. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) was performed using a Mettler Toledo TGA/DSC 1, model Star System. Samples underwent heating from 20 °C to 450 °C at a rate of 10 °C min^{-1} under a nitrogen atmosphere.

2.8.5. Color and Opacity

Color and opacity were evaluated utilizing a digital colorimeter (Konica Minolta, model Chroma Meter CR-400, Osaka, Japan) calibrated at illuminant C with a white standard. Parameters measured included L^* ($L^* = 0$ [black] and $L^* = 100$ [white]), a^*

($-a^*$ = greenness and $+a^*$ = redness), and b^* ($-b^*$ = blueness and $+b^*$ = yellowness), as recommended by the International Commission on Illumination. Opacity was determined as the ratio of sample opacity on the black standard (Y_b) to its opacity on the white standard (Y_w). Five random measurements each of Y_b and Y_w were averaged for calculation. The experiment was conducted in triplicate, and results were expressed as a percentage: $Y (\%) = (Y_b/Y_w) \times 100$.

2.8.6. Moisture Content

Moisture content (MC) represented the percentage of water removed from the initial sample mass. MC was determined gravimetrically through drying films at 105 °C in an oven with forced air circulation for 24 h. Experiments were performed in triplicate.

2.8.7. Water Vapor Permeability (WVP)

The assessment of water vapor permeability (WVP) was determined gravimetrically based on the ASTM E96-92 method [26,27]. For analysis, it was necessary to seal the film in the upper part of a permeation cell containing distilled water (100% RH; 2337 Pa vapor pressure 20 °C), which was then placed in a desiccator at 20 °C and 0% RH (0 Pa pressure water vapor) containing silica. The cells were weighed at intervals of 2 h for 10 h. Steady-state and uniform water pressure conditions were assumed through maintaining the air circulation constant outside the test cell by using a miniature fan inside the desiccator [28]. The slope of weight loss versus time was obtained using linear regression. Three replicates were obtained for each sample.

2.8.8. Contact Angle

The contact angle was measured on a facial contact angle meter (OCA 20, Data-physics, Filderstadt, Germany). Film samples were taken using a 500 µL syringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) with a 0.75 mm diameter needle. Pure water was used to measure the layer between the surface and the liquid. The contact angle on the film surfaces was measured using the sessile drop method [29]. Measurements were taken for 15 s.

2.8.9. Mechanical Properties

The mechanical properties were verified using a TA-HD plus texture analyzer (Serial RS232, Stable Micro Systems, Surrey, UK) according to ASTM D 882-02 (2010) guidelines. According to the ASTM standard, film strips with a length of 100 mm and a width of 20 mm were used and the average film thickness was measured beforehand. The initial gripper separation was set at 100 mm and the crosshead speed was set at 5 mm min⁻¹.

2.8.10. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using standard deviation of triplicate assays. Data were analyzed using one-way analysis of variants (ANOVA or Kruskal–Wallis test) using the free software RStudio (version 2023.12.1+402). Significant differences were verified using Tukey's test or Dunn's test based on post hoc multiple comparisons, with a significance level defined at a p value < 0.05.

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Figure 1 compares the surface morphology of the galactomannan-based film without the incorporation of the bioactive compound (a1–a3), with the galactomannan-based film with commercial collagenase enzyme at 0.1% incorporated (b1–b3) and the galactomannan-based film with collagenolytic enzyme for *Streptomyces parvulus* (c1–c3). The images obtained were magnified at 100×, 250× and 1000×.

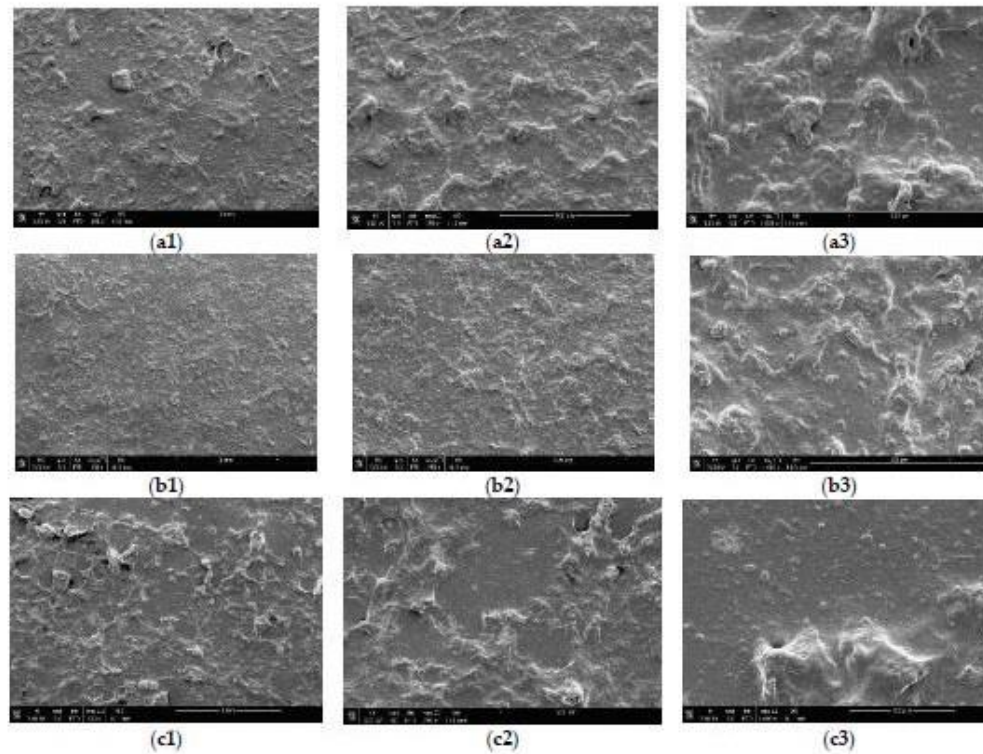


Figure 1. SEM images showing the surface structure of galactomannan film with and without bioactive compound incorporations. (a1–a3) 100× magnitude; (b1–b3) 250× magnitude; (c1–c3) 1000× magnitude.

3.2. Thickness and Moisture Content

The film thickness was not affected by the incorporation of enzymes, as shown in Table 1. Regarding MC, the samples were similar. There was no significant difference (p value = 0.0729) between the moisture content of the galactomannan-based film with 0.1% commercial collagenase enzyme incorporated and the galactomannan-based film with collagenolytic enzyme for *Streptomyces parvulus*. But both films with collagenase had a higher moisture content than the polymer film without the incorporation of bioactive compounds.

Table 1. Thickness and moisture content for the polysaccharide films before and after immobilization (values expressed as average $\pm$ standard deviation).

Films	Thickness (nm)	Moisture Content (%)
PF	0.0718 ± 0.0325^a	$54 \pm 5 \times 10^{-5}^a$
PCF	0.0528 ± 0.0104^a	$23.56 \pm 0.0009^{b,c}$
SCF	0.0698 ± 0.0123^a	13.15 ± 0.0009^c

^{a–c} Mean values in the same column indicated with different letters are significantly different (p value < 0.05). Those that have the same letter in the same column are not significantly different (p value > 0.05).

3.3. Water Vapor Permeability (WVP)

The analysis of water vapor permeability in polysaccharide films involves studying the interaction of water vapor with these films to understand their properties. In Figure 2, the water vapor permeability in PF, PCF, and SCF is observed.

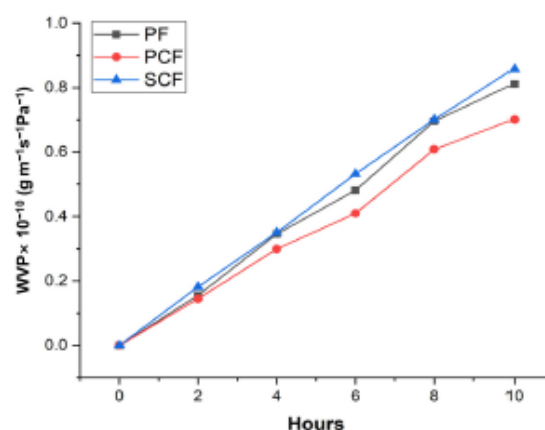


Figure 2. Variation in effective coefficients for WVP in polysaccharide films related to relative humidity at 20 °C.

3.4. Contact Angle before and after Ultraviolet Radiation

The contact angle pre- and post-ultraviolet irradiation can be observed in Table 2. It is derived from the film's surface and serves as a straightforward and efficient method for assessing the films' hydrophobicity level.

Table 2. Contact angle for the polysaccharide films before and after immobilization with enzymes (values expressed as average $\pm$ standard deviation).

Films	Water Contact Angle (°)	
	Without Exposure to UV	After Exposure to UV
PF	77.9 $\pm$ 1.56 ^a	91.1 $\pm$ 1.25 ^a
PCF	58.0 $\pm$ 2.55 ^b	64.8 $\pm$ 2.49 ^b
SCF	92.77 $\pm$ 1.83 ^c	136.1 $\pm$ 2.43 ^c

^{a-c} Mean values in the same column indicated with different letters are significantly different (p value < 0.05). Those that have the same letter in the same column are not significantly different (p value > 0.05).

3.5. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) is a technique used to obtain information about chemical composition and molecular structure, based on the interaction between molecules with infrared radiation. FTIR was used to investigate possible chemical interactions between the galactomannan-based film and collagenases, in both the commercial (PCF) and the collagenase produced using *Streptomyces parvulus* (SCF).

Figure 3 shows the spectra of the polysaccharide films after the incorporation of commercial collagenase and collagenase produced using *Streptomyces parvulus*. A wide range of band stretching was observed in the FTIR spectra of the galactomannan film, ranging from 3324 cm^{-1} to 687 cm^{-1} . Stretching in the region of 3030–3600 cm^{-1} is attributed to OH^{-1} groups, indicating the presence of carbohydrates and a small amount of moisture. Furthermore, bands at 2904 cm^{-1} and 1024 cm^{-1} suggest C-H stretching and a C-O bond from the alcohol group, respectively. The stretching observed at 2904 cm^{-1} and in the range of 1000–1200 cm^{-1} suggests characteristic features of carbohydrate polymers. Additionally,

the presence of amides at 1634 cm^{-1} confirms the existence of proteins in the galactomannan sample. In the IR spectra of galactomannan, bands were observed at 808 cm^{-1} and 874 cm^{-1} , which are associated with the occurrence of anomeric configurations (CH oscillations of α and β conformers) and glycosidic linkages. These bands are attributed to α -D-galactopyranose units and β -D-mannopyranose units, respectively.

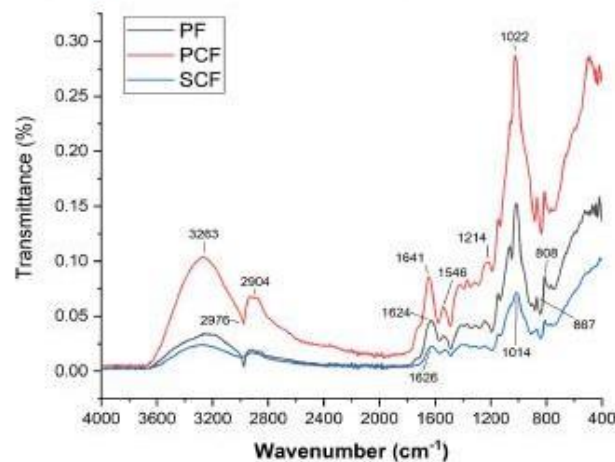


Figure 3. FTIR Spectra of the polysaccharide films after the incorporation of commercial collagenase enzymes and collagenase produced using *Streptomyces purvulus*.

The absence of the band above 3000 cm^{-1} suggests an interaction of the OH groups with the glycine of collagen. Other signals indicative of the incorporation of collagenase into the polysaccharide film are observed. Notably, bands at 1626 cm^{-1} , characteristic of C=O stretching typical of amide I, and at 1546 cm^{-1} and 1294 cm^{-1} , typical of N-H bending and C-N stretching of amide II, respectively, are identified. Additionally, signals at 1459 cm^{-1} , characteristic of pyrrolidine rings, amide III, which were not present in the galactomannan film previously, are observed.

Figure 4 shows the spectra of the polysaccharide films after exposure to ultraviolet radiation, so that it would be possible to observe whether there are differences in the composition and structure of the film if subjected to radiation.

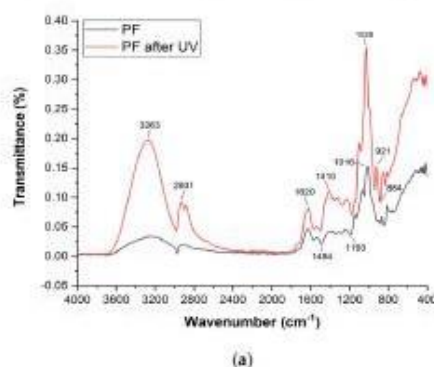


Figure 4. Cont.

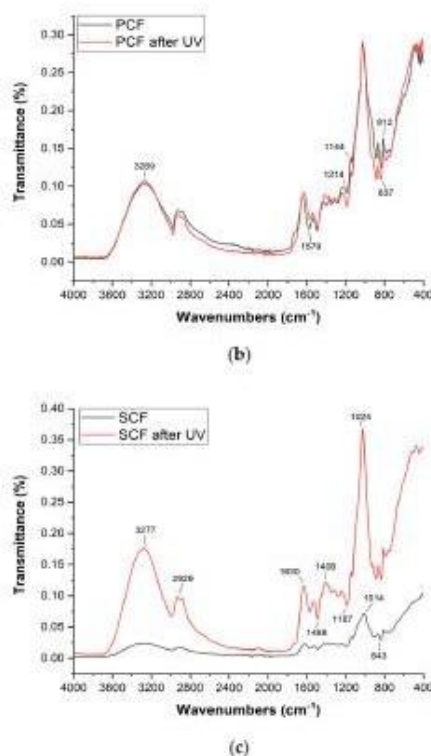


Figure 4. FTIR Spectra (before and after UV exposure) of the polysaccharide films (a) polysaccharide film with commercial collagenase enzyme (b) and polysaccharide film with collagenase produced using *Streptomyces parvulus* (c).

3.6. Thermogravimetric Analysis (TGA)

Thermogravimetric analysis (TGA) is a technique used to measure weight changes in a sample material due to time or temperature. TGA can be used to analyze the thermal stability of films and determine the presence of moisture and composition-related details. The thermal degradation results for the films are shown in Figure 5.

In the PF (Figure 5a), this event corresponds to a mass loss of 13%. A second event is observed with the onset around 188 °C (band at 292 °C), with a mass loss of about 60%. This event is related to the film's decomposition process. The width of the peak in the TGA curve suggests that the decomposition process is complex. The glycerol used in the film should initiate its decomposition before the polysaccharide chain (shoulders at a temperature close to 240 °C), while the peak at 292 °C is related to the polysaccharide decomposition. In the film incorporated with commercial enzymes (PCE; Figure 5b), this initial event corresponds to a mass loss of 8%. A second event is observed starting at 185 °C (peak at 294 °C) and is related to the decomposition process of the polysaccharide chain of the film. Once again, the width of the peak suggests the occurrence of simultaneous events, with the decomposition of glycerol occurring at a lower temperature than the polysaccharide chain. The mass loss throughout the entire event is 58.5%.

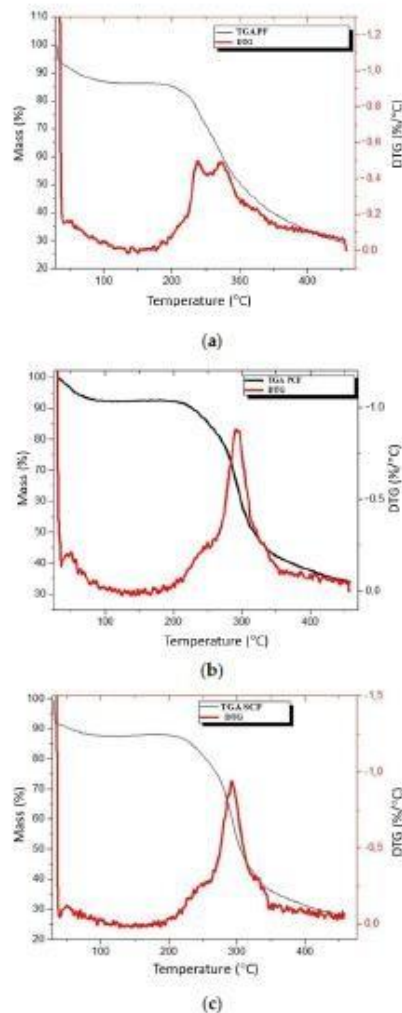


Figure 5. Thermogravimetric analysis of the polysaccharide films (a), polysaccharide film with commercial collagenase enzyme (b) and polysaccharide film with collagenase produced using *Streptomyces parvulus* (c).

