

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO (PROPESQI)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA PROVENIENTE DE ISOLADO DO ECÓTONO CAATINGA-CERRADO PIAUIENSE, OBTIDA ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE *Pritchardia pacifica*.

Recife, 2025

MARIA ERCILIA LIMA BARREIRO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA PROVENIENTE DE *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03), ISOLADO DO ECÓTONO CAATINGA-CERRADO PIAUIENSE, OBTIDA ATRAVES DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE *Pritchardia pacifica*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

Recife, 2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Barreiro, Maria Ercília Lima.

Purificação e caracterização de uma protease com atividade colagenolítica proveniente de *Trichoderma Koningiopsis* (UFPIT03), isolado do Ecótono Caatinga-Cerrado Piauiense, obtida através de fermentação em estado sólido utilizando farelo de *Pritchardia pacifica* / Maria Ercília Lima Barreiro. - Recife, 2025.
95f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2025.

Orientação: Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.
Inclui referências.

1. *Trichoderma*; 2. Colagenase; 3. Biofilme cicatrizante. I. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA ERCÍLIA LIMA BARREIRO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA PROVENIENTE DE *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03), ISOLADO DO ECÓTONO CAATINGA-CERRADO PIAUIENSE, OBTIDA ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO FARELO DE *Pritchardia pacifica*.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Orientador/Presidente)
Universidade de Pernambuco

Prof^a Ana Lúcia Figueiredo Porto (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

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

Prof^a. Dr^a. Alice Maria Gonçalves Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal do Piauí

Dr. Raphael Luiz Andrade Silva
Universidade de Pernambuco (Examinador Externo)

Recife, 2025

RESUMO

As proteases colagenolíticas possuem a capacidade de hidrolisar colágeno nativo e desnaturado, sendo amplamente utilizadas em diversos segmentos biotecnológicos e biomédicos. Dentre essas enzimas, as colagenases microbianas destacam-se por sua diversidade bioquímica e alta susceptibilidade à manipulação genética, com os gêneros *Streptomyces* e *Trichoderma* apresentando vantagens significativas devido à termoestabilidade e elevado rendimento. Este trabalho visou a purificação e caracterização de uma colagenase obtida de *Trichoderma* isolado do Ecótono Caatinga-Cerrado Piauiense, aliada ao desenvolvimento de um biofilme cicatrizante inovador formulado à base de um blend polissacarídico com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno. A produção enzimática foi realizada por fermentação em estado sólido, utilizando farelo de frutos de *Pritchardia pacifica* como substrato agroindustrial, evidenciando o potencial sustentável do processo. A enzima foi purificada por cromatografia de troca iônica aniônica em DEAE-Sephadex-50, apresentando temperatura ótima de 45°C, pH ótimo de 7,5 e estabilidade em diferentes condições de pH. Paralelamente, o biofilme foi desenvolvido utilizando quitosana e galactomanana (extraída de *Cassia grandis*) como matriz base. A formulação inclui bioativos obtidos de um processo de hidrólise enzimática envolvendo colágeno bovino Tipo IV e colagenase, associados a nanopartículas de prata sintetizadas por método verde. O biofilme resultante é biocompatível, biodegradável, hidrofílico e apresenta ação antibacteriana, além de potencial hipoalergênico, favorecendo a aceleração do processo cicatricial. Este produto apresenta aplicação promissora como curativo tópico de feridas e suporte para sistemas de liberação de drogas, reforçando o aproveitamento de recursos naturais e resíduos agroindustriais. O estudo destaca a integração de processos biotecnológicos e biomédicos, contribuindo para o fortalecimento da sustentabilidade e da inovação em saúde, indústria cosmética e biomateriais.

Palavras-chave: *Trichoderma*, colagenase, biofilme cicatrizante, nanopartículas de prata, sustentabilidade.

ABSTRACT

Collagenolytic proteases have the ability to hydrolyze both native and denatured collagen and are becoming increasingly important commercially. Collagenases produced by microorganisms are preferable to those produced by mammals or plants because of the biochemical diversity and susceptibility to genetic manipulation that their sources possess. The genera *Streptomyces* and *Trichoderma* have a great advantage among microorganisms that produce collagenolytic enzymes, since their genetic engineering has demonstrated great abilities in synthesizing these types of proteases, presenting characteristics of thermostability and higher yield. Collagenases have been described in their use in several biotechnology and biomedical segments, involving areas such as: medicinal, pharmaceutical, food, cosmetic and textile. The present study aimed to purify and characterize an enzyme with collagenolytic activity from *Trichoderma* isolated from the Caatinga-Cerrado-Piauiense's Ecotone and to develop a patented utility model from a healing biofilm product formulated based on a polysaccharide blend associated with silver nanoparticles with collagen hydrolysate. For the purification process, the enzyme production occurred by solid-state fermentation using *Pritchardia pacifica* fruit bran as an agroindustrial substrate, highlighting its sustainable biotechnological potential. The enzyme was purified by anionic ion exchange chromatography in DEAE-Sephadex, presenting ideal functional properties with an optimum temperature of 45°C, optimum pH of 7.5 and stability in different pH conditions. These results demonstrate the efficiency of the fermentation process using agroindustrial waste and the prospects for application in areas such as health, cosmetics industry and biomaterials, strengthening the valorization of regional natural resources.

Keywords: *Trichoderma*, collagenase, biotechnological potential, purification, biomedical application.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	8
CAPÍTULO 1	8
LISTA DE FIGURAS	9
REFERENCIAL TEÓRICO	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Protease	14
3.2 Colagenase e atividade colagenolítica	15
3.3 Fermentação em estado sólido (FES)	21
3.4 Substrato: <i>Pritchardia pacifica</i>	23
3.5 Isolamento de <i>Trichoderma</i> no écotono caatinga cerrado: fungo do gênero <i>Trichoderma</i>	25
3.6 Purificação e caracterização das enzimas	27
3.7 Estudo relacionados à aplicação futura	29
4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	30
CAPÍTULO 1 - Artigo	37
RESUMO	40
ABSTRACT	40
1. INTRODUÇÃO	41
2. METODOLOGIA	42
2.1 Obtenção das amostras	42
2.2 Parâmetros fermentativos	42
2.3 Processo de extração das proteases	42
2.4 Dosagem de proteínas	42
2.5 Atividade proteásica	43
2.6 Métodos de precipitação	43
2.7 Cromatografia de troca iônica	43
	6

2.8 Caracterização da protease purificada	43
2.8.1 Temperatura ótima e termoestabilidade	43
2.8.2 Efeito do pH na atividade da protease	43
2.8.3 Influência de Íons metálicos e surfactantes sob atividade enzimática	43
2.8.4 Efeito de inibidores na atividade	44
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
3.1 Produção de proteases por <i>Trichoderma koningiopsis</i> (UFPIT03)	45
3.2 Métodos de precipitação na purificação de proteases de <i>T. koningiopsis</i>	45
3.3 Purificação de proteases de <i>Trichoderma koningiopsis</i> (UFPIT03)	46
3.4 Caracterização da enzima purificada <i>Trichoderma koningiopsis</i> (UFPIT03)	48
3.4.1 Efeito do Ph na atividade de protease	49
3.4.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	49
3.4.3 Efeito dos íons metálicos na atividade da protease	50
3.4.4 Efeito de surfactantes e inibidores na atividade da protease	51
4. CONCLUSÃO	53
AGRADECIMENTOS	53
5. REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 2 - PATENTE	56
Campo da invenção	68
Fundamentos da invenção	68
Breve descrição dos desenhos	75
Descrição da invenção	75
Exemplos de concretização da invenção	78
REIVINDICAÇÕES	81
RESUMO	83
DESENHOS	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Aplicações de collagenases.....18