As for the film with enzymes obtained from *Streptomyces parvulus* (SCF, Figure 5c), the mass loss corresponding to the first event is about 14%, a value consistent with the previous samples. The second event, starting at 173 °C, is related to the onset of the thermal decomposition process of the film. The total mass loss throughout the second event is 55.8%. The TGA curve shows two distinct peaks, the first with a maximum of 237 °C and the second with a maximum of 273 °C. The first peak should be related to the decomposition process of glycerol, while the second peak is related to the decomposition process of the polysaccharide chain of the film.

3.7. Color and Opacity

In pharmaceutical products, color and transparency play pivotal roles in consumer acceptance. Table 3 illustrates the color characteristics and transparency of the films. Notably, all examined films displayed distinct luminosity, primarily reflected in their L* coordinate values, alongside a discernible hint of yellowness denoted by the b* coordinate. Furthermore, all films exhibited slight opacity with no significant discrepancies observed among them (Figure 6).

Table 3. Color parameters L* (luminosity), a* (−a* = greenness and +a* = redness), b* (−b* = blueness and +b* = yellowness) and Y (opacity) for the polysaccharide films before and after immobilization (values expressed as average ± standard deviation).

Films	L*	a*	b*	Y (%)
PF	96.20 ± 0.1426 ^a	0.68 ± 0.0262 ^a	6.63 ± 0.2412 ^a	13.41 ± 0.1988 ^a
PCF	94.11 ± 0.2217 ^{a,b}	0.85 ± 0.0355 ^b	9.94 ± 0.2687 ^a	13.53 ± 0.2992 ^a
SCF	93.71 ± 0.2490 ^b	1.08 ± 0.0852 ^c	6.54 ± 0.2638 ^a	13.63 ± 0.2343 ^a

^{a–c} Mean values in the same column indicated with different letters are significantly different (*p* value < 0.05). Those that have the same letter in the same column are not significantly different (*p* value > 0.05).

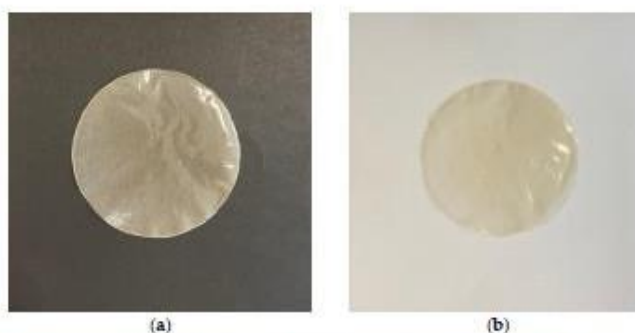


Figure 6. Representative image of the galactomannan film with immobilized collagenase obtained *Streptomyces parvulus* on black (a) and white (b) background.

3.8. Mechanical Properties

Table 4 shows the mechanical properties (Young's modulus—YM, tensile strength—TS and elongation at break—EB) of the galactomannan films without and with immobilized bioactive compounds (Table 4).

Table 4. Effect of concentration on Young's modulus (YM), tensile strength (TS) and elongation at break (EB) of the films (w/v) films before and after immobilization of collagenases in the film-forming mixture.

Films	YM (Mpa)	TS (Mpa)	EB (%)
PF	3.76 ± 0.145 ^a	2.29 ± 0.505 ^a	0.855 ± 0.095 ^a
PCF	4.7 ± 0.12 ^{b,c}	7.65 ± 0.450 ^{b,c}	1.015 ± 0.195 ^a
SCF	5.335 ± 0.145 ^c	9.05 ± 0.850 ^c	1.010 ± 0.200 ^a

^{a–c} Mean values in the same column indicated with different letters are significantly different (*p* value < 0.05). Those that have the same letter in the same column are not significantly different (*p* value > 0.05).

4. Discussion

4.1. Scanning Electron Microscopy (SEM)

The scanning electron microscopy (SEM) results provide valuable insights into the surface morphology of galactomannan-based films under different conditions. It is possible

to observe in the images generated using SEM some residual granules from the extraction of galactomannan. According to Arruda et al. [30] NaCl is used to enhance the solubility of free proteins and ethanol and acetone are used to wash out contaminants and proteins. Despite these steps in the present study, the film still had visible deformities. Deformities in polymeric films after the incorporation of biomolecules can vary based on the specific techniques and materials used. Research has shown that polymer films can exhibit significant changes in physical and mechanical properties when doped with biological molecules [31]. For example, the adsorption of proteins such as fibronectin can be influenced by the type of dopant used, affecting the binding to proteins on the film surface [32]. Furthermore, studies have demonstrated that polymer films can be deformed through the adsorption/desorption of molecules, leading to rapid and substantial changes in elasticity [33].

It is noted that the film containing commercial collagenase presented a smaller number of granules when compared to the film containing collagenase produced using *Streptomyces parvulus*. Enzymes designed for commercial use are often optimized for specific applications and may exhibit a high degree of substrate specificity. This could influence the enzymatic activity on the galactomannan matrix, affecting the formation and distribution of granules [34]; in parallel, the collagenases from *Streptomyces parvulus* interact with a wider range of components in the galactomannan matrix, leading to a more diverse and perhaps uneven distribution of granules [8].

As stated by Cerqueira et al. [35], when carrying out a study with and without the incorporation of extracts into galactomannan films, it was evident in the films with extract incorporation that there are some granular, spherical vesicles apparently free of visible fissures and pores. It is possible to observe in the results that the films with the incorporation of the enzymes present an inhomogeneous distribution in the film matrix. In the study by Albuquerque et al. [17], the presence of granules was observed depending on the type of biomolecule that was incorporated. Therefore, the distribution and characteristics of granules in films appear to be influenced by the nature of the incorporated enzymes and biomolecules.

4.2. Thickness and Moisture Content

The thickness of polysaccharide films with incorporated compounds can be influenced by several factors. Beloglazova et al. [36] observed that the concentration of polysaccharides influenced the appearance and thickness of the films. Cado et al. [37] reported that the simultaneous spraying of chitosan, hyaluronic acid and alginate resulted in a linear increase in thickness with spraying time.

Ramudu et al. [38] states in their study that the grain size increases the film thickness, which differs from the present study. The thickness of galactomannan films with enzymes varies depending on the specific enzyme and the conditions of the immobilization process; however, there was no significant difference between the incorporated and free films.

The moisture content in a film can affect the physical and chemical properties, being a key parameter when choosing a film for specific applications [39,40]. Enzymes can interact with the chemical structure of the film once incorporated, which can lead to changes in its hydrophilic/hydrophobic balance [41]. In the present study, a decrease in MC values was observed in the films with collagenolytic enzymes, especially those obtained from *Streptomyces parvulus*. Antoniou et al. [42] claimed that films with compounds such as enzymes have a more compact structure, which allows them to occupy more volume in the polymer matrix, reducing MC values. Slade et al. [43] highlights that the incorporation of enzymes into films can lead to a decrease in moisture content. It has also been observed that the enzymatic degradation of cellulose films results in a thinner and more diluted interfacial film, leading to a decrease in interfacial mass over time [44]. Ahmadi et al. [45], Cerqueira et al. [46], Ghasemlou et al. [47], and Albuquerque et al. [17] report that the distribution and proportion of galactose units along the mannan chain may play a fundamental role in the water content of galactomannans.

4.3. Water Vapor Permeability (WVP)

The water vapor permeability of polysaccharide films can be influenced by the irregular surface of the film, as visualized in the SEM (Figure 1), which could act as a site for water binding during moisture absorption, thus allowing water vapor to pass through the film [48,49]. Salgado et al. [50], in their study, observed that the addition of micro/nano clays or Cloisite 30B to polysaccharide-based films can affect their mechanical and barrier properties, influencing both WVP and tensile strength. Cerqueira et al. [51] reported that the hydrophobicity induced through incorporating corn oil into films can alter the film matrix's affinity with water, subsequently affecting WVP and mechanical properties.

These findings collectively suggest that the surface characteristics of polysaccharide films play a crucial role in determining their WVP and overall barrier performance, highlighting the importance of surface modifications to control moisture absorption and vapor transmission through the film. Regarding the differences between PF and PCF films, it was observed that there were few, suggesting that the permeability of the film is not significantly affected by commercial collagenase. It is believed that the SCF film presents a greater difference due to its purification condition; as can be seen in Figure 1, there is still the presence of several granules indicating that the PCF presents greater purity.

The values reported in our study demonstrated that the SCF, in addition to interacting with the galactomannan film, affected the WVP. Water vapor permeability in a film containing *Cassia grandis* polysaccharide with immobilized enzymes can be influenced by various factors. Polysaccharide films from the *Cassia fistula* seed present that increasing glycerol concentration in the film increased water vapor permeability [43]. Moreover, enzymes are immobilized in carriers with water-soluble polymeric substances, forming thin films on the carrier's surface, which involves removing water from the polymer during immobilization. [51]. In addition, porous polysaccharide-based biopolymers can be designed to have high porosity, allowing water vapor to pass through their pores or matrix and increasing the bioavailability of the bioactive compound [52]; the incorporation of biomolecules into these films can further increase their porosity and consequently their WVP. These findings suggest that the water vapor permeability of a film with *Cassia grandis* polysaccharide and immobilized enzyme are modulated via the film's composition and structure, impacting its suitability for different applications.

4.4. Contact Angle before and after Ultraviolet Radiation

As the angular values increase, they indicate the presence of a higher hydrophobic surface [48,49]. Surfaces with contact angles below 90° are considered hydrophilic. From the static sessile drop method with ultrapure water, the observed contact angles appear to be more hydrophilic in PF and PCF, while SCF is more hydrophobic than the others ($p > 0.05$) with a contact angle $> 90^\circ$. *Streptomyces parvulus* collagenase may have higher hydrophobicity than commercial collagenases due to differences in composition and purification. Despite these variations, it still shows sufficient activity and does not affect the usability of the polysaccharide film. Hence, it is a reliable option for making films with healing properties, providing a promising alternative in producing biodegradable and bioactive materials for different uses.

The contact angle of polysaccharide films containing enzymes can be significantly influenced by various factors, such as ultraviolet (UV) radiation. UV irradiation can alter the contact angle and surface properties of biopolymeric films, leading to changes in surface roughness and polarity [53]. Furthermore, Zimoch-Korzycka et al. [54] reported that the presence of enzymes such as cellulase in polysaccharide films can impact their physicochemical stability over time, affecting parameters such as water vapor permeability and tensile strength. Xu et al. [53] found that UV irradiation exposure decreases water contact angles in certain polymer films, attributed to the formation and release of surfactants from irradiated surfaces.

The polarity characteristics of the polymeric surface can modulate the interaction with proteins and the cell surface at the time of its application [55]. Therefore, the contact angle

of polysaccharide films with enzymes can vary before and after UV radiation, influenced by the specific enzymes present and the effects of UV radiation on the film surfaces [56].

4.5. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The free galactomannan film presented a similar spectrum as obtained by Albuquerque et al. [21], corroborating that the film originates from polysaccharide from *Cassia grandis* seeds.

Exposure to UV rays leads to various effects like breaking bonds [57], oxidizing groups, and altering polysaccharide and enzyme structures [58]. Research has shown that the exposure to UV radiation has the potential to induce alterations in the FTIR of collagen-derived films through a decrease in the concentration of amino acids within the collagen structure, thereby influencing the overall composition of the film [59]. Despite showing differences in intensity, Figure 4 shows few differences perceived in the bands presented, indicating a reasonable resistance of the film to degradation caused by UV radiation.

4.6. Thermogravimetric Analysis (TGA)

All films demonstrated mass loss due to thermal degradation. Mass loss occurs due to the loss of moisture, the evaporation of water and glycerol, and finally, the decomposition of the polysaccharide, similar to the results obtained by Albuquerque et al. [17]. The experiments carried out in this study are in accordance with those reported in the literature [30,45], indicating specific interactions between film components and enzymes [60], especially between the enzyme obtained from *Streptomyces parvulus* (SCF) which demonstrated slightly better performance compared to the commercial enzyme (PCF) and pure polysaccharide film (PF) in terms of thermal behavior. Panda, Park and Seo [61] highlight the ability to incorporate materials of organic origin to provide greater thermal stability, which corroborates the current study.

4.7. Color and Opacity

The color and opacity of polysaccharide films can be crucial for various applications, especially when incorporating enzymes. Cerclier et al. [62] introduced a method using cellulose nanocrystals and xyloglucan to detect enzymatic activity through color changes in thin films. Kim et al. [63] focused on increasing the opacity of laccase-based time-temperature integrators by incorporating TiO₂ and xanthan gum, while maintaining the color change kinetics.

By strategically combining different components, polysaccharide films can achieve improvements in opacity and color stability for various applications. According to Díaz-Montes [64], the utilization of natural polysaccharides, plasticizers, metallic ions and bioactive compounds may result in enhanced mechanical, barrier, and optical characteristics. Moreover, concerning Figure 6, it is emphasized that at a macroscopic level, the SPC film exhibits robust structural integrity, thus indicating its suitability for industrial utilization and commercial viability.

4.8. Mechanical Properties

YM is a measure of sample stiffness and a decrease in this value indicates a reduction in film rigidity, leading to increased film deformability [65]. PF was significantly different from PCF ($p = 0.034$) and SCF ($p = 0.008$), but there was no significant difference between PCF and SCF; in other words, the immobilization of bioactive compounds improves the film's resistance. TS refers to the maximum tensile stress that the film can withstand. This parameter is closely linked to the chemical structure of the film and is strongly influenced by its composition, including water, plasticizers, surfactants, and bioactive compounds immobilized in the film matrix [66]. PF was significantly different from PCF ($p = 0.018$) and SCF ($p = 0.009$), but there was no significant difference between PCF and SCF regarding TS. EB, which refers to the film's flexibility, did not show any significant difference between any of the films ($p > 0.05$).

The mechanical properties of polysaccharide films can be significantly influenced by various factors, such as manufacturing techniques, composition, and additives [67]. Zhang et al. [68] observed that the incorporation of phenolic acids into soluble soy polysaccharide films increased antioxidant and antibacterial properties while also affecting mechanical strength and water vapor barrier properties. Fu et al. [69], in their study with films made from corn starch and *Tremella fuciformis* polysaccharide, demonstrated varied mechanical properties based on the proportion of components. Lazo et al. [70] observed that polysaccharide films derived from chañar fruit polysaccharides showed good mechanical properties, thermal stability, and biodegradability, making them suitable for various applications.

5. Conclusions

The outcomes elucidated in this investigation support the conclusion that the use of polysaccharide films derived from the *Cassia grandis* plant, whether in their pure form or combined with bioactive enzymes, represents a promising approach for application in wound management and tissue rejuvenation, with potential implications reaching into the realms of healthcare and the cosmetic industry. The analysis using scanning electron microscopy unveiled variations in the surface morphology of the films, thus verifying the presence of specific interactions between polysaccharides and enzymes, potentially impacting the distribution and development of granules. Furthermore, the films exhibited uniform thickness and moisture content attributes, with the permeability to water vapor being dependent on both the film composition and the characteristics of the enzymes incorporated within. Films containing enzymes derived from *Streptomyces parvulus* (SCF) and films with commercial enzymes showed no significant difference, but it is highlighted that the collagenase obtained from SP is easier to obtain using fermentation methods, underscoring the significance of the enzyme origin in the formulation of these films. The findings also revealed variations in contact angles, indicating differing hydrophobicity levels among the films with potential implications for surface properties and interactions. Moreover, the Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis provided insights into chemical interactions between the films and enzymes, with UV radiation demonstrating minimal effects on the film composition. Additionally, thermogravimetric analysis (TGA) highlighted differences in thermal behavior, suggesting variations in the degradation process influenced by enzyme incorporation. The authors highlight the significance of this research as a crucial milestone in the analysis of the film, with promising implications for future experiments in different scenarios.

Author Contributions: K.F.—Conceptualization, methodology, investigation, data curation, writing—original draft preparation, writing, review and editing; K.C.—conceptualization, data curation, writing, review and editing; R.B.-C.—writing, review and editing, supervision, project administration and funding acquisition; J.T.M.—methodology, investigation and supervision; C.B.—methodology, investigation and supervision; A.N.—writing, review, validation and formal analysis; T.N.—writing, review and editing; J.B.—writing, review and editing; É.F.—formal analysis, writing and editing; F.D.—formal analysis, writing and editing; A.S.-C.—review and editing; W.A.—formal analysis, Review and editing; A.P.—supervision, project administration and funding acquisition; J.T.—supervision, project administration and funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Foundation for Science and Technology Development of the State of Pernambuco (FACEPE) (IBPG-1491-2.08/19), by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (200501/2022-4), by Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT) under the scope of the strategic funding of UIDB/04469/2020 unit, by LABBELS—Associate Laboratory in Biotechnology, Bioengineering and Microelectromechanical Systems (LA/P/0029/2020), by program Marie Skłodowska-Curie grant (MSCA-RISE; FODIAC; 778388), and by the European Regional Development Fund (ERDF) through the Competitiveness factors Operational program—Norte 2020, COMPETE.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Fadilah, N.I.M.; Phang, S.J.; Kamaruzaman, N.; Salleh, A.; Zawani, M.; Sanyal, A.; Maarof, M.; Fauzi, M.B. Antioxidant biomaterials in cutaneous wound healing and tissue regeneration: A critical review. *Antioxidants* **2023**, *12*, 787. [\[CrossRef\]](#)
2. Xiao, H.; Chen, X.; Liu, X.; Wen, G.; Yu, Y. Recent advances in decellularized biomaterials for wound healing. *Mater. Today Bio* **2023**, *19*, 100589. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Prabhu, S.R. Healing: Tissue Regeneration and Repair. In *Textbook of General Pathology for Dental Students*; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2023; pp. 49–56. [\[CrossRef\]](#)
4. Gomes, B.S.; Do Bomfim, E.R.C.; de Jesus Lopes Filho, G. Photobiomodulation in the skin healing process-literature review. *Photobiomodulation in wound healing process-literature review. Braz. J. Dev.* **2020**, *6*, 66814–66826. [\[CrossRef\]](#)
5. Balbino, C.A.; Pereira, L.M.; Curi, R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. *Rev. Bras. Ciências Farm.* **2005**, *41*, 27–51. [\[CrossRef\]](#)
6. Ferreira, C.M.; D'Assunção, E.A. Cicatrizes hipertróficas e queloides. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást* **2006**, *21*, 40–48.
7. Potter, D.A.; Veitch, D.; Johnston, G.A. Scarring and wound healing. *Br. J. Hosp. Med.* **2019**, *80*, C166–C171. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Arora, P. Life below land: The need for a new sustainable development goal. *Front. Environ. Sci.* **2023**, *11*, 1215282. [\[CrossRef\]](#)
9. Valladares, F. More biodiversity to improve our health: The benefits to human well-being of favouring functional and diverse ecosystems. *Metode Sci. Stud. J.* **2023**, *13*, 111–117. [\[CrossRef\]](#)
10. Ponphai boon, J.; Krongrawa, W.; Aung, W.W.; Chinatangkul, N.; Limmatvapirat, S.; Limmatvapirat, C. Advances in natural product extraction techniques, electrospun fiber fabrication, and the integration of experimental design: A comprehensive review. *Molecules* **2023**, *28*, 5163. [\[CrossRef\]](#)
11. Costa, E.P.; Brandão-Costa, R.M.P.; Albuquerque, W.W.C.; Nascimento, T.P.; Sales Conniff, A.E.; Cardoso, K.B.B.; Neves, A.G.D.; Batista, J.M.S.; Porto, A.L.F. Extracellular collagenase isolated from *Streptomyces antibioticus* UFPEA 3421: Purification and biochemical characterization. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **2024**, *54*, 260–271. [\[CrossRef\]](#)
12. Sheokand, B.; Vats, M.; Kumar, A.; Srivastava, C.M.; Bahadur, I.; Pathak, S.R. Natural polymers used in the dressing materials for wound healing: Past, present and future. *J. Polym. Sci.* **2023**, *61*, 1389–1414. [\[CrossRef\]](#)
13. Koshy, J.T.; Vasudevan, D.; Sangeetha, D.; Prabu, A.A. Biopolymer Based Multifunctional Films Loaded with Anthocyanin Rich Floral Extract and ZnO Nano Particles for Smart Packaging and Wound Healing Applications. *Polymers* **2023**, *15*, 2372. [\[CrossRef\]](#)
14. Fuentes, J.A.M.; Fernández, I.M.; Fernández, H.Z.; Sánchez, J.L.; Alemán, R.S.; Navarro-Alarcón, M.; Borrás-Linares, I.; Maldonado, S.A.S. Quantification of bioactive molecules, minerals and bromatological analysis in ficatão (*Cassia grandis*). *J. Agric. Sci.* **2020**, *12*, 88. [\[CrossRef\]](#)
15. Raikwar, S.; Bidla, P.D.; Jain, A.; Jain, S.K. Plant polysaccharides-based nanoparticles for drug delivery. In *Plant Polysaccharides as Pharmaceutical Excipients*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2022. [\[CrossRef\]](#)
16. Alhawarri, M.B.; Dianita, R.; Rawa, M.S.A.; Nogawa, T.; Wahab, H.A. Potential Anti-Cholinesterase Activity of Bioactive Compounds Extracted from *Cassia grandis* Lf and *Cassia timoriensis* DC. *Plants* **2023**, *12*, 344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Albuquerque, P.B.S.D. Avaliação Reológica da Galactomanana Extraída das Sementes de *Cassia grandis*. Master's Thesis, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, 2013.
18. Albuquerque, P.B.S.; Soares, P.A.G.; Aragão-Neto, A.C.; Albuquerque, G.S.; Silva, L.C.N.; Lima-Ribeiro, M.H.M.; Silva Neto, J.C.; Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S.; Teixeira, J.A.C.; et al. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 749–757. [\[CrossRef\]](#)
19. Oliveira, V.M.; Cunha, M.N.C.; Assis, C.R.D.; Nascimento, T.P.; Herculanio, P.N.; Holanda, M.T.; Porto, A.L.F. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. *Pubvet* **2017**, *11*, 243–255. [\[CrossRef\]](#)
20. Ferreira, I.A.A.; de Albuquerque Wanderley, M.C.; Porto, A.L.F. Primeiro relato de produção de colagenase por fungo isolado do solo da Caatinga-Rhizopus microsporus UCP 1296. *Res. Soc. Dev.* **2022**, *11*, e398111234618. [\[CrossRef\]](#)
21. Albuquerque, P.B.; Barros, W., Jr.; Santos, G.R.; Correia, M.T.; Mourão, P.A.; Teixeira, J.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Characterization and rheological study of the galactomannan extracted from seeds of *Cassia grandis*. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *104*, 127–134. [\[CrossRef\]](#)
22. Pridham, T.G.; Aderson, P.; Foley, C. Selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot. Ann.* **1957**, 947–953. [\[PubMed\]](#)
23. Porto, A.L.F.; Campos-Takaki, G.M.; Lima Filho, J.L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *60*, 115–122. [\[CrossRef\]](#)
24. Chavira, R., Jr.; Burnett, T.J.; Hageman, J.H. Assaying proteinases with azocoll. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 446–450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Smith, P.E.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J.; Klenk, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

26. Gontard, N.; Duchez, C.; Cuq, B.; Guilbert, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: Water vapour permeability and other physical properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1994**, *29*, 39–50. [\[CrossRef\]](#)
27. McHugh, T.H.; Avena-Bustillos, R.; Krochta, J.M. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J. Food Sci.* **1993**, *58*, 899–903. [\[CrossRef\]](#)
28. Guillard, V.; Broyart, B.; Bonazzi, C.; Guilbert, S.; Gontard, N. Preventing moisture transfer in a composite food using edible films: Experimental and mathematical study. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2267–2277. [\[CrossRef\]](#)
29. Kwok, D.Y.; Neumann, A.W. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1999**, *81*, 167–249. [\[CrossRef\]](#)
30. Arruda, I.R.; Albuquerique, P.B.; Santos, G.R.; Silva, A.G.; Mourão, P.A.; Correia, M.T.; Vicente, A.A.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Structure and rheological properties of a xyloglucan extracted from *Hymenaea courbaril* var. *courbaril* seeds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *73*, 31–38. [\[CrossRef\]](#)
31. Zhao, Y.; Ganapathysubramanian, B.; Shrotriya, P. Cantilever deflection associated with hybridization of monomolecular DNA film. *J. Appl. Phys.* **2012**, *111*, 074310. [\[CrossRef\]](#)
32. Ikawa, T.; Hoshino, F.; Matsuyama, T.; Takahashi, H.; Watanabe, O. Molecular-shape imprinting and immobilization of biomolecules on a polymer containing azo dye. *Langmuir* **2006**, *22*, 2747–2753. [\[CrossRef\]](#)
33. Okuzaki, H. A biomorphic origami actuator fabricated by folding a conducting paper. *J. Phys.* **2008**, *127*, 012001. [\[CrossRef\]](#)
34. Kunzendorf, A.; Bomscheuer, U.T. Optimierte Designer-Enzyme für die pharmazeutische Industrie. *BIOspektrum* **2022**, *28*, 760–762. [\[CrossRef\]](#)
35. Cerqueira, M.A.; Souza, B.W.; Martins, J.T.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. Seed extracts of *Gleditsia triacanthos*: Functional properties evaluation and incorporation into galactomannan films. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 2031–2038. [\[CrossRef\]](#)
36. Beloglazova, C.E.; Rysmukhambetova, G.E.; Karpunina, L.V.; Zabelina, M.V. Development of a technology for polysaccharide-based film coating. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2021**, *640*, 052022. [\[CrossRef\]](#)
37. Cado, G.; Kerdjoudj, H.; Chassepot, A.; Lefort, M.; Benmlih, K.; Hemmerle, J.; Voegel, J.-C.; Jierry, L.; Schaaf, P.; Frère, Y.; et al. Polysaccharide films built by simultaneous or alternate spray: A rapid way to engineer biomaterial surfaces. *Langmuir* **2012**, *28*, 8470–8478. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Ramudu, M.; Raja, M.M.; Basumatary, H.; Kamat, S.V. Role of film thickness on magnetic properties of sputter deposited Co₂FeGa alloy thin films. *Mater. Res. Express* **2019**, *6*, 086404. [\[CrossRef\]](#)
39. Lad, S.; Narkhede, S.; Luhar, S.; Prajapati, A. Review on Moisture Content: A stability problem in pharmaceuticals. *EPRA Int. J. Res. Dev. (IJRD)* **2022**, *7*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)
40. Vishnevskiy, A.S.; Seregin, D.S.; Vorotilov, K.A.; Sigov, A.S.; Mogilnikov, K.P.; Baklanov, M.R. Effect of water content on the structural properties of porous methyl-modified silicate films. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2019**, *92*, 273–281. [\[CrossRef\]](#)
41. Ohayon, D.; Renn, D.; Wustoni, S.; Guo, K.; Druet, V.; Hama, A.; Chen, X.; Maria, I.P.; Singh, S.; Griggs, S.; et al. Interactions of catalytic enzymes with n-type polymers for high-performance metabolite sensors. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2023**, *15*, 9726–9739. [\[CrossRef\]](#)
42. Antoniou, J.; Liu, F.; Majeed, H.; Zhong, F. Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocoll.* **2015**, *44*, 309–319. [\[CrossRef\]](#)
43. Slade, L.; Levine, H.; Wang, M.; Ievolella, J. DSC Analysis of Starch Thermal Properties Related to Functionality in Low-Moisture Baked Goods. In *New Techniques in the Analysis of Foods*; Tunick, M.H., Palumbo, S.A., Fratamico, P.M., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1998. [\[CrossRef\]](#)
44. Lee, D.M.; Sims, J.L. Water Soluble Compositions Incorporating Enzymes, and Method of Making Same. U.S. Patent US20130244920A1, 19 September 2013.
45. Ahmadi, R.; Kalbasi-Ashtari, A.; Oromiehie, A.; Yarmand, M.S.; Jahandideh, F. Development and characterization of a novel biodegradable edible film obtained from psyllium seed (*Plantago ovata* Forsk.). *J. Food Eng.* **2012**, *109*, 745–751. [\[CrossRef\]](#)
46. Cerqueira, M.A.; Souza, B.W.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films—A comparative study. *Food Hydrocoll.* **2012**, *27*, 175–184. [\[CrossRef\]](#)
47. Ghasemlou, M.; Khodaiyan, F.; Oromiehie, A. Physical, mechanical, barrier, and thermal properties of polyol-plasticized biodegradable edible film made from kefir. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84*, 477–483. [\[CrossRef\]](#)
48. Ubeyitogullari, A.; Ahmadzadeh, S.; Kandhola, G.; Kim, J. Polysaccharide-based porous biopolymers for enhanced bioaccessibility and bioavailability of bioactive food compounds: Challenges, advances, and opportunities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2022**, *21*, 4610–4639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Shogren, R. Water vapor permeability of biodegradable polymers. *J. Environ. Polym. Degr.* **1997**, *5*, 91–95. [\[CrossRef\]](#)
50. Salgado, D.; Serment-Moreno, V.; Ulloa, P.A.; Velazquez, G.; Antonio Torres, J.; Welti-Chanes, J. Steady and unsteady-state determination of the water vapor permeance (wvp) of polyethylene film to estimate the moisture gain of packed dry mango. *Food Bioprocess Technol.* **2017**, *10*, 1792–1797. [\[CrossRef\]](#)
51. Cerqueira, M.A.; Vicente, A.A. Reinforcement of Polysaccharide-based films: Evaluation of Physico-chemical Properties. In Proceedings of the International Conference Eco-Sustainable Food Packaging Based on Polymer Nanomaterials (Book of Abstracts), Rome, Italy, 26–28 February 2014; ISBN 978-889-808-545-3. Available online: <https://hdl.handle.net/1822/32868> (accessed on 15 March 2024).

52. Sharma, A.; Thatai, K.S.; Kuthiala, T.; Singh, G.; Arya, S.K. Employment of polysaccharides in enzyme immobilization. *React. Funct. Polym.* **2021**, *167*, 105005. [\[CrossRef\]](#)
53. Xu, Z.; Zhang, Y.; Wang, X.; Li, K.; He, Q. Influence of contact angle on droplet parameters in ellipsoidal wettability model. *Surf. Topogr. Metrol. Prop.* **2023**, *11*, 025022. [\[CrossRef\]](#)
54. Zimoch-Korzycka, A.; Ambrozik-Haba, J.; Kulig, D.; Jarmoluk, A. Modification effect of cellulase on the physicochemical characteristic of polysaccharides edible films. *Int. J. Polym. Sci.* **2015**, *2015*, 184616. [\[CrossRef\]](#)
55. Ma, Q.; Hu, D.; Wang, H.; Wang, L. Tara gum edible film incorporated with oleic acid. *Food Hydrocoll.* **2016**, *56*, 127–133. [\[CrossRef\]](#)
56. Sionkowska, A. UV light as a tool for surface modification of polymeric biomaterials. *Key Eng. Mater.* **2014**, *583*, 80–86. [\[CrossRef\]](#)
57. Johnson, P.S.; Cook, P.L.; Liu, X.; Yang, W.; Bai, Y.; Abbott, N.L.; Himpel, F.J. Universal mechanism for breaking amide bonds by ionizing radiation. *J. Chem. Phys.* **2011**, *135*, 044702. [\[CrossRef\]](#)
58. Mieczkowska, A.; Mabilieu, G. Validation of Fourier Transform Infrared Microspectroscopy for the Evaluation of Enzymatic Cross-Linking of Bone Collagen. *Calcif. Tissue Int.* **2023**, *113*, 344–353. [\[CrossRef\]](#)
59. Moreno, V.; Meroño, C.; Baeza, A.; Usategui, A.; Ortiz-Romero, P.L.; Pablos, J.L.; Vallet-Regí, M. UVA-Degradable Collagenase Nanocapsules as a Potential Treatment for Fibrotic Diseases. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 499. [\[CrossRef\]](#)
60. Singh, M.K.; Singh, A. Thermogravimetric analyzer. In *Characterization of Polymers and Fibres*; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2022; pp. 223–240. ISBN 9780128239865. [\[CrossRef\]](#)
61. Panda, P.K.; Park, K.; Seo, J. Development of poly (vinyl alcohol)/regenerated chitosan blend film with superior barrier, antioxidant, and antibacterial properties. *Prog. Org. Coat.* **2023**, *183*, 107749. [\[CrossRef\]](#)
62. Cerchier, C.; Guyomard-Lack, A.; Moreau, C.; Cousin, F.; Beury, N.; Bonnin, E.; Jean, B.; Cathala, B. Coloured semi-reflective thin films for biomass-hydrolyzing enzyme detection. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3791–3795. [\[CrossRef\]](#)
63. Kim, H.C.; Cha, H.J.; Shin, D.U.; Koo, Y.K.; Cho, H.W.; Lee, S.J. Visibility Enhancement of Laccase-Based Time Temperature Integrator Color by Increasing Opacity. *Korean J. Packag. Sci. Technol.* **2021**, *27*, 101–107. [\[CrossRef\]](#)
64. Díaz-Montes, E. Polysaccharides: Sources, Characteristics, Properties, and Their Application in Biodegradable Films. *Polysaccharides* **2022**, *3*, 480–501. [\[CrossRef\]](#)
65. Colombi, P.; Bergese, P.; Bontempi, E.; Borgese, L.; Federici, S.; Keller, S.S.; Boisen, A.; Depero, L.E. Sensitive determination of the Young's modulus of thin films by polymeric microcantilevers. *Mems. Sci. Technol.* **2013**, *24*, 125603. [\[CrossRef\]](#)
66. Gläsel, T.; Stache, P.; Zscheyge, M. TS-Moulding—Fertigungstechnologie zur großserientauglichen Herstellung endlosfaserverstärkter Thermoplastsandwichstrukturen/TS-Molding—Manufacturing technology for mass production of continuous fiber-reinforced thermoplastic sandwich structures. *Konstruktion* **2021**, *74*, 54–59. [\[CrossRef\]](#)
67. Sagawa, T.; Nikaido, Y.; Iijima, K.; Sakaguchi, M.; Yataka, Y.; Hashizume, M. Preparation of Mechanically Anisotropic Polysaccharide Composite Films Using Roll-Press Techniques. *ACS Omega* **2023**, *8*, 5607–5616. [\[CrossRef\]](#)
68. Zhang, M.; Huang, C.; Xie, J.; Shao, Z.; Li, X.; Bian, X.; Xue, B.; Gan, J.; Sun, T. Physical, Mechanical and Biological Properties of Phenolic Acid-Grafted Soluble Soybean Polysaccharide Films. *Foods* **2022**, *11*, 3747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Fu, Z.Q.; Guo, S.X.; Wang, X.Y.; Huang, Z.G.; Bi, C.H.; Li, F.F.; Wu, M. Structural, thermal, mechanical, and physicochemical properties of corn starch and tremella fuciformis polysaccharide based composite films. *Starch-Stärke* **2022**, *74*, 2100255. [\[CrossRef\]](#)
70. Lazo, L.; Melo, G.M.; Auad, M.L.; Filippa, M.; Masuelli, M.A. Synthesis and Characterization of Chanar Gum Films. *Colloids Interfaces* **2022**, *6*, 10. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os filmes de polissacarídeos de *Cassia grandis* com collagenase imobilizada de *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573) demonstraram propriedades físico-químicas promissoras para aplicações biomédicas.