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Atividade enzimática de proteases de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) com ação colagenolítica utilizando farinha do fruto de *Pritchardia pacifica* como substrato. AP- Atividade Proteolítica; AC- Atividade Colagenolítica; AEP- Atividade Proteolítica Específica; AEC- Atividade Colagenolítica Específica; FPP – Fator de Purificação Protease; FPC - Fator de Purificação Colagenase; R- Rendimento.....45

Tabela 2. Atividade enzimática residual frente a íons metálicos (10mM).....50

Tabela 3. Atividade enzimática residual frente a surfactantes e inibidores (10mM).....51

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1.** Esquema de classificação de proteases baseado em sítio de atuação mecanismos de ação de relação estrutural.....15
- Figura 2.** Representação resumida de processo de degradação do colágeno por protease colagenolítica. [A] Estrutura tripla-hélice de colágeno; [B] Colagenase associando-se a molécula de colágeno para degradação; [C] Fibra de colágeno degradada e [D] Peptídeos e aminoácidos liberados pela ação de protease colagenolítica em fibra de colágeno “[C]”.....17
- Figura 3.** Técnicas de fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos20
- Figura 4.** Imagem da *Pritchardia pacifica*22
- Figura 5.** Frutos recém-coletados de *P. pacífica* com a coloração esverdeada (A), amarelada (B) e avermelhada (C).....23
- Figura 6.** Crescimento da cepa fúngica de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) em meio Batata Dextrose Ágar.....25

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Efeito do período de incubação na produção de protease pela cepa de *T. koningiopsis* (UFPIT03).....40
- Figura 2.** Cromatografia em resina para purificação da enzima oriunda do processo FES. (A) Cromatografia de troca iônica em QAE-sephadex. (B) Cromatografia de exclusão molecular em resina superdex-G75 Hr 10/300GL.....43
- Figura 3.** Curva de pH ótimo da protease de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03).....44
- Figura 4.** Curva de temperatura ótima e estabilidade após 6 horas da protease de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03).....45

CAPÍTULO

2

Figura 1. Fluxograma do processo de obtenção do produto descrito na presente patente.....79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FES	- Fermentação Estado Sólido
BDA	- Batata Dextrose Ágar
NaCl	- Cloreto de Sódio
HCl	-Ácido Clorídrico
NaOH	-Hidróxido de Sódio
ZnSO4	-Sulfato de Zinco
CuSO4	-Sulfato de cobre
CaCl2	-Cloreto de Cálcio
MgSo4	-Sulfato de Magnésio
KCl	-Cloreto de Potássio
TCA	-Ácido Tricloroacético
PMSF	-Fluoreto de fenilmetilsulfonil
EDTA	-Ácido etilenodiamino tetra-acético

1. INTRODUÇÃO

As enzimas, moléculas biocatalisadoras naturais, desempenham papéis essenciais nos processos bioquímicos dos organismos vivos. Seu estudo remonta ao final do século XVIII (NELSON; COX, 2014), e, desde então, elas vêm sendo amplamente aplicadas em diversos setores industriais, como têxtil, papel e celulose, alimentício, farmacêutico, veterinário, entre outros (SRIVASTAVA, MISHA & UPADHYAY, 2020). Essas moléculas podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, sendo as últimas destacadas pela facilidade de produção em larga escala e pela replicabilidade (SOUZA *et al.*, 2015).

Entre as enzimas de maior relevância comercial, as proteases colagenolíticas, capazes de hidrolisar colágeno nativo e desnaturado, têm ganhado destaque. Essas enzimas apresentam ampla aplicação em segmentos como medicina, cosméticos, alimentação e biotecnologia industrial (BHATTACHARYA *et al.*, 2019). Fontes microbianas de collagenases possuem vantagens significativas, como maior rendimento e menor tempo de produção, em comparação às fontes vegetais e animais (SOUZA *et al.*, 2015). Entre os micro-organismos produtores de enzimas, bactérias e fungos filamentosos destacam-se pela produção de enzimas hidrolíticas, como as proteases, devido à alta taxa de crescimento, capacidade de utilizar diversas fontes de nutrientes e eficiência no processo fermentativo (PARRADO *et al.*, 2014; WARD *et al.*, 2009).

A fermentação em estado sólido (FES) é uma estratégia promissora para a produção de enzimas, especialmente por permitir o uso de resíduos agroindustriais como substratos. Essa metodologia apresenta vantagens como baixo consumo de água, alta concentração de metabólitos e menor risco de contaminação bacteriana, além de favorecer o crescimento de fungos filamentosos (NOVELLI. *et al.*, 2016; CHILAKAMARRY *et al.*, 2022). Resíduos como farelo de soja, trigo, e até mesmo a borra de café, têm se mostrado substratos viáveis nesse contexto (CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020; ROCHA *et al.*, 2021).

Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Trichoderma* se destaca como uma fonte promissora de proteases, devido à sua capacidade de crescer em substratos sólidos, alta produção enzimática e aplicabilidade biotecnológica (WEISS, 2020). Este fungo é amplamente encontrado em ecótonos, como o Cerrado-Caatinga, onde a biodiversidade contribui para a descoberta de micro-organismos com potencial para produzir moléculas bioativas (SOUSA *et al.*, 2015). Além disso, *Trichoderma* é reconhecido mundialmente por seu uso em controle

biológico na agricultura, devido à sua ação no melhoramento do solo e na inibição de fitopatógenos (MORAIS *et al.*, 2022).

Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de colagenases, incluindo sua produção, isolamento e purificação utilizando o fungo *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) como microrganismo produtor por técnica de fermentação em estado sólido com farelo de frutos de *Pritchardia pacifica*, e a colagenase oriunda de *Streptomyces antibioticus* como agente cicatrizante.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial biotecnológico de colagenases em duas abordagens complementares: (1) promover a purificação e caracterização de uma protease com atividade colagenolítica produzida por um fungo filamentosos do gênero *Trichoderma*, obtida por fermentação em estado sólido utilizando farelo de frutos de *Pritchardia pacifica* como substrato; e (2) investigar a aplicação de uma colagenase proveniente de *Streptomyces antibioticus* na formação de um blend de filme polissacarídico, visando explorar suas propriedades funcionais e possíveis aplicações industriais.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir protease com ação colagenolítica por fermentação em estado sólido utilizando farelo de frutos de *Pritchardia pacifica*.
- Purificar a protease com ação colagenolítica por cromatografia de troca iônica.
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada quanto ao pH e temperatura ótima, estabilidade térmica, o efeito dos surfactantes, íons e inibidores.
- Desenvolver um biofilme cicatrizante com polissacarídeos, nanopartículas de prata e hidrolizado de colágeno.
- Avaliar o potencial biomédico e cosmético do biofilme desenvolvido.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PROTEASE

Proteases são hidrolases, ou seja, enzimas responsáveis pela catálise de reações hidrolíticas em ligações peptídicas resultando na liberação de peptídeos e aminoácidos (SHARMA *et al.*, 2018). Por serem enzimas altamente específicas possuem diversas particularidades e são classificadas e ordenadas de acordo com tal. Podem ser categorizadas de acordo com seu sítio de atuação, em endopeptidases, aquelas que clivam proteínas a partir do centro, e exopeptidases, aquelas que clivam ligações peptídicas presentes nos terminais da cadeia de carbonos da proteína (PHILIPPS-WIEMANN, 2018). Estas podem ainda ser categorizadas de acordo com o terminal a ser clivado, sendo Aminopeptidase (proteases que atuam no N-terminal da cadeia polipeptídica) e Carboxipeptidases (responsáveis pela clivagem e liberação de aminoácidos ou peptídeos no C-terminal) (GURUMALESH *et al.*, 2019) em geral, enzimas do mesmo tipo catalítico são inibidas pelos mesmos tipos de moléculas.