A caracterização físico-química confirmou a incorporação bem-sucedida da collagenase e a presença de grupos funcionais essenciais, bem como demonstrou um aumento na rugosidade da superfície, sugerindo uma interação aprimorada com o tecido. Estas características são particularmente vantajosas para a aplicação em curativos, pois melhoram a adesão ao tecido e a eficácia do processo de cicatrização. A estabilidade térmica e mecânica dos filmes, reforça sua viabilidade em ambientes clínicos.

A capacidade de liberar collagenase de forma controlada pode acelerar a remoção de tecido necrosado e promover a regeneração da pele, reduzindo o tempo de cicatrização e as complicações associadas às queimaduras. Além disso, a biocompatibilidade e biodegradabilidade de filmes de polissacarídeos minimizam o risco de reações adversas, tornando-os uma opção segura e eficaz para o tratamento de feridas complexas.

Portanto, a continuidade de pesquisas nesta área, incluindo testes *in vivo* e otimização das formulações, é importante para validar a eficácia clínica e ampliar o uso desses biomateriais inovadores no tratamento de pacientes queimados. Com base nos resultados promissores deste estudo, os filmes polissacarídicos de *Cassia grandis* com collagenase imobilizada *Streptomyces parvulus* (DPUA/1573), têm o potencial de transformar as práticas atuais de tratamento de queimaduras, oferecendo uma solução eficiente para a regeneração tecidual e cicatrização de feridas.

APÊNDICE A



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

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/08/2023 às 15:11, Petição 870230074688

Depositante 2 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Professor Moraes Rego nº 1.235, Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: BRASIL

Telefone: (81) 212 68000

Fax:

Email:

Depositante 3 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 11022597000191

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. AGAMENON MAGALHÃES, S/N, SANTO AMARO

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 50100-010

País: BRASIL

Telefone: (81) 318 41248

Fax:

Email:

Depositante 4 de 4

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06517387000134

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: BR 135, Km 3, Planalto Horizonte,

Cidade: Bom Jesus

Estado: PI

CEP: 64900-000

País: BRASIL

Telefone: (86) 323 72332

Fax:

Email:

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO

Resumo: BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO.

Os filmes ou membranas para revestimentos são definidos como matrizes preparadas a partir de biomateriais e amplamente utilizadas desde a área farmacêutica até a alimentícia. Quitosanas e galactomanana apresentam propriedades físicas particulares para diferentes formulações filmogênicas, sugerindo sua promissora utilização como curativo tópico de feridas, por exemplo.. O presente produto descrito é um biofilme formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), atóxico, hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de acesso fácil, associado às nanopartículas de prata, com características antibacterianas, oriundas de bioativos de origem microbiana, os quais podem potencializar o efeito cicatrizante de feridas. Os bioativos presentes no filme são obtidos a partir de um processo de degradação enzimática contendo enzima collagenase e colágeno bovino Tipo IV em reação térmica (30°C), sob agitação magnética por 1h. Após o procedimento de hidrólise, à essa solução contendo enzima e peptídeos de colágeno foi adicionada solução de nitrato de prata para síntese verde de nanopartículas. Ao final, foi preparada uma mistura homogênea de quitosana, galactomanana (obtida de *Cassia grandis*) e bioativos de nanopartículas de prata para a formação do produto. O biofilme, rico em bioativos, por apresentar moléculas naturais, apresentam ação hipoalergênica, e são capazes de acelerar o processo cicatricial. Assim, as características do biofilme o tornam mais do que viável a sua utilização como suporte para imobilização de sistemas de liberação de drogas.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 23/08/2023 às 15:11, Petição 870230074688

Nome: THIAGO PAJEU NASCIMENTO

CPF: 07290171411

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Planalto Horizonte, Bom Jesus, PI

Cidade: Planalto Horizonte

Estado: PI

CEP: 64900-000

País: BRASIL

Telefone: (81) 984 438125

Fax:

Email: thiago_pajeu@hotmail.com

Inventor 10 de 12

Nome: KETURA RHAMMA CAVALCANTE FERREIRA

CPF: 05663495401

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Professor Augusto Lima e Silva,Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51030-030

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 727971

Fax:

Email: ketura.cavalcante@hotmail.com

Inventor 11 de 12

ANEXO A



**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

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/12/2022 às 14:03, Petição 870220123408

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 11022597000191

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. AGAMENON MAGALHÃES, S/N , SANTO AMARO

Cidade: RECIFE

Estado: PE

CEP: 50100-010

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/12/2022 às 14:03, Petição 870220123408

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE ELABORAÇÃO E USO DE BIORREATOR SUSTENTÁVEL PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

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

A presente proposta de invenção trata de um processo de produção de biorreator sustentável composto por material natural e biodegradável, utilizando o fruto (cabaça) da planta *Crescentia* sp. e seu uso com fermentação em estado sólido proporcionando rendimento na extração de biocompostos ativos de fungos filamentosos. O processo proposto é composto pelas etapas de Preparação, Fermentação, Filtração e extração e centrifugação. A etapa da preparação do biorreator é realizada a coleta do fruto (cabaças) ainda imaturas, técnica de remoção da polpa, lavagem com solvente orgânico e água corrente e secagem realizada em estufas e armazenamento em temperatura ambiente. A etapa de fermentação é realizada por meio de prospecção de reator sustentável com epicarpo de *Crescentia* sp. contendo substrato umedecido e biomassa fúngica. O extrato deve ser obtido por meio da filtração e centrifugação do material realizada sequencialmente à extração. Para confirmação da aplicabilidade do presente invento, a protease extraída foi analisada por métodos espectrofotométricos para determinação de atividade proteolítica atingindo até 63 U/mg. Pode-se afirmar que esse método inovador por se tratar de biorreator sustentável, que proporciona rendimento na extração de moléculas de interesse biotecnológico. Desta forma, pode ser aplicado em indústrias aplicável no setor biotecnológico ambiental, farmacêutico, alimentício e têxtil.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/12/2022 às 14:03, Petição 870220123408

Nome: KETURA RHAMMA CAVALCANTE FERREIRA

CPF: 05663495401

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Professor Augusto Lima e Silva, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51030-030

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 727971

Fax:

Email: ketura.cavalcante@hotmail.com

Inventor 8 de 10

Nome: THIAGO PAJEU NASCIMENTO

CPF: 07290171411

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Nicolau Barreiras, 253, Bloco 2, apartamento 01, Centro

Cidade: Bom Jesus

Estado: PI

CEP: 64900-000

País: BRASIL

Telefone: (89) 981 13062

Fax:

Email: thiagopajeu@ufpi.edu.br

Inventor 9 de 10

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 29/12/2022 às 14:03, Petição 870220123408

ANEXO B

Process Biochemistry 143 (2024) 13–22



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/procbio

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

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso ^a, Thiago Pajeú Nascimento ^{b,*}, Patyanne Carvalho Correia ^c,
 Juanize Matias da Silva Batista ^c, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa ^d, Kétura Rhammá
 Cavalcante Ferreira ^a, Jônatas de Carvalho-Silva ^e, Maria Teresa da Cruz Augusto Neves
 Petersen ^f, Wendell Albuquerque ^g, Thiago de Salazar e Fernandes ^h, Attilio Converti ⁱ, Ana Lúcia
 Figueiredo Porto ^c

^a Ketso Asani Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

^b Campus Professor Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus, Piauí 64900-000, Brazil

^c Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 52171-900, Brazil

^d Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Santo Amaro, Recife, Pernambuco 50100-130, Brazil

^e Northeast Biotechnology Network, Federal University of the Agreste of Pernambuco (UFape), Av. Bom Pastor, s/n- Boa Vista, Garanhuns, Pernambuco 55292-270, Brazil

^f Department of Medicine, Aalborg University, Fredrik Bajers Vej 7K, Aalborg East, Aalborg 9220, Denmark

^g Institute of Food Chemistry and Food Biotechnology, Justus Liebig University Gießen, Heinrich-Ruff-Ring 17, 35392 Gießen, Germany

^h Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

ⁱ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, University of Genoa (UNIGE), Via Opera Pia, n. 15, Genova I-16145, Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

Protease activity
 Fibrinolytic therapy
 Gamma radiation

ABSTRACT

Thrombosis is a dangerous condition that can result in major damage. Fibrinolytic enzymes are significant therapeutic agents for thrombosis. This study focused on MsFE, a fibrinolytic protease from *M. subtilissimus* UCP1262, exploring its physicochemical traits and the impact of gamma radiation on its activity. Investigations included: fibrinogenolytic activity, effects of solvents and ions, gamma rays, enzyme shelf life, FTIR, CD, clotted times determination, and enzymatic kinetics. Notably, the major results obtained show the protease retained 90 % activity in organic solvents, FTIR indicated carbonyl functional groups and Circular dichroism spectroscopic studies indicated that the secondary structure (β-sheet) of enzyme remains mostly unaffected over pH 2.0–9.0, whereas considerable changes were observed in the tertiary structure. Kinetic analysis revealed altered parameters post-irradiation. Gamma radiation initially enhanced enzyme activity (10 kGy) but progressively decreased beyond 20 kGy. Metallic ions, especially magnesium, augmented irradiated enzyme activity. This study highlights gamma radiation's potential as a modulator for enhanced fibrinolytic activity, suggesting future biomedical applications.

1. Introduction

Fibrinolysis is an essential process in the human body's homeostasis, responsible for dissolving blood clots formed during the blood coagulation process [1]. In this context, fibrinolytic proteases play a fundamental role in maintaining homeostasis, as they can break down fibrin, the main component of clots, restoring normal blood circulation [2]. The search for proteases with this activity has aroused great interest, both in the medical field and in the pharmaceutical industry, due to their

potential therapeutic applications [3].

The obtaining of proteases with fibrinolytic action can be carried out by different approaches, with microorganisms being one of the main sources for naturally producing these enzymes as part of their survival and interaction mechanisms with the environment [5]. However, for fibrinolytic proteases to be used effectively, it is crucial to perform their detailed characterization. Characterization involves the analysis of biochemical, structural, and functional properties of these enzymes, allowing understanding their activity under different conditions. This

* Correspondence to: Campus Professor Cinobelina Elvas, Federal University of Piauí, Bom Jesus, Brazil.
 E-mail address: thiogopajeu@ufpi.edu.br (T.P. Nascimento).

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

Received 8 January 2024; Received in revised form 10 April 2024; Accepted 11 April 2024

Available online 16 April 2024

1359-5113/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

information is essential for optimizing production, choosing the best producing sources, and developing safe and efficient therapeutic formulations [4].

Moreover, the characterization of fibrinolytic proteases is also essential for the study of their clinical applicability [5–7]. Understanding their pharmacokinetic properties, such as bioavailability and half-life, as well as evaluating their safety and efficacy in experimental models, are crucial steps in the development of fibrinolytic therapies based on enzymes [8]. This characterization is vital not only for advancing therapeutic development but also for establishing the economic value of fibrinolytic proteases in the pharmaceutical industry, given that these enzymes hold great value for developing innovative and effective therapies [8]. An example of fibrinolytic protease widely known commercially as Nattokinase. The global Nattokinase market was valued at US\$ 32.64 million in 2022 and is anticipated to reach US\$ 52.02 million by 2029, witnessing a CAGR of 7.97 % during the forecast period 2023–2029 (Global Nattokinase Market Research Report, 2023).

Beyond conventional characterization approaches, the use of ionizing radiation, such as gamma radiation, has been shown to be a promising tool in the investigation and characterization of proteases [9]. Gamma radiation can cause damage to biological molecules, but it can be used to obtain proteases with different potentialities, including greater fibrinolytic activity, increased stability, or specific characteristics of interaction with substrates. The characterization of these variants, compared to the original proteases, allows understanding the structural and functional changes that occur, as well as their implications for fibrinolytic activity [10]. Therefore, the objective of this work is the physicochemical and biological characterization of a fibrinolytic protease produced by the fungus *Mucor subtilissimus* UCP 1262 and to evaluate its potential as an adverse agent in thrombolytic pathways.

2. Methodology

2.1. Chemicals and reagents

Various chemicals and reagents were employed in the experimental procedures, including solid-state fermentation with *Mucor subtilissimus* UCP 1262 were purchased from Kasvi (Paraná, Brazil). Bovine Serum Albumin (BSA), tris, phosphate, DEAE-Sephadex A50 ion exchange resin were purchased from Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany). All other chemicals were of analytical reagent and chemically pure.

2.2. Fibrinolytic enzyme production and purification

The fibrinolytic protease (MfPE) under investigation was produced and purified following the methodology outlined by Nascimento et al. [11]. The production process involved solid-state fermentation utilizing *Mucor subtilissimus* UCP 1262 with wheat bran as a substrate. Subsequently, purification was achieved through DEAE-Sephadex A50 ion exchange chromatography in a glass column that had been pre-equilibrated with 125 mM sodium phosphate buffer at a pH of 7.0.

2.3. Fibrinogenolytic activity

The fibrinogenolytic activity was determined according to Park et al. [12]. The reaction was incubated at 37°C using 100.0 µg/mL of fibrinogen and 5.0 µg/mL of protease. During the reaction, aliquots of 20 µL were taken at times of 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 240 min. The reaction was stopped by adding 4.0 µL of SDS-PAGE 6X buffer and heated at 100°C for 3 min. The resulting products by hydrolysis (10.5 µg) were analyzed by SDS-PAGE as described by Chang et al. [13].

2.4. Effects of serum albumin on enzymatic activity

The reaction was carried out by adding 0.5 µg of the fibrinolytic

enzyme to 6.7 mg/mL of BSA (Bovine Serum Albumin) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 150 mM NaCl. The influence of human albumin (6.7 mg/mL), provided by the Biotechnology and Blood Derivatives Research Laboratory (LbHemo) at the Federal University of Pernambuco, was also evaluated. After the addition of 10 µL of chromogenic substrate (4 mM), the absorbance at 405 nm was monitored at 37 °C for 20 minutes according to Park et al. [12].

2.5. Influence of organic solvents on fibrinolytic enzyme activity and stability

Activities were assessed following the method of Hassanein et al. [14], where preparations were incubated using the solvents: ethyl ether, ethyl acetate, ethanol, acetone, isopropanol, acetonitrile, and methanol, all at a concentration of 20 % (v/v) at 37°C for 30 minutes. Additionally, the effect of solvents on enzyme stability was investigated at 4°C and 25°C over a period of 0–30 days. For the use of a control sample, phosphate buffer (pH 7.0) was used in enzyme dissolution.

2.6. Fibrinolytic enzyme shelf life

The shelf-life freeze-dried enzyme (stability under ambient conditions) was analyzed over the period of 0, 7, 15, 20, 30, 60, 120, 240, and 365 days and according to storage temperatures: 25°C and 4°C. At each time and temperature, samples were taken for fibrinolytic activity determination according to Hassanein et al. [14].

2.7. Steady-state fluorescence spectroscopy assays

For steady-state fluorescence spectroscopy, solutions of 0.2 mg/mL, equivalent to 10 µM of protein, were prepared at different pH values (4, 5, 6, 7.2, 8, 9, and 10), using the following buffers: 0.1 M sodium acetate (4 ≤ pH ≤ 5); 0.1 M sodium phosphate (6 ≤ pH ≤ 8) and glycine (9 ≤ pH ≤ 10). The protein excitation spectra were obtained by fixing the emission length at 337 nm. The emission spectra were obtained by exciting the protein at 280 nm. All spectra were collected using an excitation slit aperture of 0.25 mm and an emission slit aperture of 6 mm. Analyses were performed under three conditions: before heating at 20°C, after heating at 80°C, and after cooling to 20°C again for each pH.