Proteases constituem o grupo de enzimas mais explorados comercialmente, uma vez que estas enzimas podem ser utilizadas nas mais diversas condições de temperatura e pH, ser potencialmente alteradas para ajuste de estabilidade e especificidade e possuem meia-vida maior que catalisadores químicos industriais (ADRIO; DEMAIN, 2014). Sua possibilidade de se ligar a um substrato em particular, juntamente a outras propriedades relacionadas acima permitem as proteases aplicabilidade em setores industriais como alimentício atuando principalmente na alteração/correção da textura e aparência de alimentos, na indústria do processamento do couro e têxtil em geral, em processos de biorremediação, recuperação de íons metálicos e na área farmacêutica e medicinal onde estão presentes na fabricação de medicamentos, agentes tópicos, kits para diagnóstico entre vários outros (RAO *et al.*, 1998; MARTINEZ-MEDINA *et al.*, 2019; BAJAJ *et al.*, 2013). Este último caso merece atenção pois requer grau de pureza, especificidade e eficiência elevados, em relação a outros setores industriais.

Proteases são biocatalisadores valiosos, amplamente empregadas em diversos setores industriais principalmente devido a sua diversidade bioquímica, facilidade quanto de

manipulação e especificidade (CLERICI *et al.*, 2021). Proteases com capacidade de degradar o colágeno, por exemplo, podem ser utilizadas na indústria do couro, alimentícia e farmacêutica (BHAGWAT & DANDGE, 2018). Além disso, peptídeos de colágeno ainda podem ser empregados na fabricação de fármacos, hidratantes, suplementos, agentes antimicrobianos, entre outros (YAGODA *et al.*, 2014).

Enzimas proteolíticas podem ainda ser categorizadas quanto a sua especificidade, ou mecanismo de ação, definido por características estruturais de seu sítio ativo ou ainda posição de resíduo e/ou ligante metálico. Desta forma são agrupadas em serina, aspártico, cisteína, glutâmico, treonina ou metalo proteases (YIKE, 2011). Outro fator importante em relação à classificação das proteases são as relações estruturais, também relacionadas a seu mecanismo de ação destas proteases (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Um resumo das classificações de enzimas proteolíticas e seus mecanismos de ação podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1. Esquema de classificação de proteases baseado em sítio de atuação, mecanismos de ação de relação estrutural.



Fonte: SRIVASTAVA; MISHRA P.K UPADHYAY. (2020), adaptado

3.2 COLAGENASE E ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA

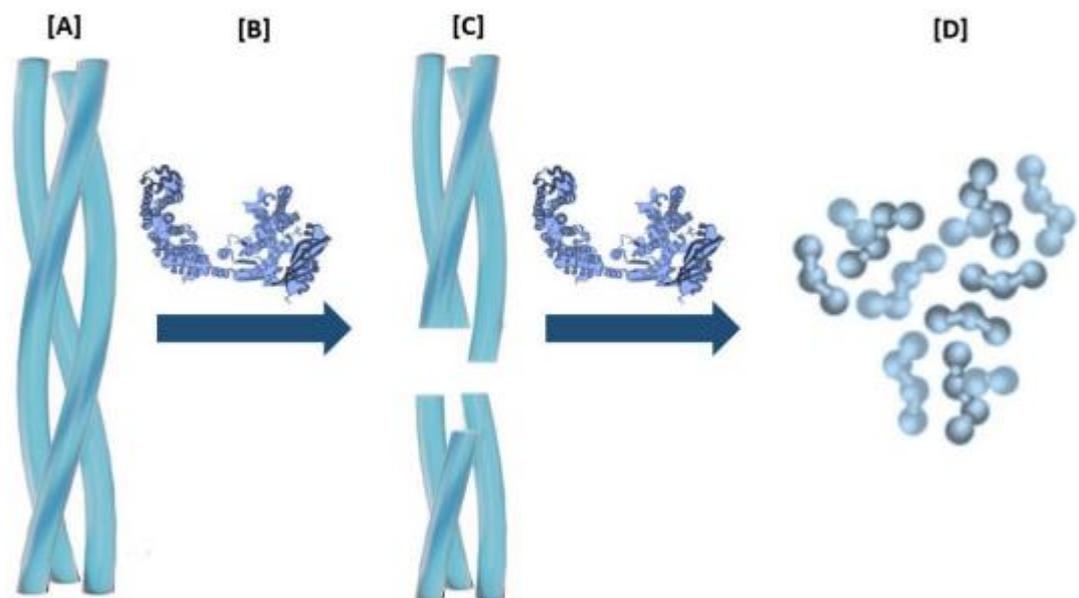
Colagenases são proteases responsáveis pela clivagem do colágeno, tanto nativo quanto desnaturado, atuando assim na manutenção de tecidos e órgãos (OLIVEIRA, 2017), uma representação da clivagem do colágeno pode ser observada na figura 2. Além da produção de peptídeos, proteases com ação colagenolítica também são empregadas diretamente na indústria, em processos de cicatrização, de epitelização por debridamento e degradação de placas fibrosas formadas por enfermidades como doença de Peyronie (JORDAN, 2008). Podem ainda funcionar como bio-restauradores atuando na remoção de resíduos orgânicos (BHAGWAT; DANDGE, 2018), na indústria alimentícia atuando como amaciantes em carnes e diminuindo as chances de contaminação microbiana, e na indústria têxtil como amaciante de couro, facilitando a penetração de corante (BHAGWAT *et al.*, 2016; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Colágeno e peptídeos de colágeno são biomateriais de grande interesse industrial. Estão associados à indústria alimentícia, farmacêutica, e de cosméticos, estando presente em vários outros produtos vinculados à área da saúde humana e animal. Na literatura é possível encontrar uso de peptídeos de colágeno em imunoterápicos (GAO, 2019), tratamento de hipertensão (ZHUANG *et al.*, 2012), fabricação de hidratantes e cosméticos relacionados à desaceleração do fotoenvelhecimento (YAGODA; GUNS, 2014), alimentação parenteral (USAMAH, 2019), tratamento de úlceras (YAMANAKA, 2017), atividade antimicrobiana (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011) anticâncer e antioxidante (NASRI, 2019). A produção destes peptídeos biologicamente ativos é realizada a partir de hidrólise enzimática, sendo assim é notório o interesse em pesquisas por enzimas capazes de degradar o colágeno.

Colagenases podem ser obtidas a partir de fonte animal, vegetal ou microbiana. Dentre as colagenases de origem animal, destacam-se os subprodutos do pescado, especialmente a nível de fígado, estômago, intestino, cecos pilóricos, pâncreas, hepatopâncreas e gordura mesentérica (OLIVEIRA, 2017). Já em plantas, proteases colagenolíticas são comuns nas espécies *Ficus carica* e *Zingiber officinale* (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Devido a seu complexo sistema que restringe a atividade a sítios específicos do colágeno e aos custos de produção e manutenção, há predileção por colagenases provenientes de microrganismos (WANDERLEY, 2017).

Colagenases de origem microbiana são menos específicas, capazes de degradar colágeno em mais de um local (WANDERLEY, 2017). Atualmente o microrganismo responsável pela maior produção de colagenase a nível industrial é *Clostridium sp.*, entretanto sua natureza patogênica e produção de toxinas pode limitar a aplicação das enzimas (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Dentro desta perspectiva, o uso de metodologias de purificação é uma etapa crucial para o emprego destas enzimas na indústria, especialmente no campo da saúde e alimentação (NELSON; COX, 2014). Ainda assim, proteínas colagenolíticas obtidas a partir de microrganismos apresentam vantagens em relação àquelas provenientes de animais ou plantas, uma vez que apresentam alto rendimento, maior produtividade, e facilidade no controle das condições de produção (BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Figura 2. Representação resumida de processo de degradação do colágeno por protease colagenolítica. [A] Estrutura tripla-hélice de colágeno; [B] Colagenase associando-se a molécula de colágeno para degradação; [C] Fibra de colágeno degradada e [D] Peptídeos e aminoácidos liberados pela ação de protease colagenolítica em fibra de colágeno “[C]”.



Fonte: Bhagwat & Dandge (2021), adaptado.