2.8. Determination of coagulation times

The study analyzed prothrombin times (PT) and partially activated thromboplastin times (aPTT) using a semi-automatic BPT II coagulometer (Dade Behring). Plasma was obtained from the whole blood of healthy individuals with 3.2 % sodium citrate as an anticoagulant. Blood was collected by venipuncture and centrifuged at 1.726xg for 15 minutes at 25°C. PT and aPTT assays were controlled using saline solution (0.9 % NaCl) and plasma, followed by the addition of specific reagents (Thromborel S and Thrombin-Dade Behring for PT, and Dade actin activated cephaloplastin reagent-Dade Behring and 0.025 M calcium chloride for aPTT). To evaluate the anticoagulant effect, the fibrinolytic protease was used at a concentration of 1.0 mg/mL, including a version supplemented with Mg²⁺ ion.

2.9. Circular dichroism

For circular dichroism (CD) assays, samples prepared exactly the same way as in steady-state fluorescence spectroscopy were used to analyze secondary structures in protease at different pH and temperature values. Measurements were taken using a J615 CD spectrophotometer (Jasco Incorporated, Easton, USA) at wavelength intervals between 200 and 260 nm, with ellipticity monitored every 1 nm and a response time of 2 seconds, at a scanning speed of 50 nm/min. Subsequently, measurements were taken at 20°C, 80°C, and again at 20°C for

all pH values.

2.10. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The films were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) on a Bruker FT-IR VERTEX 80/80 v (Boston, USA) in Attenuated Total Reflectance (ATR) mode with a platinum crystal accessory between 200 and 1800 cm^{-1} , using 16 scans at a resolution of 4 cm^{-1} . Data analysis was performed using GraphPad Prism 5.00.288 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

2.11. Gamma radiation effects on fibrinolytic protease

The purified and freeze-dried MaPE (5.0 mg/mL) was dissolved in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, and transferred to borosilicate glass vials (16–125 mm), which were frozen and subsequently irradiated under atmospheric pressure O_2 using a Gammacell 220 Excel 60Co gamma ray irradiator (Ontario, Canada) with doses of 0.01, 0.05, 0.1, 5, 1, 5, 10, and 50.0 kGy at a rate of 12.5 kGy/h. After irradiation, protease activity was analyzed according to Ginther et al. [15], where the reaction contained 25 μL of substrate (1 % w/v azocasein) and 15 μL of the sample. This mixture was incubated for 1 hour in an oven at 30°C and stopped by adding 1.0 mL of 10 % w/v trichloroacetic acid (TCA). Subsequently, the samples were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. To the supernatants, 0.2 mL of 1.3 N sodium hydroxide was added, and the reading was taken at 420 nm on a spectrophotometer. Activity was determined considering one unit of enzymatic activity (U) as the variation in absorbance of 0.1 in one hour.

2.12. Ionic influence in irradiated and non-irradiated protease

The irradiated protease at a dose of 10.0 kGy was subjected to concentrations of 1.0, 2.5, and 5.0 mM of iron, copper, and magnesium ions (these ions were chosen based on previous studies according to Nascimento et al. [11], where a kinetic curve of up to 90 minutes of contact was made). The control group was defined as the enzyme at a concentration of 5.0 mg/mL in contact with the ion solution but without irradiation. The results were expressed in U/mL of enzymatic activity obtained.

2.13. Enzymatic kinetics

A Michaelis-Menten graph was used to correlate substrate concentration and protease activity to define kinetic parameters such as V_{max} and Michaelis constant (K_m), and a Lineweaver-Burk graph was generated. Six different concentrations (2, 4, 8, 10, 16, and 20 g/L) of azocasein (Sigma-Aldrich) dissolved in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.2) with additional 10–3 M CaCl_2 were used in these assays. The same method for evaluating protease activity was used to determine the enzyme's kinetic parameters.

2.14. Statistical analysis

All data analysis and graph development were done using Origin 2018 and GraphPad Prism 10.

3. Results and discussion

3.1. Fibrinolytic activity

The development and characterization of fibrinolytic enzymes are essential in modern medicine. In addition to the ability to dissolve clots (fibrinolytic activity), the evaluation of fibrinogenolytic activity allows understanding the enzyme's ability to modulate clot formation from the beginning of the process, providing an understanding of the enzyme's role in hemostasis [16,17].

In this sense, the effect of the MaPE produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 on fibrinogen can be observed in Fig. 1, where it is possible to perceive that fibrinogen was fragmented in a time-dependent manner. The protease was previously purified, lyophilized, and subjected to purification tests, such as SDS-PAGE, as described by Nascimento et al. [11], which can be observed in the same. The α chain was completely degraded in 20 minutes (Fig. 1A), followed by the β chain, and after 120 minutes, the γ chain (Figs. 1B and 1C). This degradation highlights the anticoagulant efficacy of the enzyme, resulting in low molecular weight fragments (17–24 kDa). The priority in degrading the α chain is important because it is responsible for creating binding points between the β and γ chains [18].

According to Souza et al. [19], the fibrinolytic enzyme of *Serratia marcescens* was also able to hydrolyze all the chains of fibrinogen. The authors reinforce that this makes them direct-acting enzymes, differentiating them from plasminogen activators such as streptokinase. Their direct action brings advantages, avoiding side effects such as platelet activation, as reiterated Souza et al. [19], demonstrating the degradation of all chains by protease obtained from *Penicillium* sp. On the other hand, Costa et al. [20], when studying the venom of *Bothrops alternatus*, observed degradation of the α and β chains, but it was not possible to observe the degradation of γ . Similarly, Madhu & Sharada [17] were able to completely degrade the α chain, but only partially reached β and γ when using protease from *Cucumis dipsaceus*. These results demonstrate the importance of studying and investing in the production of proteases by microorganisms.

3.2. Effects of serum albumin on enzymatic activity

Albumin is the most abundant protein in human blood plasma, representing approximately 55 % of the total protein content [21]. These proteins can affect the structure, activity, and affinity of fibrinolytic proteases, acting as direct inhibitors or altering the microstructure of the coagulation system [9]. However, in the presence of bovine serum albumin (BSA), the studied protease did not undergo any significant decrease (99.37 ± 0.023) compared to the control (100 %). As for the presence of human albumin and enzyme, it also maintained its enzymatic activity (98.14 %). This suggests greater stability against blood proteins compared to competitors, such as the serine protease produced by *Agrocycbe agerita*, which maintained only 46.59 ± 1.3 of its activity in the presence of BSA according to Li et al. [22], presenting itself as a safer and more effective option as a treatment against thrombosis.

3.3. The stability of fibrinolytic enzymes in organic solvents

In general, the protease remained stable against the tested solvents. These results suggest the maintenance of the enzyme's configuration. Li et al. [22] shows that the substitution of some water molecules with organic molecules in an enzyme can stabilize its structure. Notably, there was less variation with ethanol at both tested temperatures, as well as acetone with residual activity up to 90 % at 4°C, surpassing Li et al. [22], which had about 47 %. Fig. 2A reveals that after 30 minutes of exposure to different organic solvents, the enzyme remained active, with activities above 100 % when exposed to ethyl ether and acetone, according to [23] exposure of enzymes to anhydrous organic solvents at optimized temperatures has been shown to enhance catalytic power through local changes at the binding region. In Fig. 2B it is shown that after 30 days of exposure, the fibrinolytic protease preserved more than 80 % of its activity in all solvents and temperatures, no significant change in enzyme stability was identified after 30 days in relation to the temperatures analyzed, which agrees with studies carried out on the thermal stability of the enzyme [11]. Given the interest in effective and sustainable solutions in the industry, and the importance of protease purification processes for application in the pharmaceutical industry, it is expected that the demand for proteases tolerant to organic solvents will continue to increase, since solvents can be used in the process of

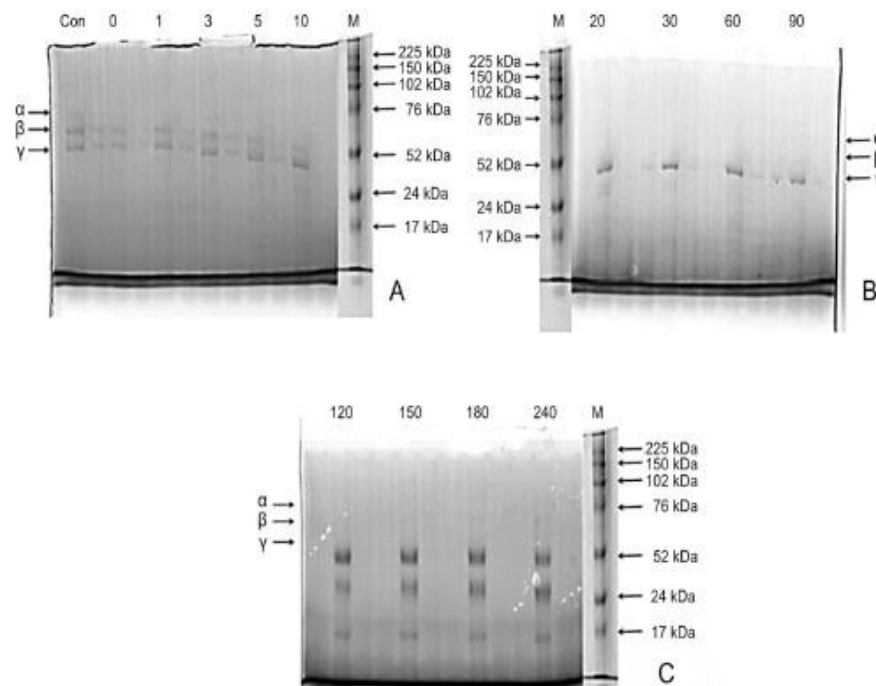


Fig. 1. Evaluation of fibrinogen hydrolysis through fibrinolytic protease as a function of reaction time. A- Control, 0, 1, 3, 5 and 10 minutes; B - 20, 30, 60 and 90 minutes; C - 120, 150, 180 and 240 minutes.

obtaining this pure enzyme [24]. This characteristic also makes it valuable for industrial applications, particularly in peptide synthesis, where non-aqueous conditions are often required [25].

3.4. Effect of MsFE on clotting time determination

The MsFE was less effective compared to streptokinase, which was used as a reference point as seen in Fig. 3. However, the protease showed a prolongation over time during the activated partial thromboplastin time (aPTT) tests, suggesting inhibition of the intrinsic or common coagulation pathway [26,27]. Regarding the prothrombin time (PT), there was less sensitivity to time, even at high enzyme concentration (Fig. 3B), suggesting that the fibrinolytic protease affected the extrinsic coagulation pathway less. Previous studies have suggested PT prolongation, indicating that the enzyme can block the activation of the coagulation cascade by inhibiting the interaction with factor VII [28]. Considering the previous fibrinogen degradation results, it is understood that the fibrinolytic protease altered the thrombin action sites on fibrinogen or affected the fibrin polymerization sites [29,30]. According to Da Silva [31], the fibrinolytic enzyme produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 is a strong candidate to become a medicine for the treatment of thrombosis, due to its ability to dissolve clots without any complications.

The prolongation of PT and aPTT by the protease is like previous studies, for example, Choi identified a fibrinolytic protease from *Spirodela polyrrhiza* with prolonged aPTT, indicating an anticoagulant effect. However, this effect was reduced after heat treatment. Similarly, Zhou et al. [32], described the prolongation of aPTT in various fibrinolytic enzymes, suggesting possible safety of the protease as a thrombolytic

agent. This means that although the fibrinolytic protease may not be as effective as streptokinase in dissolving blood clots, it can be considered safe in terms of its impact on blood coagulation.

Proteins can deviate from their native structure due to unfolding, leading to phenomena such as aggregation, where proteins combine, precipitation, where proteins separate and form solids, or accelerated chemical degradation. These processes tend to decrease the effectiveness and longevity of a protein [33]. In this sense, the stability of the fibrinolytic protease was analyzed at two temperatures over a period of 1 year.

In Fig. 4, it is possible to observe that the temperature of 4°C showed to be much more impactful on the stability of fibrinolytic activity, reaching a total of 33.14 % of residual activity after one year of analysis. In contrast, at 25°C, about half (48.66 %) of the enzymatic activity was preserved. The loss of enzymatic activity at low temperatures can be a result of protein denaturation, crystallization, or aggregation [34,35]. Aligned with this, Levi and Levi [36] also highlight that anticoagulant processes tend to slow down at low temperatures.

3.5. Circular Dichroism (CD)

Circular Dichroism (CD) allows the evaluation of the three-dimensional structure and integrity of proteins, which is crucial for the success of enzyme-based drug development and production. In addition, CD is a valuable tool for monitoring the impact of environmental factors such as pH, for example [37], since charge changes resulting from pH changes can affect the absorption of circularly polarized light [38].

In the present study, the previously purified MsFE was analyzed by

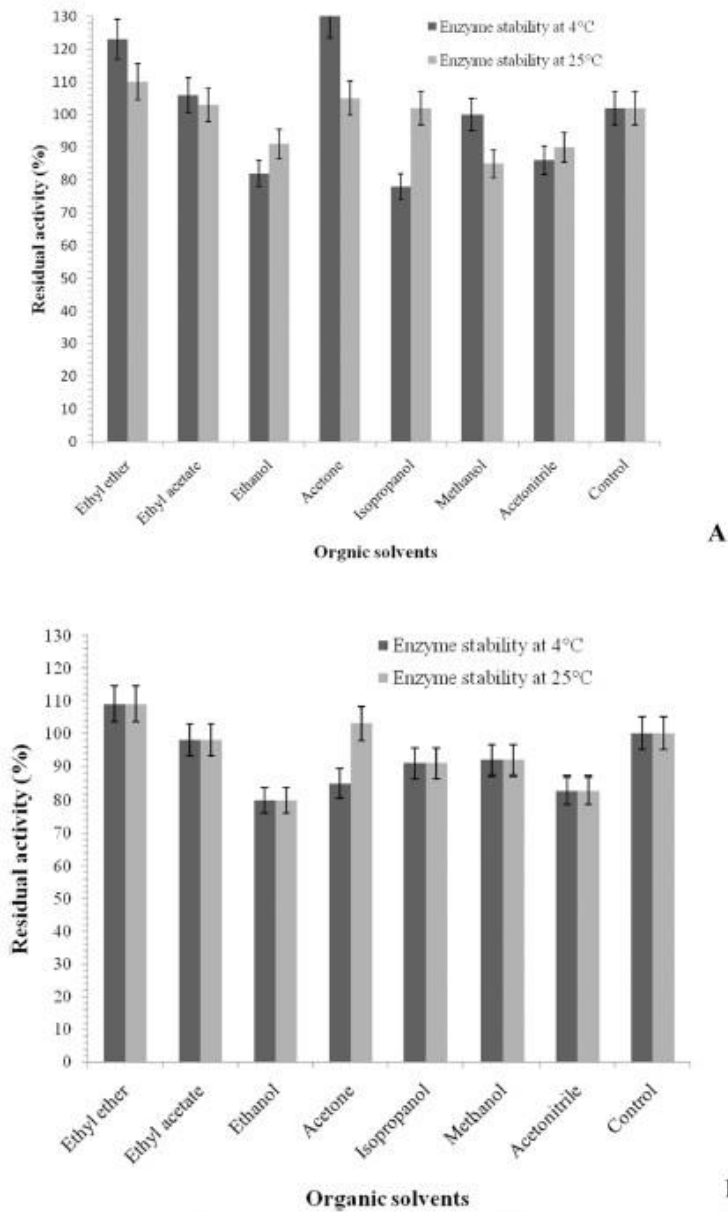


Fig. 2. Influence of organic solvents on the stability of the enzymatic activity of the fibrinolytic enzyme at temperatures of 4°C and 25°C over different analyzed time periods. [A] Assessment of activity at time 0 and [B] assessment of activity over 30 days.