Colagenases são encontradas em diversos organismos, todavia, microrganismos são notórios quanto a produção para aplicação industrial, devido a facilidade para produção em larga escala, de manipulação genética, e a sua diversidade bioquímica, sendo capazes de produzir proteases com alto rendimento e características que facilitam seu emprego nas mais variadas áreas (RAO *et al.*, 1998; DUARTE *et al.*, 2001). Além disso, dentre os microrganismos produtores de proteases as bactérias aparecem em evidência por demonstrarem especificidade mais ampla, além de poder degradar colágeno nativo e desnaturado, ampliando sua eficiência e aplicação (ALIPOUR *et al.*, 2016). *Clostridium* sp. foi a primeira conhecida pela produção de colagenase, sendo conhecida na literatura por até seis metalo-endopeptidase capazes de agir sobre o colágeno nativo isoladas a partir da sua fermentação, fazendo deste um dos gêneros mais estudados (HARAZONO *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018). Entretanto sua natureza patogênica limita a aplicação industrial da enzima, especialmente no ramo farmacêutico e/ou biomédico, uma vez que a liberação de toxinas por este microrganismo é não só um risco, mas também impõe a necessidade de maiores etapas de purificação, aumentando os custos do processo. Desta forma, são investigadas alternativas não patogênicas ou menos patogênicas capazes de produzir colagenases com eficiência e de maneira econômica (BHAGWAT; DANDGE, 2019). Outros gêneros em destaque são *Pseudoalteromonas* sp., que embora também seja considerada patogênica apresentou produção de colagenase capaz de degradar colágenos Tipo I e gelatina (BHATTACHARYA *et al.*, 2019); *Bacillus* sp. também tem ganhado espaço na indústria, já sendo considerado um dos gêneros que mais contribuem com a produção industrial de colagenase (SONG *et al.*, 2021) e *Streptomyces* sp. (HARAZONO *et al.*, 2020; SARKAR, G., SUTHINDHIRAN, K., 2020).

3.2.1 Aplicações Biotecnológicas de Colagenases: Da Purificação ao Uso Industrial em Saúde, Cosméticos, Alimentos e Sustentabilidade

As colagenases, enzimas capazes de degradar colágeno, têm despertado grande interesse biotecnológico devido à sua versatilidade e amplo espectro de aplicações. Na área da saúde,

essas enzimas são utilizadas no tratamento de feridas, queimaduras e úlceras, atuando na remoção de tecidos necrosados e promovendo a cicatrização (RAMOS et al., 2019). Além disso, têm sido empregadas em procedimentos dermatológicos, como peelings enzimáticos, e em pesquisas de medicina regenerativa, onde a degradação controlada de colágeno é essencial para a reconstrução tecidual (SMITH et al., 2017). Na indústria de cosméticos, as collagenases são incorporadas em produtos antienvelhecimento e esfoliantes, contribuindo para a renovação celular e a melhoria da elasticidade da pele (KIM et al., 2019; GONZALEZ et al., 2020).

Além das aplicações em saúde e cosméticos, as collagenases também desempenham um papel importante em outras indústrias. Na área de alimentos, são utilizadas no processamento de carnes para amaciamento e na clarificação de bebidas, como sucos e vinhos (SANTOS et al., 2019; FERNANDES et al., 2020). Na indústria têxtil, essas enzimas são aplicadas no biopolimento de tecidos e na degradação de resíduos de couro, oferecendo uma alternativa sustentável para processos industriais (SILVA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020). Essas diversas aplicações destacam o potencial das collagenases como ferramentas biotecnológicas valiosas, capazes de contribuir para avanços em múltiplos setores.

Tabela 1: Aplicações de Collagenases

Indústria	Aplicação	Referência
Indústria de Saúde e Medicina		
	Tratamento de feridas, queimaduras e úlceras.	RAMOS, T. M. et al. Collagenase-based enzymatic debridement: a promising strategy for wound healing. <i>Journal of Wound Care</i> , v. 28, n. 5, p. 320-328, 2019.
	Peeling enzimático em procedimentos dermatológicos	LEE, J. H. et al. Enzymatic peeling with collagenase: a novel approach for skin rejuvenation. <i>Dermatologic Surgery</i> , v. 45, n. 6, p.

		803-810, 2019.
	Medicina regenerativa e reconstrução tecidual	SMITH, A. R. et al. Controlled collagen degradation in tissue engineering: applications of collagenase in regenerative medicine. <i>Biomaterials</i> , v. 120, p. 1-12, 2017.
Indústria de Cosméticos		
	Produtos antienvelhecimento e renovação celular	KIM, S. Y. et al. Collagenase in anti-aging cosmetics: mechanisms and applications. <i>Journal of Cosmetic Dermatology</i> , v. 18, n. 4, p. 1120-1128, 2019.
	Esfoliantes enzimáticos	GONZALEZ, M. et al. Enzymatic exfoliation using collagenase: a gentle approach for skin renewal. <i>International Journal of Cosmetic Science</i> , v. 41, n. 3, p. 245-253, 2020.
	Tratamentos capilares	LIMA, C. R. et al. Collagenase-based treatments for hair fiber repair and strengthening. <i>Journal of Cosmetic Science</i> , v. 71, n. 2, p. 89-97, 2021.
Indústria de Alimentos		

	Amaciamento de carnes	SANTOS, R. et al. Application of collagenase in meat tenderization: a review. <i>Food Chemistry</i> , v. 270, p. 466-474, 2019.
	Clarificação de bebidas	FERNANDES, P. et al. Enzymatic clarification of fruit juices using collagenase: optimization and effects on quality. <i>Food and Bioprocess Technology</i> , v. 13, n. 5, p. 789-798, 2020.
Indústria Têxtil		
	Bio-polimento de tecidos	SILVA, M. et al. Enzymatic bio-polishing of denim using collagenase: a sustainable approach. <i>Textile Research Journal</i> , v. 90, n. 15-16, p. 1805-1814, 2020.
	Degradação de resíduos de couro	OLIVEIRA, T. et al. Collagenase in leather processing: an eco-friendly alternative for waste management. <i>Journal of Cleaner Production</i> , v. 250, p. 119-128, 2020.
Indústria de Biodegradação e Meio Ambiente		
	Degradação de resíduos proteicos	MARTINS, L. et al. Collagenase in biodegradation of collagenous waste: applications in recycling and environmental sustainability. <i>Waste</i>

		<i>Management</i> , v. 105, p. 467-475, 2020.
Indústria de Pesquisa e Desenvolvimento		
	Estudos bioquímicos e biotecnológicos	CARVALHO, A. et al. Collagenase in biotechnology: mechanisms and industrial applications. <i>Enzyme and Microbial Technology</i> , v. 130, p. 109-118, 2020.

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

Um dos principais fatores que devem ser levados em consideração na produção de proteases por microrganismos é o tipo de fermentação adotada. Ao avaliar qual a melhor abordagem deve-se levar em consideração o microrganismo a ser utilizado e a molécula de interesse. Posto isto, a Fermentação em Estado Sólido (FES), tem enorme potencial do ponto de vista ecológico e econômico. Sendo a principal característica desta técnica o crescimento do microrganismo em substratos sólidos com ausência total ou parcial de água livre (SOCCOL *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018) fator que facilita o uso de fungos filamentosos.

Figura 3. Técnica de fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos.



Autor: 2025

A FES é uma biotecnologia comumente usada para o cultivo de microrganismos, fungos filamentosos em sua maioria, em substratos sólidos sem fluxo aquoso livre, ou seja, o substrato sólido contém umidade suficiente para suportar as atividades microbianas sem adição de água (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIĆ, 2006). Os espaços entre partículas contêm uma fase gasosa contínua e a água está impregnada ou está na forma de um fino filme sobre as partículas (CASCIATORI, 2015; PESSOA, 2016). O substrato sólido pode ser a fonte de nutrientes dos microrganismos cultivados ou apenas uma matriz de suporte impregnada com nutrientes específicos para o desenvolvimento do microrganismo (DAS; BHAT; SELVARAJ, 2019; KUMAR *et al.*, 2011; SINGHANIA *et al.*, 2018).

A tecnologia FES oferece diversas e novas oportunidades de processo, pois permite a utilização de subprodutos agroindustriais como substratos sem que haja necessidade de um pré tratamento extensivo, produzindo altas concentrações de produtos de grande interesse do mercado, como as enzimas (CASCIATORI *et al.*, 2016). Segundo a literatura, a produção de enzimas por fermentação em estado sólido (FES) é promissora (NOVELLI *et al.*, 2016). Uma das principais vantagens dessa metodologia é a possibilidade do uso de resíduos orgânicos, como cascas de laranja, maçã, banana, farelo de soja, arroz e trigo, sendo este último um dos substratos mais descritos na literatura para fermentação microbiológica (CHIMBEKUJWO *et al.*, 2013). Além disso, utiliza pouca quantidade de água o que promove uma maior

concentração de metabólitos, reduz a probabilidade de contaminação bacteriana e favorece o crescimento de fungos filamentosos, já que estes crescem facilmente sobre substratos sólidos (CHILAKAMARRY *et al.*, 2022).

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou fermentação em meio semi-sólido aplica-se aos processos onde existe crescimento de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde a quantidade de líquido apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos microrganismos, mas não exceda a máxima capacidade de ligação de água com a matriz sólida.(PINTO *et al.*, 2006).

A fermentação do estado sólido proporciona benefícios em comparação à fermentação submersa, em especial quando o cultivo é feito com fungos filamentosos. Apresentam maior rendimento, produtividade e menor gasto de energia. Além disso, proporciona uma melhor adaptação ao fungo, uma vez que pode utilizar de fontes de carbono naturais e de baixo custo, como resíduos agroindustriais. (RAMOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2021). A concentração dos produtos após a extração é bem maior que os obtidos no processo de fermentação submersa e gera menos resíduos líquidos. Esse processo desperta maior interesse econômico em regiões com abundância em biomassa e resíduos agroindustriais, que representam material barato e abundante (CASTILHO *et al.*, 2000).

3.4 SUBSTRATO: *Pritchardia pacifica*

As palmeiras ornamentais são amplamente utilizadas em projetos paisagísticos e de urbanização em todo o mundo, em especial, nas zonas tropicais onde ocorrem naturalmente (HENDERSON *et al.*, 1995; JANICK e PAULL, 2006), embelezando cidades e conferindo qualidade de vida aos seus habitantes, além de promoverem o turismo devido à sua exuberância (SOTO *et al.*, 2014). Dentre elas, a espécie *Pritchardia pacifica* Seem. & H. Wendl. (Arecaceae), nativa da Oceania (BACON, 2011) e popularmente conhecida como palmeira-de-leque, possui como característica marcante as suas belas folhas na forma de palmas semicirculares que podem alcançar aproximadamente 2 m de comprimento (PACSOA, 2013)(Figura 3).

Figura 4. Representação das folhas e sementes da *Pritchardia pacifica*.



Fonte: Palms Journal of the International Palm Society, 2007.

Em geral, as palmeiras se propagam por meio de sementes que, geralmente, apresentam germinação baixa e desuniforme que pode estar relacionada, dentre outros fatores, com o estágio de maturação dos frutos (PIMENTA *et al.*, 2010). COSTA & MARCHI (2008) recomendam que a coleta dos mesmos deva ser realizada, preferencialmente, quando estiverem maduros, o que resulta na obtenção de uma maior porcentagem de germinação. Para LORENZI *et al.* (2004), os melhores resultados de germinação relacionaram-se com a coloração escura dos frutos, concluindo que os embriões de frutos esverdeados são imaturos e, normalmente apresentam endosperma aquoso e algum grau de dormência. Dessa forma, recomenda-se coletar as sementes de palmeiras quando os frutos estiverem maduros, reconhecidos pela mudança de coloração no epicarpo e deiscência natural (PIVETTA *et al.*, 2007).

Figura 5. Frutos recém-coletados de *P. pacífica* com a coloração esverdeada (A), amarelada (B) e avermelhada (C).



Fonte: Tecnol. & Ciên. Agropec, 2014.

3.5 ISOLAMENTO DE *Trichoderma* NO ECÓTONO CAATINGA' CERRADO: FUNGOS DO GÊNERO *Trichoderma*

Os fungos do gênero *Trichoderma* pertencem ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e família Hypocreaceae com características fenotípicas facilmente perceptíveis, variando desde parasitas fúngicos macroscópicos até a rizosfera (ABREU & PFENNING, 2019). Apesar de mesófilos, esses fungos estão distribuídos por todo o globo, principalmente em regiões de clima tropical e temperado (MACHADO *et al.*, 2012). Os fungos *Trichoderma* são definidos por algumas características fenotípicas comuns (*por exemplo*, colônias verdes), como ampla distribuição geográfica, rápido crescimento e alta capacidade de parasitar ou preda outros fungos e, no caso de algumas espécies, podem estabelecer interações benéficas com plantas, resultando na promoção do crescimento e indução de resistência a doenças e estresses abióticos (HARMAN *et al.*, 2004).

Trichoderma é o gênero fúngico de maior importância dentre os organismos utilizados no controle biológico. As pesquisas agrícolas com o gênero iniciaram na década de 1930. No Brasil, iniciaram na década de 1970 e sua aplicação começou a ganhar importância após os anos 2000. O primeiro registro de um produto à base de *Trichoderma* foi apenas em 2006. O gênero *Trichoderma* é um dos mais utilizados em formulações de biológicos simples e compostos (com mais de um agente) ((CROPLIFE Brasil, 2022).

Este gênero de fungo já é bem conhecido no setor agrícola pela sua capacidade de atuar como agente de controle biológico (MORAIS *et al.*, 2022) presentes em áreas de ecótono Cerrado-Caatinga, região que compreende a terceira maior área ecotonal do Brasil. Os ecótonos são áreas resultante do contato entre dois ou mais biomas, refletindo mudanças locais e regionais nas condições abióticas e bióticas (OLIVEIRAS; MALHI, 2016), apresentando biodiversidade com microbiota rica e promissora na produção de moléculas bioativas, com potencial natural para uso nos processos biotecnológicos.

O gênero *Trichoderma* é eficaz contra diversos fitopatógenos por sua alta capacidade de ser encontrado em diferentes solos e substratos. Além disso, *Trichoderma* apresenta um crescimento acelerado que favorece a colonização do habitat. Esses fungos podem crescer em solos sem culturas agrícolas e inativar estruturas de infecção e resistência a patógenos existentes.(LUCON *et al.*, 2014). O gênero *Trichoderma* possui fungos que estão presentes no solo, atuando como parasitas macroscópicos e decompositores de matéria orgânica, considerados oportunistas ambientais (DRUZHININA *et al.*, 2011).

As espécies de *Trichoderma* têm muitas características que as tornam de interesse significativo para a comunidade de pesquisa. Entre essas características está a produção de produtos naturais ou metabólitos secundários (KORPI *et al.*, 2009). Os *Trichoderma* são conhecidos por excretar enzimas hidrolíticas como quitinase, β -glucanase e proteases. O mecanismo antifúngico de *Trichoderma* envolve enzimas degradadoras da parede celular fúngica (HARMAN *et al.*, 2004).

Figura 6. Crescimento da cepa fúngica de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) em meio Batata Dextrose Ágar



Fonte: Autor, 2024.