CD at different pHs (Fig. 5). In Tris-HCl buffer pH 8.0, the enzyme structure approaches its optimal activity range, evidenced by the absorbance range 210–220 nm, suggestive of a β -sheet structure. The difference in absorbance $A(1)-A(6)$ in CD studies is small (0.0001), corresponding to an ellipticity of 1/100 of a degree. CD spectroscopy in the

UV range (260–170 nm) characterizes α -helical, β (β -sheet), and disordered secondary structure, detecting signals from tryptophan, tyrosine, and phenylalanine. At extreme pHs, structural disorder and data interference are observed (Fig. 5), agreeing with studies that show reduced catalytic activity at pHs outside the optimal range [11]. Similarly,

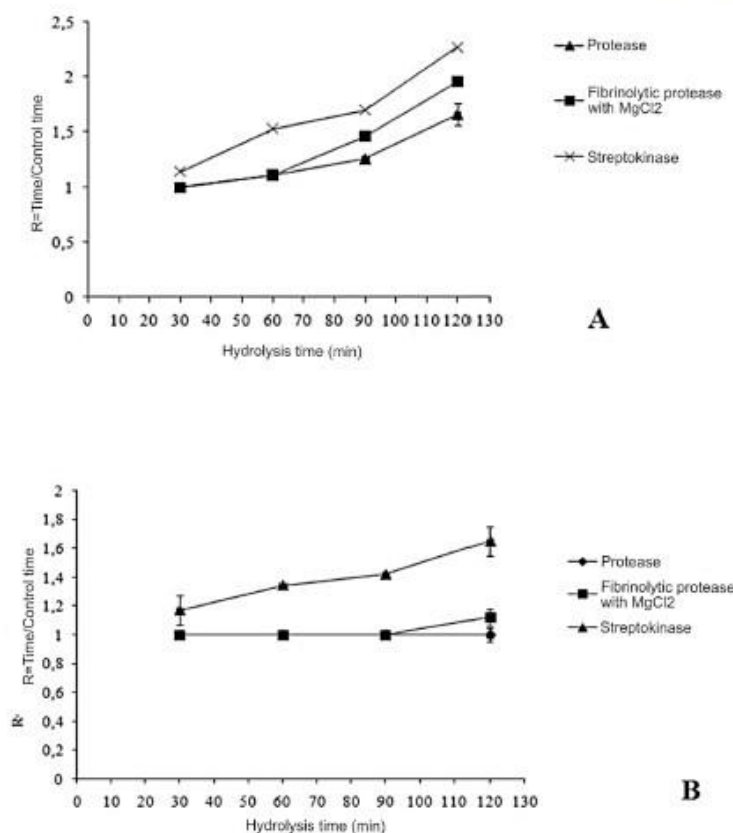


Fig. 3. Comparison of the protease and a control Streptokinase [irradiated (10 kGy) and nonirradiated] on the coagulation cascade, intrinsic and extrinsic pathway. a) APTT (activated partial thromboplastin time). b) Prothrombin time (PT). R = Relation between the sample clotting time and the control clotting time. The data represent means $\pm$ SDs, n=3.

Thakur et al. [39] also presented a protease with an alkaline profile and the presence of β -sheet.

3.6. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The FTIR profile of the purified McFE revealed distinct characteristics in the infrared spectrum (Fig. 6). O-H stretching bands were observed at 1660 cm^{-1} , indicating the presence of carbonyl functional groups. A clear vibration at 1514 cm^{-1} suggests a possible interaction between functional groups, possibly C=C bonds in aromatic rings. The presence of amines is estimated by the absorption peak at 1303 cm^{-1} . Finally, the absorption band at 713 cm^{-1} suggests the presence of C-Cl or C-Br bonds, common in organic halides. These results provide valuable insights into the composition and structure of the protease, aiding in the characterization and understanding of its functional properties, such as stability, catalytic potential, and substrate specificity [40].

3.7. Gamma radiation effect on protease activity

Studies indicate that low doses of ionizing radiation benefit proteases [41], but high doses can inhibit them. Song et al., [9] suggests that ionizing radiation has the potential to be developed as a tool for

molecular modification in the field of drug discovery. In the context of radiotherapy, it has been found that proteasome inhibitors, such as MG-132, increase the efficacy of radiation by suppressing the manganese antioxidant enzyme superoxide dismutase (MnSOD) [42]. Ionizing radiation using cobalt 60 gamma rays is a useful method for sterilization and decontamination. These rays can penetrate more than 50 cm, making them suitable for various thick and high-density products [43].

When different doses of gamma radiation (10 Gy to 50 kGy) were applied to the fibrinolytic protease activity, it became evident that 10 Gy radiation increased the enzyme activity by around 10 %, while from 20 Gy onwards, there was a progressive reduction in enzymatic activity almost linearly with the radiation dose, showing that possibly the radiation affected the protein structure and consequently its activities. Similarly, the lectin extracted from *Phibirusa pyridolia* presented modulation of anticoagulant and hemagglutinating activities, depending on the levels of exposure to gamma radiation [44]. El-Beltagi et al. [45] demonstrated in their studies that a dose of 20 Gy was able to cause a metabolic modification of antioxidant defense enzymes (ascorbate peroxidase, catalase, and superoxide dismutase) in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) stem cultures. Gang et al., [10], highlights that Gamma irradiation treatment can improve the functional properties of rice protein, such as solubility, water and oil holding capacity, and

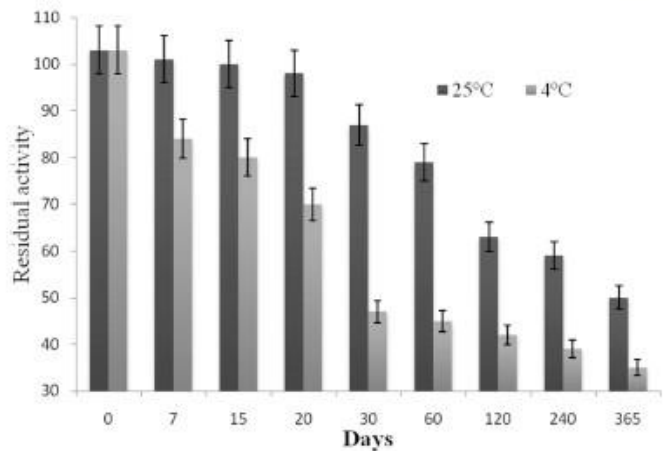


Fig. 4. Evaluation of the stability of fibrinolytic protease at different temperatures (4 and 25°C) over a period of one year.

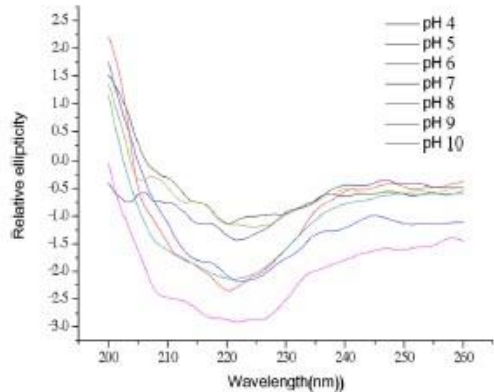


Fig. 5. Circular dichroism spectra obtained for fibrinolytic protease at different pH values at 20°C. Measurements were recorded as an average of 8 scans for protein solutions of 0.2 mg/mL, at 25 °C. Wavelength intervals between 200 and 260 nm, with ellipticity monitored every 1 nm and a response time of 2 seconds, at a scanning speed of 50 nm/min.

emulsification activity and stability when applied at low doses, in this way, the present work highlights the importance of further studies on the implication of gamma radiation on fibrinolytic protease.

Pervan *et al.* [46] cites that gamma radiation decreases the enzymatic activity of the 26 S proteasome from 20 Gy onwards. High-dose gamma radiation breaks bonds in the polypeptide chain, generating free radicals, oxidation, and damage to the protein structure [47]. Free radicals preferentially attack amino acids, aromatic acids, and disulfide bridges in the surrounding medium [48] with little impact on residues susceptible to direct radiation [47], mainly cleaving intermolecular forces between protein subunits, leading to polypeptide chain breaks.

3.6. Effect of divalent ions on protease activity under irradiation

We can see in Fig. 7 that all three ions studied (iron, copper, and magnesium) enabled an increase in protease activity after irradiation of

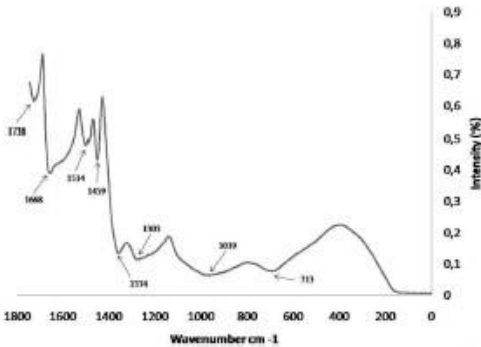


Fig. 6. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) profile of the fibrinolytic protease. Attenuated Total Reflectance (ATR) mode with a platinum crystal accessory between 200 and 1800 cm⁻¹, using 16 scans at a resolution of 4 cm⁻¹. Data analysis was performed using GraphPad Prism 5.00.288 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

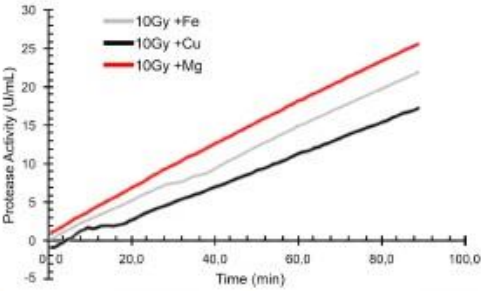


Fig. 7. Protease activity after 10 Gy radiation in the presence of 2.5 mM iron, copper, and magnesium ions.

10 Gy, potentially increasing the efficiency of the process. It is believed, then, that the effect of radiation on the protease has caused a change in the enzyme's active site and enabled a greater enzyme/substrate ratio, which can be confirmed when we analyze the results of Nascimento et al. [11], where the same protease without radiation action had an increase of 33; 100 % and 71 % on enzymatic activity on copper, magnesium, and iron ions, respectively.

It is evident that the magnesium ion promoted a significant increase in relative activity as its concentration increased in contact with the irradiated protease, allowing a 324 % increase in the activity of the irradiated enzyme compared to the control and obtaining the greatest impact compared to the other ions tested. The magnesium ion has an advantage of being a significant catalyst when compared to other competing metals. These results are in line with those reported by Annamalai et al. [49] who observed a stimulating effect of Mg^{2+} ion on alkaline proteases obtained from *Bacillus firmus* CAS7. Similarly, Mahalan et al. [50], presented the same effect in alkaline protease obtained from *Bacillus gibsonii* 6BG15–4.

3.9. Kinetic parameters evaluation

Fig. 8 illustrates the impact of azocasein concentration on the enzymatic reaction rate catalyzed by the purified MsPE. The enzyme kinetic parameters derived from the analysis were as follows: $V_{max} = 100.30$ U/mL; $K_m = 7.59$ mg/mL. When compared to the enzymatic kinetics of the same protease without irradiation, as described by Gomes et al. [51] ($V_{max} = 333.33$ U/mg; $K_m = 2.35$ mg/mL), it is evident that the irradiated protease exhibits a higher affinity. This higher affinity is indicated by the lower K_m value, signifying a greater enzyme-substrate affinity. The fit with the Michaelis-Menten equation yielded an R^2 of 0.90, indicating a satisfactory fit.

It is known that the behavior of an enzyme in relation to its substrate is influenced by attractive forces between the substrate molecule and the atoms in the enzyme's active site [52]. It is noteworthy that even after ionizing radiation, the three-dimensional structure of the enzyme allowed it to preserve its active center and even allowed a high degree of interaction and consequently, great affinity with the azocasein substrate.

As observed in Fig. 9, there is a high initial rate of proteolytic reaction from 2 to 14 mg/mL, when many bonds are broken. From a concentration of 16 mg/mL, a stationary phase is observed, promoting a decrease in the reaction. This hydrolysis curve was similar to those obtained by Holanda & Netto [53]. Kurozawa et al. [54] states that this profile of enzymatic hydrolysis curve can be associated with various factors, such as: decrease in the concentration of peptide bonds available for cleavage, competition between the original substrate and the peptides formed during the reaction, and a decrease in enzymatic activity due to enzyme denaturation.

4. Conclusion

The MsPE has potential as an antithrombotic agent. However, exposure to gamma radiation influenced the enzyme activity in a dose-dependent manner, with low doses increasing its activity, while higher doses progressively decreased its activity, indicating an impact on the enzyme's structure. In addition, the presence of metallic ions, including iron, copper, and magnesium, appeared to positively affect the activity of the irradiated protease, implying a potential modulation of the enzyme by these ions. The enzyme kinetic of the irradiated protease demonstrated a high affinity, indicating its effectiveness as a fibrinolytic agent. This study contributed to the understanding of the clinical and industrial applications of this enzyme and lays a solid foundation for future research that seeks to target the therapeutic benefits of MsPE in its pharmaceutical and industrial applications.

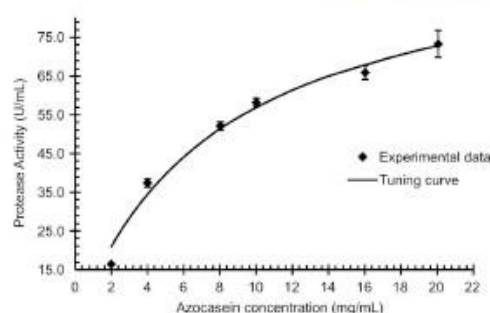


Fig. 8. Kinetic fitting curve of azocasein substrate degradation by the protease. The data represent means $\pm$ SDs, $n=3$.

CRediT authorship contribution statement

Maria Teresa da Cruz Augusto Neves Petersen: Writing – original draft, Supervision, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. Jônatas de Carvalho-Silva: Visualization, Resources, Methodology, Investigation, Conceptualization. Wendell Albuquerque: Writing – original draft, Supervision, Methodology, Investigation, Data curation. Atílio Converti: Writing – original draft, Visualization, Methodology. Thiago de Salazar e Fernandes: Writing – review & editing, Writing – original draft, Methodology. Thiago Nascimento: Writing – original draft, Methodology, Investigation. Ana Lúcia Figueiredo Porto: Writing – review & editing, Writing – original draft, Supervision, Methodology. Kethylen Barbara Barbosa Cardoso: Writing – original draft, Software, Resources, Methodology, Formal analysis, Data curation. Juanize Matias da Silva Batista: Investigation, Formal analysis, Data curation. Patyanne Carvalho Correia: Writing – original draft, Visualization, Supervision, Methodology, Investigation. Kétura Rhamã Cavalcante Ferreira: Writing – original draft, Validation, Supervision, Software, Investigation, Formal analysis, Data curation. Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa: Writing – original draft, Software, Resources, Methodology, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) and Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco – FACEPE (APQ-0623-5.01/21; APQ-0870-5.01/22). The thanks the UPPi research and technological development productivity scholarship program – PQDT 2023–2024 for the research productivity scholarship granted.

References

- [1] C. Longstaff, K. Kolev, Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis, *J. Thromb. Haemost.* 13 (S11) (2015) S98–S105, <https://doi.org/10.1111/jth.12935>.