A caatinga é um Bioma exclusivamente brasileiro, localizado no Nordeste do Brasil, com cerca de um milhão de quilômetros quadrados, estando inseridos na região semi-árida, habitada por aproximadamente 23 milhões de pessoas (FERREIRA *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2012). Os solos são ambientes ricos para microrganismos e as suas características afetam diretamente microbiotas (PACCHIONI *et al.*, 2014). A diversidade microbiana dos solos da caatinga ainda é pouco estudada, mas esse bioma tem condições climáticas severas, com altas temperaturas, elevada exposição a UV, e longos períodos de seca que podem promover a presença de microrganismos com composição taxonômica funcional distintas em relação a outros biomas. (MENEZES *et al.*, 2012; PACCHIONI *et al.*, 2014). Aceito como o segundo maior bioma do Brasil, o Cerrado é uma extensa extensão territorial. Além disso, possui excepcional riqueza de espécies, o que o coloca como savana, possuindo a maior diversidade biológica do mundo. Essa união de vasta extensão e ampla biodiversidade faz do Cerrado um bioma muito significativo. (PASSARETI *et al.*, 2020).

3.6 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS

As etapas de downstream que compreendem o processo de purificação e caracterização de proteases são de extrema relevância para uma aplicação biomédica ou farmacêutica. Enzimas proteolíticas, especialmente aquelas obtidas a partir de microrganismos necessitam passar por tais processos e comprovar não só sua pureza como sua adequação a indústria de interesse (GURUMALESH. *et al.*, 2019). Os procedimentos utilizados na purificação de proteínas baseiam-se em técnicas de separação baseadas na carga, tamanho, propriedades das ligações e na solubilidade das moléculas (BAYNES; DOMINICZAR, 2007).

Enzimas proteolíticas podem ser purificadas por técnicas relacionadas a características físico-químicas como carga elétrica, massa molar, solubilidade e hidrofobicidade. De acordo com a literatura vigente, normalmente são empregadas etapas de precipitação e/ou cromatografias. A primeira pode ser obtida por meio da adição de um determinado sal em processo conhecido como salting-out; A segunda compreende uma diversidade de padrões, sendo estes designados a partir das particularidades da enzima de interesse, assim temos cromatografias baseadas no tamanho, massa molar ou carga elétrica da protease (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A precipitação de proteínas em geral é um dos métodos mais tradicionais no processo de concentração, no entanto não pode ser considerado um método de purificação propriamente dito visto que não resulta em proteínas puras, contudo podem ser aplicadas no início do processo de purificação como forma de preparação para as etapas seguintes (ZUÑIGA, 2003).

Esta técnica vale-se do aumento ou diminuição da força iônica a partir da variação na concentração de sais ou solventes orgânicos. A utilização de sais promove um efeito conhecido como salting-out, caracterizado pela neutralização das cargas elétricas superficiais pela adição de sais, reduzindo a solubilidade da proteína, que são “excluídas” da fase aquosa da solução e precipitam-se no fundo do recipiente. A precipitação destas biomoléculas também pode ocorrer pela adição de solventes orgânicos, estes, por sua vez, atuam diminuindo a constante dielétrica do meio, que resulta na agregação das moléculas proteicas por interação eletrostática de superfícies carregadas com sinal oposto (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

Entre os métodos de purificação propriamente ditos, a cromatografia destaca-se

sendo amplamente utilizada para purificação de proteínas (GUGGISBERG *et al.*, 2012). Todas as etapas do processo downstream devem levar em consideração as características da enzima de interesse, sendo um pré-requisito na utilização de coluna cromatográfica. Resumidamente, a cromatografia é realizada sob aplicação de uma determinada amostra contendo a molécula de interesse. Estas moléculas ficam, a princípio, retidas pela coluna e são eluídas em diferentes momentos a depender de sua adsorção na matriz, essa eluição normalmente ocorre pela adição de um eluente. A coleta de etapas diferentes da coluna permite a separação da molécula de interesse de outros componentes do meio que não apresentaram capacidade de ligação à coluna ou foram eluídos em outras fases. Esta técnica vem sendo amplamente aplicada no estudo e na purificação de colagenases (FAYAD, S., MORIN, P., NEHMÉ, R., 2017). A cromatografia de exclusão molecular, por exemplo, baseia-se na massa molecular das proteínas, onde as moléculas menores que os poros da matriz cromatográfica são eluídas mais lentamente em relação às maiores, resultando assim na fragmentação da amostra em eluições com moléculas de diferentes tamanhos (DUONGLY GABELLI, 2014). Já a cromatografia de troca iônica baseia-se na carga elétrica na superfície da molécula e sua interação com a matriz, destaca-se em relação à outras devido a sua facilidade de aplicação em larga escala, elevada resolução e capacidade de adsorção (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020) As resinas utilizadas neste modelo cromatográfico podem ser trocadoras de ânions (possuem carga positiva), como o dietilaminoetil (DEAE)-celulose e resinas trocadoras de cátions (possuem carga negativa), como o carboxi-metil (CM)-celulose. No geral, para escolha da matriz que vai compor a coluna, devem ser considerados os seguintes critérios: estabilidade mecânica e química, capacidade de adsorção, tamanho e forma do poro, superfície e densidade da matriz e tamanho da partícula de interesse (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A cromatografia de interação hidrofóbica por sua vez, é normalmente utilizada como complementar por ser menos seletiva e funciona levando em consideração a adsorção por hidrofobicidade (MUCA *et al.*, 2020).

O aumento da temperatura proporciona um aumento na velocidade da reação catalítica. Porém, o aumento da temperatura também favorece a reação de desativação enzimática por meio de desnaturação irreversível. Existe, portanto, um valor de temperatura ótima, no qual a atividade enzimática é máxima e a partir do qual a atividade tenderá a diminuir por desnaturação da enzima, que se dá a partir da modificação na conformação da estrutura

enzimática em altas temperaturas e se aplica na ligação enzima- substrato, impossibilitando a enzima de poder realizar sua função catalítica (BORZANI, 2001; SANGUINE, FERNANDES, 2014).

3.7 ESTUDOS RELACIONADOS E APLICAÇÕES FUTURAS

No Brasil, produtos à base de *Trichoderma* são registrados para o controle de doenças de plantas (BETTIOL *et al.*, 2019), incluindo uma grande parcela com conídios das espécies *T. harzianum* e *T. asperelum* como ingredientes ativos. A maioria desses produtos é recomendada para a maioria das culturas afetadas por fitopatógenos, como patógenos de raízes como o nematoide da raiz *Meloidogine javanica* (SHARON *et al.*, 2001), fungos de raízes como *Pythium spp.* (NASEBY *et al.*, 2000; THRANE *et al.*, 2000), Retoma fez *Rhizoctonia spp.* (CÚNDOM *et al.*, 2003), *Phytophthora spp.* (ETEBARIAN *et al.*, 2000; EZZIYYANI *et al.*, 2007) e patógenos de brotos como *Venturia spp.*, *Botrytis spp.* (HJELJORD *et al.*, 2001; LISBOA *et al.*, 2007), *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa do cacau (SANOGO *et al.*, 2002). Assim, espécies do gênero *Trichoderma* são relevantes por suas características favoráveis à sobrevivência no ambiente, como natureza saprofítica e rápida colonização de substratos com mínimas exigências nutricionais, e estruturas de resistência para sobreviver às adversidades ambientais.

4. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, L.M.; PFENNING, L.H. O gênero *Trichoderma*. In: M.C. MEYER, S.M. MAZARO and J.C. SILVA, eds. *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília: EMBRAPA, p. 163-179, 2019.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes *Biomolecules*. v.4, n. 1, p. 117-139, 2014.