- [2] M.M. Ali, S.C. Bavisetty, Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 1498–1517, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.07.303>.
- [3] R.S. Santana, V.G. Farias, E.S. Sevalho, K. Candido, K.C.R. Carpio, W.R. Gomes, R. P. Carvalho, Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years, *Res., Soc. Dev.* 11 (14) (2022) e530111436652, <https://doi.org/10.33448/rsd.v11i14.36652>.
- [4] K.B.R. Cardoso, M.C. Nascimento, A.C. Batista, V.M. Oliveira, T.P. Nascimento, J. M.S. Batista, R.M.P.B. Costa, L. Pastrana, A.L.F. Porto, Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes, *Res., Soc. Dev.* 11 (2) (2022) e13611225449, <https://doi.org/10.33448/rsd.v11i2.25449>.
- [5] N. Barzkar, Marine microbial alkaline protease: an efficient and essential tool for various industrial applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 161 (2020) 1216–1229, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2020.06.072>.
- [6] X.-M. Wang, S.-C. Fan, Y. Chen, X.-F. Ma, R.-Q. He, Earthworm protease in anti-thrombosis and anti-fibrosis, *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA) - Gen. Subj.* 1863 (2) (2019) 379–383, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.11.006>.
- [7] M.M. Silva, M.A. Lira, T.A. Rocha, D.F. de Moura, C.A.A. Francisco, Júnior, A.V. S. Ferreira, L. Pastrana, W. Albuquerque, R. Costa, T. Nascimento, A. Porto, Histomorphometric analysis of the lung of Swiss mice treated with a fibrinolytic protease, *An. da Acad. Bras. De Ciências* (2021), <https://doi.org/10.1590/0001-376520220201914>.
- [8] C. Sharma, A. Osmolovskiy, R. Singh, Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications, *Pharmaceutics* 13 (11) (2021) 1880, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>.
- [9] H. Song, H. Kwang, Jeong Kim, Han Moo, Byun Eui-Baek, Ionizing radiation technology to improve the physicochemical and biological properties of natural compounds by molecular modification: a review, *Radiat. Phys. Chem.* 194 (2022), <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2022.110013>. Radiation Physics and Chemistry.
- [10] Gang YAO, Yanan GUO, Tianfu CHENG, Zhongliang WANG, Bing LI, Jicheng JIANG, Yubao ZHANG, Effect of γ -irradiation on the physicochemical and functional properties of rice protein, *Food Sci. Technol.* 42 (2022), <https://doi.org/10.1590/fst.12422>.
- [11] T. Nascimento, A. Sales, J.A.S. Moura, J.M.S. Batista, R.M.P. Brandão-Costa, C. S. Porto, G.M.C. Takaki, T.S. Porto, A. Porto, Protease from *Mucor subtilisimus* UCP 1262: Evaluation of several specific protease activities and purification of a fibrinolytic enzyme, *Acad. Bras. Cienc.* 92 (4) (2020) 1678–2690, <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020200882>.
- [12] J.W. Park, J. Park, H. Choi, T. Jung, S. Yoon, J. Lee, Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirratulus tenuiculus*, *Process Biochem.* 48 (5–6) (2013) 979–987, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.017>.
- [13] C.T. Chang, P.M. Wang, Y.F. Hung, Y.C. Chung, Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean, *Food Chem.* v. 133 (2012) 1611–1617, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.061>.
- [14] W. Hassanain, E. Koth, N. Awary, Y. El-Zawahry, Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42, *J. Biosci.* (2011), <https://doi.org/10.1007/s12058-011-9151-5>.
- [15] C.L. Ginther, Sporulation and the production of serine protease and cephalosporin C by *Streptomyces lacundus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 15 (n. 4) (1979) 522–526, <https://doi.org/10.1128/AAC.15.4.522>.
- [16] Gowthami, K., Madhuri, R.J. 2020. Current status and future directions in producing microbial fibrinolytic enzymes for biomedical applications. 121–125. DOI: 10.1016/B978-0-12-821406-0.00012-6.
- [17] C.S. Madhu, A.C. Sharada, Fibrinogenolytic activity of serine proteases(s) from *Cucumis dipsacens* (jan), *Biochem. Agric. Biotechnol.* v. 17 (2019) 685–689, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.041>.
- [18] J. Weisel, B. Litvinov, Fibrin formation, structure and properties, *Sub-Cell. Biochem.* 82 (2016) 405–456, https://doi.org/10.1007/978-9-319-49674-0_13.
- [19] T. Souza, M. Schwarz, D. Silva, P. Corréa, W. Degraze, L. Mendonça-Lima, O. Fernandes, Serine metalloprotease with plasmin-like fibrinolytic activity of *Serratia marcescens* isolated from the Amazon basin, *Braz. J. Dev. Curitiba* v. 9 (n. 6) (2023) 20249–20266, <https://doi.org/10.34117/bjdv9n6-100>.
- [20] J.O. Costa, C.B. Petric, A. Hamaguchi, M. Housi-Brandeburgo, C. Oliveira, A. Soares, F. Oliveira, Purification and functional characterization of two fibrinogenolytic enzymes from *Bodrops alternans* venom, *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* v. 13 (n. 3) (2007), <https://doi.org/10.1590/S1678-9192007000300007>.
- [21] Biomedical Engineering Advances. Volume 2, December 2021, 100021. Biomedical Engineering Advances. Structure, function, and adsorption of highly abundant blood proteins and its critical influence on hemodialysis patients: A critical review. Heloise Westphalen, Denis Kalugin, Amira Abdelrasoul. 2021. DOI: 10.1016/j.bea.2021.100021..
- [22] Li, G., Liu, X., Shanz, C., Deng, Y., Zheng, X. 2021. A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. *International Journal of Biological Macromolecules*, DOI: 10.1016/j.jbiomac.2020.11.118.
- [23] S. Sharma, T. Renu, N. Munishwar, Gupta, S. Tejbal, Enhancement of catalytic activity of enzymes by heating in anhydrous organic solvents: 3D structure of a modified serine proteinase at high resolution, *Indian J. Biochem. Biophys.* 38 (2001) 34–41.
- [24] Fleury. 2020. Medicina e Saúde. Manual de Diagnósticos: Investigação Diagnóstica dos Distúrbios Hemorrágicos.
- [25] P. Anbu, So Jae-Seong, Hui Byung-Ki, Yun Hyun-Shik, Organic solvent stable protease isolation and characterization from organic solvent tolerant strain of *Lysinibacillus sphaericus* PAP02, *Biologia* 71 (2016) 972–979, <https://doi.org/10.1515/BIOLOG-2016-0131>.
- [26] A.P. Wheeler, D. Gailani, The intrinsic pathway of coagulation as a target for antithrombotic therapy, *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 30 (5) (2016) 1099–1114, <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.05.007>.
- [27] A. Budzynski, Fibrinogen and fibrin: biochemistry and pathophysiology, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 6 (2) (1985) 97–146, [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(86\)80019-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(86)80019-1).
- [28] V. Miranda, J. Barbosa, R. Costa, A. Leite, V. Oliveira, J. Batista, L. Pastrana, T. Nascimento, A. Porto, Evaluation of partial thromboplastin time, thrombin time and prothrombin time over treated plasma using a fibrinolytic protease, *Res., Soc. Dev.* v. 11 (n. 2) (2022) e15311225439, <https://doi.org/10.33448/rsd.v11i2.25439>.
- [29] H. Choi, S.A. You-Seon, Fibrinolytic and Antithrombotic Protease from *Spirodelia polyrhiza*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* Volume 65 (2001) 781–786, <https://doi.org/10.1271/bbb.65.781>, 1 January 2001.
- [30] C. Lee, S. Kim, J. Song, Y. Lee, J. Sim, B. Hahn, Isolation and characterization of a halotolerant and protease-resistant α -galactosidase from the gut metagenome of *Hermetia illucens*, *J. Biotechnol.* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.05.003>.
- [31] M.M. Da Silva, T.A. Rocha, D.F. de Moura, C.A. Chagas, F.C.A. de Aguiar Júnior, N. P. da Silva Santos, A.L.F. Porto, Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilisimus* UCP 1262: an histomorphometric, genotoxic and cytological approach, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.02.009>.
- [32] Y. Zhou, H. Chen, B. Yu, G. Chen, Z. Liang, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from marine *Bacillus velezensis* Z01 and assessment of its therapeutic efficacy in vivo, *Microorganisms* 2022 10 (2022) 843, <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050843>.
- [33] C. O'Fáin, Protein stability: enhancement and measurement, *Methods Mol. Biol.* 1485 (2016) 101–129, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_7.
- [34] Chemical Engineering Science. Volume 80, 1 October 2012, Pages 435–450. Chemical Engineering Science. Model-based characterization of operational stability of multimeric enzymes with complex deactivation behavior: An in-silico investigation, Matthias Bechtold, Sven Pankas. 2012. DOI: 10.1016/j.ces.2012.05.030..
- [35] R. Love, Studies on protein denaturation in frozen fish. III—the mechanism and site of denaturation at low temperatures, *J. Sci. Food Agric.* 9 (9) (1958) 609–617, <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740090913>.
- [36] M. Levi, M. Levi, Hemostasis and thrombosis in extreme temperatures (hypo- and hyperthermia), *Semin. Thromb. Hemost.* 44 (07) (2018) 651–655, <https://doi.org/10.1055/s-0038-1648231>.
- [37] C. Jones, Circular dichroism of biopharmaceutical proteins in a quality-regulated environment, *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114945>.
- [38] P. García-Gutiérrez, M. Camarillo-Cadena, L. Vera-Robles, R. Zubillaga, A. Hernández-Arana, Circular dichroism spectroscopic assessment of structural changes upon protein thermal unfolding at contrasting pH: comparison with molecular dynamics simulations, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121039>.
- [39] F. Thakrar, A. Kikani, A. Sharma, S. Singh, Stability of alkaline proteases from haloalkaliphilic actinobacteria probed by circular dichroism spectroscopy, *Appl. Biochem. Microbiol.* 54 (6) (2018) 591–602, <https://doi.org/10.1134/S000368818100022>.
- [40] D. Dhamodharan, S. Jemimah, S. Merlyn, C. Subathra, Novel fibrinolytic protease producing *Streptomyces radiguganus* VITSD8 from marine sponges, *Marine Drugs* (2019), 10.3390/MD17030164.
- [41] N. Devchand, Virendra Arvad, K. Rathod, Ultrasound assisted production of a fibrinolytic enzyme in a bioreactor, *Ultrason. Sonochem.* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.ultrasonch.2014.04.020>.
- [42] Manourey, B., Roghianian, A., Sallénave, J. 2010. Serine and Cysteine Proteases and Their Inhibitors as Antimicrobial Agents and Immune Modulators. 27–50. DOI: 10.1007/978-3-0308-0157-7_2.
- [43] S. Kumar, P. Gupta, S. Mishra, V. Thinnagowda, V. Krishnan, P. Singh, A. Sachdev, A. Dabaja, Gamma irradiation, an effective strategy to control the oxidative damage of soy proteins during storage and processing, *Radiat. Phys. Chem.* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.109134>.
- [44] R. Costa, W. Albuquerque, M. Silva, R. Paula, M. Melo, M. Vilela, A. Porto, Can γ -radiation modulate hemagglutinating and anticoagulant activities of Ppy11, a lectin from *Phaseolus pyramidalis*? *Int. J. Biol. Macromol.* v. 104 (2017) 125–136, <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.06.007>.
- [45] H. El-Belagi, O. Ahmed, W. El-Desouky, Effect of low doses irradiation on oxidative stress and secondary metabolites production of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus culture, *Radiat. Phys. Chem.* v. 80 (2011) 968–976, <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.05.002>.
- [46] M. Pervan, Kessuke, S. Iwamoto, H., McBrice William, Proteasome structures affected by ionizing radiation, *Mol. Cancer Res.* (2005) 381–390, 310.1158/1541-7786.MCR-05-0032.
- [47] E.S., Kempner. 1993. Novel predictions from radiation target analysis. *Trends in Biochemical Sciences*, DOI: 10.1016/0968-0004(93)90169-N.

- [48] K. Sharmistha, D. Ayan, Understanding the reactivity of $\text{CO}_2^{\cdot-}$ and $\text{NO}_2^{\cdot-}$ radicals toward S-containing and aromatic amino acids, *J. Phys. Chem. B* (2017), <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.7B05186>.
- [49] N. Annamalai, M.V. Rajeswari, S.K. Sahu, T. Balasubramanian, Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability, *Process Biochem.* (2014), <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.007>.
- [50] P. Mahakhan, P. Aphaiso, K. Srisanthorn, K. Vichitphan, S. Vichitphan, S. Punyapap-path, J. Sawasangkaew, Alkaline protease production from *Bacillus ginseng* 6B515-4 using dairy effluent and its characterization as a laundry detergent additive, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2022), <https://doi.org/10.4014/jmb.2210.10007>.
- [51] J. Gomes, I. Rosa, T. Nascimento, C. Souza-Motta, E. Gomes, M. Roscolo, K. Moreira, M. Plutado, R. da Silva, Biochemical and thermodynamic characteristics of a new serine protease from *Mucor subellissinus* URM 4133, *Biotechnol. Rep. (Amst.)* 28 (2020) e00552, <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00552>.
- [52] T.P. Silverstein, Enzyme free energy diagrams: enzyme-substrate binding is always spontaneous, *J. Chem. Educ.* 98 (3) (2021) 1049–1051, <https://doi.org/10.1021/ACS.JCHEMED.0C01870>.
- [53] H.D. Holanda, F.M. Netto, Recovery of components from shrimp (*Litopenaeus setiferus*) processing waste by enzymatic hydrolysis, *J. Food Sci.* v. 71 (n. 5) (2006) 298–303, <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00040.x>.
- [54] L. Kurozawa, K. Park, M. Hubinger, Influência das condições de processo na cinética de hidrólise enzimática de carne de frango, *Ciência e Tecnol. De Aliment.* v. 29 (2008) 557–566, <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000300017>.

CAPÍTULO 5

ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS MICROBIANAS COMO ABORDAGEM PROMISSORA PARA DISTÚRBIOS TROMBOEMBÓLICOS

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso¹

Maria Clara do Nascimento²

Celso Lucas Gomes da Silva³

Diva Maria Izabel de Oliveira Silva Melo⁴

Kétura Rhammá Cavalcante Ferreira⁵

Juanize Matias da Silva Batista⁶

Thiago Pajeú Nascimento⁷

Ana Lúcia Figueiredo Porto⁸

DOI: 10.46898/rfb.9786558895886.5

¹ Centro de Biociências - CB. Universidade Federal de Pernambuco

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

³ Centro de Biociências - CB. Universidade Federal de Pernambuco

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

⁵ Centro de Biociências - CB. Universidade Federal de Pernambuco

⁶ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁷ Campus Professora Cinobelina Elvas - Universidade Federal do Piauí

⁸ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

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.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares representam um grupo significativo de problemas de saúde que afetam o coração e os vasos sanguíneos, sendo responsáveis por muitos óbitos em todo o mundo. Entre as complicações mais graves associadas a essas condições está a trombose, caracterizada pela formação de coágulos sanguíneos em vasos sanguíneos, que podem resultar em acidentes vasculares cerebrais (AVC) e infartos do miocárdio (BENJAMIN *et al.*, 2018).

Atualmente, existem diversos tratamentos disponíveis para enfrentar a trombose, incluindo anticoagulantes, drogas antiplaquetárias, agentes fibrinolíticos e procedimentos cirúrgicos. No entanto, o valor desses medicamentos pode ser muito alto, segundo Denardin, Borba & Mendes (2021), o custo do tratamento para tromboembolismo venoso usando anticoagulantes de via oral por 90 dias pode chegar até US\$249,00 ou aproximadamente R\$1.300,00. O desenvolvimento de novos tratamentos e terapias mais eficazes é de suma importância, buscando maior qualidade de vida aos pacientes e ampliar o acesso a medicação (ADIVITIYA & KHASA, 2017).

Neste contexto, as proteases de origem microbianas surgem como uma inovação terapêutica promissora para o tratamento da trombose. Essas enzimas, produzidas por microrganismos como bactérias, microalgas e fungos filamentosos, têm mostrado grande potencial para dissolver coágulos sanguíneos de forma eficaz e segura (KUMAR *et al.*, 2019). Embora já existam proteases fibrinolíticas sintéticas ou de origem animal disponíveis no mercado, a busca por alternativas mais específicas, seguras e acessíveis continua a crescer. Uma das fontes promissoras dessas enzimas são os microrganismos, que têm se destacado pela produção de proteases fibrinolíticas de alta estabilidade térmica e de pH, além de maior eficácia e menor risco de efeitos colaterais. A utilização dessas proteases produzidas por microrganismos oferece benefícios econômicos e sustentáveis uma vez que são facilmente produzidos em larga escala e podem utilizar resíduos agroindustriais como substrato, além de evitar riscos de contaminação por agentes patogênicos (CHILAKAMARRY *et al.*, 2021). A contínua investigação nesta área pode levar a avanços importantes na medicina cardiovascular, oferecendo novas esperanças para a prevenção e tratamento de distúrbios tromboembólicos (BAJAJ *et al.*, 2014). Desta forma, este capítulo aborda os mecanismos hemostáticos

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

da circulação sanguínea e os problemas que podem atrapalhar esses mecanismos, bem como algumas das terapias emergentes que usam metabólitos de microrganismos para este fim.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Cascata de coagulação

A cascata de coagulação é um mecanismo importante na hemostasia, e diversos transtornos são derivados de dificuldades em seu processo. A coagulação é dividida na formação de fibrina, função plaquetária, fibrinólise e anticoagulantes naturais. O processo de formação de fibrina na cascata de coagulação consiste em uma série de reações enzimáticas projetadas para amplificar o efeito do trauma inicial na formação de um tampão. Durante a lesão vascular, o sistema de coagulação é ativado e resulta na conversão do fibrinogênio em fibrina que é insolúvel e forma uma rede tridimensional que estabiliza o coágulo sanguíneo, essa ação é mediada pela Trombina (TANAKA & DAVIE, 2008; MOSESSON, 2005).

Em contrapartida, 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) (DELOUGHERY, 2019).

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, como a Antitrombina III (AT III), que inibe a ação da trombina, Proteína C e Proteína S, que inativam os fatores V e VIII, diminuindo a formação de trombina, Inibidor da

via do contato que inibe a ativação do fator XII e Heparina que atua como um anticoagulante por meio da inibição direta da trombina e do fator Xa (BLOMBÄCK & ANTOVIC, 2010).

Uma vez que é um evento complexo e dependente de várias etapas e fatores, diversos problemas podem surgir na cascata de coagulação, resultando em distúrbios hemorrágicos e trombóticos. A compreensão desses processos é fundamental para o desenvolvimento de novas terapias para tratamento desses distúrbios.

2.2. Doenças Cardiovasculares e Trombose

As doenças cardiovasculares são um grupo de condições que afetam o coração e os vasos sanguíneos. Elas incluem aterosclerose, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e arritmias cardíacas. Essas doenças podem ser causadas por vários fatores, incluindo estilo de vida, como dieta pouco saudável, falta de exercício físico, tabagismo e estresse crônico. São um fator importante de saúde pública tanto no Brasil quanto no mundo, e dados epidemiológicos apontam que elas são a principal causa de morte em diversos países, incluindo o Brasil. 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, registros do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde indicam que em 2021 foram registrados 382.507 óbitos atribuídos a doenças cardiovasculares, sendo dessas 74.770 de pessoas acima dos 60 anos (DATASUS, 2021). A Organização Mundial de Saúde (OMS) prevê que no ano de 2030 ocorrerão cerca de 22,2 milhões de mortes no mundo por causas associadas a essas doenças (OMS, 2016), tendo em vista que esses dados estão sempre

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

aumentando. Segundo Oliveira *et al.* (2021), a prevalência de doenças cardiovasculares no Brasil aumentou cerca de 24% de 1990 até 2019, os mesmos autores reforçam que doenças cardiovasculares são responsáveis por quase um terço das mortes no Brasil e afeta desproporcionalmente o estrato mais vulnerável da população, que tem grande dificuldade no acesso a cuidados de saúde de alta qualidade.