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

- BACON , C.D. The Palms of Fiji and Tonga. *Palms*. v 55, n. 1, p. 21-26, 2011.
- BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n. 3, p. 204–209, 2013.
- BAYNES, J.W.; DOMINICZAK, M.H. *Bioquímica médica*, 2 edição, Editora Elsevier. p. 17 -18, 2007.
- BETTIOL, W. Métodos alternativos para o controle de doenças de plantas. In: S.M. MICHEREFF and BARROS, eds. *Proteção de plantas na agricultura sustentável Recife: UFRPE*. 2021.
- BHAGWAT, P. K. & DANDGE, B. P. Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 15. p. 43–55, 2018.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial, Fundamentos*, 1a ed., São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda.,v. 1, p. 11, 2001.
- CASCIATORI, F. P. et al. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, v. 64, p. 114–123, 2015.
- CASCIATORI, F. P. et al. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. *Chemical Engineering Journal*, v. 287, p. 103–116, 2016.
- CROPLIFE BRASIL. Sumário Executivo Biodefensivos: Mercado Brasileiro Safra 2021/22.
- CASTILHO, L.R; MEDRONHO, R.A.; ALVES, T.L.M. *Bioresour Technol*. v. 71, p. 45, 2001.
- CHILAKAMARRY, C. R., HILAKAMARRY, C. R., SAKINAH, A. M. M., ZULARISAM, A.W., SIROHI, R., KHILJI, I. A., AHMAD, N., & PANDEY, A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresour Technol*. 343, p. 1-11, 2022.

CHIMBEKUJWO, K. I., JA'AFARU, M. I., & ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. *Scientific African*. 8 (20), p.1-9, 2000.

COSTA, C.J.; MARCHI, E.C.S. Germinação de sementes de palmeiras com potencial para produção de agroenergia. *Informativo ABRATES*, v.18, n.1, p.039-050, 2008.

CUNDOM, M.A., MAZA, S.M. and GUTIÉRREZ, S.A. Selection of *Trichoderma* spp. isolates against *Rhizoctonia solani*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 1, n. 4, p. 79-81, 2003.

DAS, D.; BHAT, R.; SELVARAJ, R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. *Annals of Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 201–209, 2019.

DONALD, R. Hodel. A review of the genus *Pritchardia*. *Palms Journal of the International Palm Society*. Vol 51, 2007.

DRUZHININA, IS, SEIDL-SEIBOTH,V., HERRERA-ESTRELLA, A., HORWITZ, BA, KENERLEY, CM, MONTE, E., MUKHERJEE, PK, ZEILINGER, S., GRIGORIEV, IV e KUBICEK, CP. *Trichoderma*: a genômica do sucesso oportunista. *Nature Reviews. Microbiologia* , v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

DUARTE, A. S., CORREIA, A., ESTEVES, A. C. Bacterial collagenases - A review. *Crit Rev Microbiol*. 42(1):p.106-26, 2016. DOI: 10.3109/1040841X.2014.904270.

DUONG-LY, K. C., & GABELLI, S. B. Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins. *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*, p. 105–114, 2014.

ETEBARIAN, H.R., SCOTT, E.S. and WICKS, T.J. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology*, v. 106, n. 4, p. 329-337, 2000.

EZZIYYANI, M., REQUENA, M.E., EGEEA-GILABERT, C. and CANDELA, M.E.. Biological control of *Phytophthora* root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *Journal of Phytopathology*, v. 155, n.. 6, p. 342-349, 2007.

FAYAD, S., MORIN, P., NEHMÉ, R. Use of chromatographic and electrophoretic tools for assaying elastase, collagenase, hyaluronidase, and tyrosinase activity. *Journal Of Chromatography A*. 2017.

GAO, S. et al. Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide -induced immunosuppression in BALB/c mice. *Journal of Functional Foods*. v. 60, 2019.

GUGGISBERG, DOMINIK & RISSE, M.C. & HADORN, RUEDI. Determination of Vitamin B-12 in meat products by RP-HPLC after enrichment and purification on an immuno affinity column. *Meat science*. 2012. DOI: 9279-83.10.1016/j.meatsci.2011.07.009.

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

HARAZONO, K., ATSUMI, Y., SHIRASAKA, N. Safety evaluation of collagenase from *Streptomyces violaceoruber*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020.

HARMAN, G. E, HOWELL, C. R, VITERBO, A, CHET, I. and LORITO, M. *Trichoderma* Species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology* 2: 43–56, 2004.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I. E LORITO, M. Espécies de *Trichoderma*: simbioses oportunistas e avirulentos de plantas. *Nature Reviews. Microbiologia*, v. 2, n. 1, p .43-56, 2004.

KORPI, A., JARMBERG, J. and PASANEN, A.L. Microbial volatile organic compounds; *Critical Reviews in Toxicology*, v. 1.39, p. 139–193, 2009.

HENDERSON, A., GALEANO, G. & BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton University Press, New Jersey, 1995.

HJELJORD, L.G., STENSVAND, A. and TRONSMO, A.. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (atroviride) P1 against *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, v. 91, n. 12, p. 1172-1180, 2001.

JANICK, J. e PAULL, R.E. The encyclopedia of fruit & nuts. Cambridge: Cambridge University, p. 160, 2006.

JORDAN, G. H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: A prospective, single-center, non-placebo-controlled study. J Sex Med. v. 5. p. 180-187, 2008.

KILIKIAN, B. V., et al. Processo de purificação: métodos analíticos e estabilidade de enzimas. In *Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial*. São Paulo: Blucher, 2020.

LISBOA, B.B., BOCHESI, C.C., VARGAS, L.K., SILVEIRA, J.R.P., RADIN, B. and OLIVEIRA, A.M.R.. Eficiência de *Trichoderma harzianum* e *Gliocladium viride* na redução da incidência de *Botrytis cinerea* em tomateiro cultivado sob ambiente protegido. *Ciência Rural*, v. 37, n. 5, p. 1255-1260, 2007.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; COSTA, J.T.M.; CERQUEIRA, L.S.C.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p. 432, 2004.

LUCON, C. M. M., CHAVES, A.L.R. and BACILIERI, S. *Trichoderma*: o que é, pra que serve e como usar corretamente na lavoura. São Paulo: Instituto Biológico. 2014.

MAMO, J.; KANGWA, M.; FERNANDEZ-LAHOIRE, H. M.; ASSEFA, F. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, 571-584, 2020.

MAZARO and J. C. SILVA, eds. *Trichoderma*: uso na agricultura Brasília: EMBRAPA, p. 163-179, 2022.

MACHADO, D. F. M., PARZIANELLO, F. R., SILVA, A. C. F. and ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MARTÍNEZ-MEDINA, G. A. et al. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. *Enzymes in Food Biotechnology*. Elsevier, p. 221–246, 2019.

MENESES, L. F. G., et al, VENTURINI, T.; KUSS, F.; KRUGER, C. E.; RONSANI, R.; PARIS, W.; BIESEK, R. R.; PONTES, S. J. Rearing of beef cattle grazing oats with different forage allowances, with or without supplementation. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 64 (3) : p. 623-630, 2012.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVTC, M. Solid-state fermentation bioreactors. [s.l.] Springer, v. 19, 2006.

MORAIS, E. M. SILVA, A. A. R., SOUSA, F. W. A. D., AZEVEDO, I. M. B. D., SILVA, H. F. SANTOS, A; M; G., BESERRA JUNIOR, J. E. A., CARVALHO, C. P., EBERLIN, M. N., PORCARI, A. M., ARAÚJO, F. D. S. Endophytic *Trichoderma* strains isolated from forest species of the Cerrado-Caatinga ecotone are potential biocontrol agents against crop pathogenic fungi. *PLoS ONE*, v. 17, n. 4, 2022.

MUCA, R. et al. Effects of negative and positive cooperative adsorption of proteins on hydrophobic interaction chromatography media. *Journal of Chromatography A*, v.1625, 2020.

NASCIMENTO, V. C., , RODRIGUES-SANTOS, K. C., CARVALHO-ALENCAR, K. L., CASTRO, M.B., KRUGER R.H., and LOPES, F.A.C. *Trichoderma*: biological control efficiency and perspectives for the Brazilian Midwest states and Tocantins *Trichoderma*: eficiência no controle biológico e perspectivas para os estados do Centro-Oeste brasileiro e Tocantins Lopes. *Brazilian Journal of Biology*, vol 82, 2022.