Uma das complicações mais graves das doenças cardiovasculares é a trombose, que é a formação de um coágulo de sangue em um vaso sanguíneo. 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. 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 & GINSBURG, 2023).

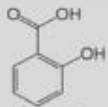
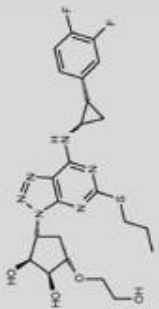
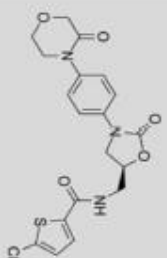
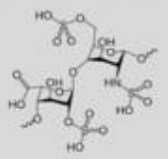
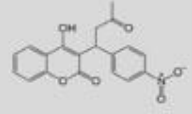
2.3. Biofármacos no Tratamento de Trombose

A trombose é uma condição médica que pode levar a graves consequências, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Existem diversos tipos de tratamentos disponíveis para tratar a trombose, dependendo da gravidade da condição e da saúde geral do paciente, incluindo anticoagulantes, drogas antiplaquetárias, agentes fibrinolíticos e procedimentos cirúrgicos (SHI & DOWELL, 2017).

Um dos tratamentos mais comuns é o uso de antiagregantes plaquetários, como o ácido acetilsalicílico (Figura 1), que funciona impedindo que as plaquetas se aglomerem e formem coágulos de sangue, o que reduz o risco de trombose. No entanto, os antiagregantes plaquetários podem ter efeitos colaterais, como dor abdominal e

úlceras no estômago, além disso. Outra opção de tratamento para a trombose é a trombólise, que envolve o uso de medicamentos para dissolver coágulos de sangue. Esse tipo de tratamento é geralmente utilizado em casos graves de trombose, como trombose venosa profunda ou trombose pulmonar. A trombólise é eficaz, mas também pode ter efeitos colaterais, como sangramento excessivo (SHI & DOWELL, 2017).

Figura 1. Algumas drogas utilizadas como tratamento da trombose.

ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA	ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE TROMBINA	ANTAGONISTA DE VITAMINA K	ANTAGONISTA DO FATOR Xa
 ÁCIDO ACETILSALICÍLICO	 BIVALIRUDINA	 VARFARINA	 RIVAROXABANA
 HEPARINA		 ACENOCUMAROL	

Fonte: autores (2023).

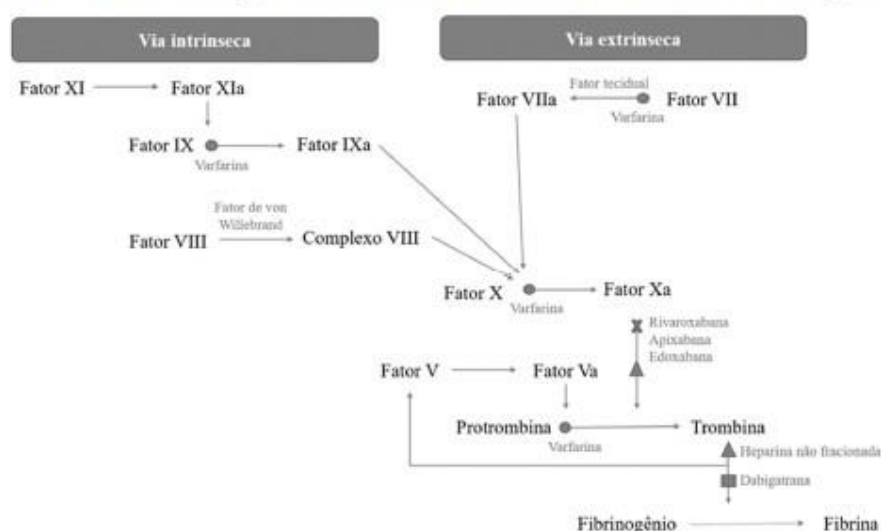
Em casos graves, pode ser necessário recorrer à cirurgia para tratar a trombose. A cirurgia é geralmente utilizada em casos em que o coágulo de sangue é grande ou em que a trombose é causada por uma anomalia física. Embora a cirurgia possa ser eficaz, ela também pode ser invasiva e pode ter um tempo de recuperação prolongado, por tanto o uso de agente anti-trombolíticos são mais indicados, especialmente em casos mais complexos, como trombose arterial infantil (RIZZI & ALBISETTI, 2018).

Rotineiramente, o tratamento da trombose pode ser feito por meio de biofármacos com funções de antagonistas do receptor da trombina (como bivalirudina), antagonistas da vitamina K (varfarina e a acenocumarol), antagonistas do fator Xa (rivaroxabana, apixabana

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

e edoxabana), heparina e ácido acetilsalicílico funcionando como antiagregante plaquetário (Figura 1) (INTAGLIATA, CALDWELL & TRIPODI, 2019). Um esquema dos pontos de ações dos fármacos mencionados pode ser observado na Figura 2.

Figura 2. Cascata de coagulação com os locais de ação de fármacos anticoagulantes.



Fonte: autores (2023).

A busca por novos fármacos no desenvolvimento de tratamentos para a trombose tem sido uma área de grande interesse e investimento na indústria farmacêutica e na comunidade científica. Pesquisadores estão buscando identificar alvos específicos envolvidos no processo de formação de coágulos sanguíneos, como proteínas e enzimas, para desenvolver medicamentos que atuem de forma mais direcionada e eficaz na prevenção e dissolução dos coágulos (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2019). A introdução de enzimas fibrinolíticas como novos fármacos para o tratamento da trombose é uma abordagem promissora e tem sido estudada em pesquisas científicas. Essas enzimas podem ser utilizadas para recanalizar rapidamente um vaso sanguíneo obstruído por um trombo, restaurando o fluxo

sanguíneo normal e prevenindo complicações sérias, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (KUMAR & SABU, 2019).

É importante ressaltar que o tratamento da trombose é individualizado, e as decisões terapêuticas devem ser tomadas por um médico com base na avaliação clínica completa do paciente. O tratamento adequado e precoce é fundamental para prevenir complicações graves (LUTSEY, 2023).

2.4. Proteases Fibrinolíticas Microbianas na Inovação Terapêutica Para A Trombose

Enzima fibrinolítica vem oferecendo uma opção mais segura que medicamentos disponíveis no mercado, com menos efeitos colaterais e menores risco de sangramento excessivo (ALTAF, WU & KASIM, 2021). Tais enzimas atuam como ativadores do plasminogênio tecidual (tPA) ou ativadores do plasminogênio (PA) podendo ser amplamente utilizadas na terapia trombolítica (BAJAJ *et al.*, 2014). Elas são classificadas em primeira geração (onde possuem menos especificidade pela fibrina e mais predisposição a complicações por sangramento durante o tratamento), segunda geração (com maior especificidade a fibrina e menor possibilidade de sangramento) e terceira geração (com seletividade a fibrina, meia vida maior possibilitando tratamento com dose única e tempo de depuração renal prolongado).

As enzimas produzidas por microrganismos têm uma série de benefícios importantes em diversas áreas, incluindo aplicações na saúde. Dentre os principais benefícios, estão: produção econômica (microrganismos podem ser cultivados em grandes quantidades e de maneira econômica), alta atividade e especificidade (algumas enzimas produzidas por microrganismos possuem uma atividade catalítica muito alta, o que significa que elas podem acelerar reações químicas em larga escala) e versatilidade (microrganismos podem ser modificados

geneticamente para produzir enzimas específicas ou aprimoradas para atender a necessidades específicas de aplicação) (FASIM, MORE & MORE, 2021).

Algumas enzimas produzidas por microrganismos têm aplicações terapêuticas, que podem ser usadas para dissolver coágulos sanguíneos indesejados em pacientes com trombose. Diversos microrganismos são capazes de produzir enzimas fibrinolíticas, tais como estreptoquinase, que pode ser produzida, por exemplo, por *Streptococcus hemolyticus* (BANERJEE *et al.*, 2004) que age como ativador de plasminogênio de primeira geração e apresenta vantagens devido ao seu baixo custo em comparação com outros ativadores de plasminogênio de segunda e terceira geração (ADIVITIYA, 2017).

Semelhantemente, a Nattoquinase, enzima fibrinolítica extraída e purificada de uma soja fermentada japonesa por *Bacillus subtilis* var. natto (WENG *et al.*, 2017), Bafibrinase, produzida por *Bacillus* sp. (MUKHERJEE *et al.*, 2012), Estafiloquinase (SAK, EC 3.4.99.22), um agente fibrinolítico de terceira geração produzido por *Staphylococcus aureus* sendo liberado extracelular, facilitando sua recuperação (ALZHRANI & 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, a uroquinase tem uma especificidade mais elevada para a fibrina do que a estreptoquinase, uma vez que a uroquinase atua na conversão do plasminogênio em plasmina, mas também se liga diretamente à fibrina, o que aumenta sua seletividade e diminui a probabilidade de efeitos colaterais. Por outro lado, a estreptoquinase não possui essa

afinidade pela fibrina, o que pode resultar em uma atividade fibrinolítica mais ampla, entretanto, maior risco de sangramento (WANG *et al.*, 2023). Desta forma, há necessidade de desenvolvimento de proteases mais específicas, com menor risco de efeitos colaterais e que sejam mais acessíveis economicamente, ampliando as opções no mercado e consequentemente, a acessibilidade (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Dentre os fungos filamentosos, o *Mucor subitillissimus* tem se destacado como um produtor promissor de proteases fibrinolíticas. 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 (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Já entre as bactérias, podemos citar *Bacillus cereus* e *Bacillus subtili* como potenciais produtoras de enzima fibrinolítica (SYAHBANU *et al.*, 2020). E entre as microalgas, *Chlorella vulgaris* desponta como fonte promissora (COSTA E SILVA, *et al.* 2018).

3. CONCLUSÃO

As doenças cardiovasculares representam um grave problema de saúde em nível mundial, sendo responsáveis por um grande número de óbitos a cada ano. Atualmente, o tratamento da trombose inclui diversas opções, como anticoagulantes, drogas antiplaquetárias e procedimentos cirúrgicos, porém, essas terapias podem ser onerosas e apresentar efeitos colaterais indesejados. Diante desse cenário, as proteases fibrinolíticas de origem microbiana surgem como uma inovação terapêutica promissora para o tratamento da trombose. Essas enzimas têm mostrado grande potencial para dissolver coágulos sanguíneos de forma eficaz e segura, oferecendo benefícios econômicos e sustentáveis. A produção dessas enzimas por microrganismos

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

permite sua obtenção em larga escala e o uso de resíduos agroindustriais como substrato, tornando o processo mais acessível e ambientalmente amigável. Sendo assim, a utilização de proteases fibrinolíticas microbianas como tratamento da trombose pode representar uma importante alternativa terapêutica, contribuindo para a melhoria da saúde cardiovascular e o bem-estar da população em geral.

4. REFERÊNCIAS

ADIVITIYA, & KHASA, Y. P. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. **Bioengineered**, 8(4), 331-358. 2017. doi: 10.1080/21655979.2016.1229718. PMID: 27696935. PMCID: PMC5553328.

ALTAF, F., WU, S., & KASIM., V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, 8, 680397. 2021. doi: 10.3389/fmolb.2021.680397.

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

BAJAJ, B. K., SINGH, S., KHULLAR, M., SINGH, K., & BHARDWAJ, S. Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 57(5), Sep-Oct. 2014. doi: 10.1590/S1516-8913201402132.

BENJAMIN, E. J., VIRANI, S. S., CALLAWAY, C. W., CHAMBERLAIN, A. M., CHANG, A. R., CHENG, S., ... MUNTNER, P. Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, 137(12), e67-e492. 2018. doi: 10.1161/CIR.0000000000000558. Epub 2018 Jan 31.

BLOMBÄCK, M., & ANTOVIC, J. P. (Eds.). **Essential Guide to Blood Coagulation** (1st ed.). Wiley-Blackwell. 2010.

CHANDRAMOHAN, M. *et al.* Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycooides* strain MA02 isolated from poultry slaughter house soils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101371, 2019.

CHILAKAMARR, C. R., SAKINAH, A. M. M., ZULARISAM, A. W., Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. **Biore-source Technology (Elsevier)**-Vol. 343, pp 126065. 2021.

DATASUS. Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

DELoughery, Thomas G. (Ed.). **Hemostasis and Thrombosis. Basic and Coagulation**. 1-9. 2019.

DENARDINI, I. C., BORBA, H. H., MENDESI, A. M. Oral anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism and non-valvular atrial fibrillation: a cost analysis **Rev Bras Farm Hosp Serv Saude**;12(1):0592. 2021.

FASIM, A.; MORE, V. S.; MORE, S. S. Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. **Current opinion in biotechnology**, v. 69, p. 68-76, 2021.

INTAGLIATA, N. M., CALDWELL, S. H., & TRIPODI, A. Diagnosis, Development, and Treatment of Portal Vein Thrombosis in Patients With and Without Cirrhosis. **Gastroenterology**, 156(6), 1582-1599.e1. 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2019.01.265. PMID: 30771355.

KATHIRVEL, D. *et al.*, Tenecteplase versus streptokinase thrombolytic therapy in patients with mitral prosthetic valve thrombosis. **Indian Heart Journal**, 70(4), 506-510. 2018. doi: 10.1016/j.ihj.2017.10.014.

KUMAR, S. S.; SABU, A. Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy. **Therapeutic enzymes: function and clinical implications**, p. 345-381, 2019.

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e outros

LINARDI, A. & SILVA, T. A. R. Fármacos que afetam as funções renais e cardiovasculares. In: LINARDI *et al.* **Farmacologia Essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 8, p. 269- 271. 2016.

LUTSEY, PL, Zakai NA. Epidemiologyandpreventionofvenousthromboembolism. **Nat RevCardiol**. 2023 Apr;20(4):248-262. doi: 10.1038/s41569-022-00787-6. Epub 2022 Oct 18. PMID: 36258120; PMCID: PMC9579604.

MOSESSON, M. W. **Fibrinogenandfibrinstructureandfunctions**. 2005. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x.

MUKHERJEE, A. K., RAI, S. K., THAKUR, R., CHATTOPADHYAY, P., & KAR, S. K. Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-actingfibrinolyticserine protease fromBacillus sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulantactivityandthrombolyticpotency. **Biochimie**, 94(6), 1300-1308. 2012. doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.027.

NASCIMENTO, T. P. *et al.*, Protease fromMucorsubtilissimus UCP 1262: Evaluationofseveralspecific protease activitiesandpurificationof a fibrinolyticenzyme. Anais da Academia Brasileira de Ciências | **AnnalsoftheBrazilianAcademyofSciences**, 92(4), e20200882. 2020. doi: 10.1590/0001-3765202020200882.

NISHANTH, K. R. *et al.*,Thrombolysiswithreteplase in acute pulmonaryembolism. **Indian Heart Journal**, 71(6), 464-467. 2019. doi: 10.1016/j.ihj.2019.09.011.

OLIVEIRA, G. M. M. & MESQUISA, C. T., Preface. **International-Journalof Cardiovascular Sciences** V. 34 N. 4. 2021 DOI: 10.36660/ijcs.20210185.

OMS. Organização Mundial da Saúde (OMS). **Relatório Mundial da Saúde 2019: Cobertura Universal de Saúde**. Genebra, 2019.

RIZZI, M., GOLDENBERG, N., BONDUEL, M., REVEL-VILK, S., AMANKWAH, E., & ALBISETTI, M. Catheter-Related Arterial

Thrombosis in Neonates and Children: A Systematic Review. **Thrombosis and Haemostasis**, 118(6), 1058-1066. 2018. doi: 10.1055/s-0038-1642635. PMID: 29695022.

SARTIM, M. C. Isolamento, caracterização bioquímica e funcional in vitro e in vivo de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação. 2014. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências). **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto.

SHI, W., & DOWELL, J. D. Etiology and treatment of acute inferior vena cava thrombosis. **Thrombosis Research**, 149, 9-16. 2017. doi: 10.1016/j.thromres.2016.07.010. PMID: 27865097.

SYAHBANU, F. *et al.*, Fibrinolytic bacteria of Indonesian fermented soybean: preliminary study on enzyme activity and protein profile. **Food Science and Technology International (Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos)**-Vol. 40, pp 458-465. 2020.

TANAKA, K., & DAVIE, E. W. (Eds.). **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis**. 2010.

WANG, Y. *et al.*, Tenecteplase versus alteplase in acute ischaemic cerebrovascular events (TRACE-2): a phase 3, multicentre, open-label, randomised controlled, non-inferiority trial. **The Lancet**, 401(10377), 645-654. 2023. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02600-9.

WEYAND, A. C., SHAVIT, J. A., GINSBURG, G., Disorders of Hemostasis and Thrombosis. **Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)** P. 173-211. 2023.

WENG, S. F., REPS, J., KAI, J., GARIBALDI, J. M., & QURESHI, N. Can machine-learning improve cardiovascular risk prediction using routine clinical data. **PLoS One**, 12(4), e0174944. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0174944. PMID: 28376093. PMCID: PMC5380334.