NASEBY, D.C., PASCUAL, J.A. and LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, n. 1, p. 161-169, 2000.

NASRI, M. Bioactive Peptides from Fish Collagen Byproducts. 2019. DOI:10.1002/9781119383956.ch13.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. p. 89-95, 2014.

NOVELI, P.K, BARROS, M.M, & FLEURI, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization, *Food Chem.* 198, 119–124,2016.

OLIVERAS, I.; MALHI, Y. Many shades of green: the dynamic tropical forest-savannah transition zones. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, n. 371, p. 1-15, 2016.

PACCHIONI, R. G., CARVALHO, F. M., THOMPSON C. E., FAUSTINO, A. L. F., NICOLINI, F., PEREIRA, T. S., SILVA, R. C. B., CANTÃO, M. E., GERBER, A., VASCONCELOS, A. T. R., AGNEZ-LIMA, L. F. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. *MicrobiologyOpen*. v.3, p. 299-315, 2014.

PACSOA. Palm and cycad societies of Australia. 2013. [cit. 2015-03-23]. http://www.pacsoa.org.au/w/index.php?title=Pritchardia_pacifica

PANDEY, P. A., BENJAMIN, S., SCCOL, C. R., NIGAM, P., *Curr. Sci* 77-149, 1999.

PANDEY A., SOCCOL, C. R., NIGRAM, P., BRAND, D., MOHAN, R., & ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 6(1),p. 153–162, 2000.

PASSARETTI, RA et al. Controle de plantas daninhas, sementes grandes e raízes profundas: impulsionadores do sucesso na semeadura direta para restauração de savana. *Applied Vegetation Science*, v.23, n3,p.406-4016,2020.

PHILIPPS-WIEMANN, P. et al. Proteases—general aspects. *Enzymes in Human and Animal Nutrition*. Elsevier- Academic Press. p. 257–266, 2018.

PIMENTA, R.S.; LUZ, P.B.; PIVETTA, K.F.L.; CASTRO, A.; PIZETTA, P.U.C. Efeito da maturação e temperatura na germinação de Sementes de *Phoenix canariensis* Hort. Ex Chabaud – Arecaceae. *Revista Árvore*, v.34, n.1, p.31-38, 2010.

PINTO, G. A.S., BRITO, E. S., SILVA, F.L.H., SANTOS, S. F. M., MACEDO, G. R. Revista Quim. Ind. v.74,p.17-18, 2006.

PIVETTA, K.F.L.; BARBOSA, J.G.; ARAÚJO, E.F. Propagação de palmeiras e estrelitzias. In: BARBOSA, J.G.; LOPES, L.C. Propagação de plantas ornamentais. Viçosa - MG: Universidade Federal de Viçosa, p.43-70,2007.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol Mol Biol Rev. v. 62, n. 3, p. 5997-635, 1998.

SARKAR, GARGI & K, SUTHINDHIRAN. Extraction and characterization of alkaline protease from *Streptomyces* sp. GS-1 and its application as dehairing agent. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. v.25, 2020. DOI: 101590. 10.1016/j.bcab.2020.101590.

SHARON, E., BAR-EYAL, M., CHET, I., HERRERA-ESTRELLA, A., KLEIFELD, O. and SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, vol. 91, no. 7, p. 687-693,2001.

SRIVASTAVA, NEHA & MISHRA, P.K. & UPADHYAY, S. N. Proteases: an unexplored enzyme for biomass conversion. 10.1016/B978-0-12-821010-9.00008-5.2020.

SOTO, J.A.; DIAZ, J. e RAMIREZ, M. Palmas (Arecaceae) ornamentales del municipio San Diego, Valencia, estado Carabobo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, vol. 48, n. 1, p. 64-74, 2014.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. Braz. J. Microbiol. vol.46 no.2 São Paulo Apr./June, 2015.

ROCHA, F. T. B., BRANDÃO-COSTA, R. M. P., NEVES, A. G. D., CARDOSO, K. B. B., NASCIMENTO, T. P., ALBUQUERQUE, W. W. C., & PORTO, A. L. F. Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. Microbiology • An. Acad. Bras. Ciênc. 93 (3),p. 1-13, 2021.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., MARRA, R., WOO, S. L. and LORITO, M. Trichoderma-plant-pathogen. *Soil Biology and Biochemistry* 40, p. 1–10, 2008.

SANOGO, S., POMELLA, A., HEBBAR, P.K., BAILEY, B., COSTA, J.C., SAMUELS, G.J. and LUMSDEN, R.D. Production and germination of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of *Crinipellis pernicioso* on cacao. *Phytopathology*, v. 92, n.10, p. 1032-1037, 2002.

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*. p.

305-324, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-63994-3.00021-7

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, p. 52- 71, 2017.

SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamaris* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Advances in Enzyme Research*, v. 4, n. 4, p. 125 -143, 2016.

SANTOS, P. S. et al. 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.

THRANE, L., YURA, H.T. and ANDERSEN, P.E. Analysis of optical coherence tomography systems based on the extended HuygensFresnel principle. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, Image Science, and Vision*, v. 17, n. 3, p. 484-490, 2000.

USAMAH, A. et al. Sun-082 effects of oral collagen peptides on nutritional status of peritoneal dialysis patients. *Kidney International Reports*. v. 4, n. 7, p. S188-S189, 2019.

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

WEISS, R.; EISCHER, A.; TADIC, T.; GRITSCH, S. M.; ORTNER, M.; PRALL, K.; NEUNTEUFEL, E.; F. PUTZ, R. F.; GUEBITZ, G. M.; NYANHONGO, G. S. Valorisation of slaughter house and deinking paper waste streams for the production of enzyme by *Trichoderma reesei*. *Journal of Cleaner Production*, v. 275, 2020.

YAGODA, M. R. et al. A Nutritional Supplement Formulated with Peptides, Lipids, Collagen and Hyaluronic Acid Optimizes Key Aspects of Physical Appearance in Nails, Hair and Skin. *Nutrition & Food Sciences*. v. 5, 2014.

YAMANAKA, H. et al. A multicenter, randomized, controlled study of the use of nutritional supplements containing collagen peptides to facilitate the healing of pressure ulcers. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. v. 8. p. 51-59, 2017.

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

ZHUANG, Y. et al., Antihypertensive Effect of Long-Term Oral Administration of Jellyfish (*Rhopilema esculentum*) Collagen Peptides on Renovascular Hypertension. *Mar Drugs*. 2012. DOI: 10.3390/md10020417

ZUÑIGA, A. D. G. et al. Revisão: Técnicas Usadas No Processo De Purificação De Biomoléculas *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 2003.

CAPÍTULO 1 - Artigo Aceito - ISSN 1696-8352

QUALIS CAPES - A3



Revista Observatorio de La Economía Latinoamericana (OLEL) - Qualis CAPES A3

Caracterização parcial de uma nova protease proveniente de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) Isolado do Ecótono Caatinga-Cerrado Piauiense obtida através de fermentação em estado sólido

Maria Ercilia Lima Barreiro

MSc in Biology Applied to Health

Institution: Universidade Federal de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: maria.ercilialimabarreiro@gmail.com

Luiz Henrique Svintiskas Lino

MSc in Biology Applied to Health

Institution: Universidade de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: luiz.svintiskas@upe.br

Maria Eduarda Luiz Coelho de Miranda

Msc in Animal Bioscience

Institution: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: dudalcmiranda@gmail.com

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso

PhD in Biology Applied to Health

Institution: Universidade de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: kethylen.barbara@ufpe.br

Júlio César dos Santos Nascimento

PhD in Animal Bioscience

Institution: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: julio.nascimento@ufrpe.br

Raphael Luiz Andrade Silva

PhD in Animal Bioscience

Institution: Universidade de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: raphaelluizandradesilva@gmail.com

Ana Lucia Figueiredo Porto

PhD in Chemical Engineering

Institution: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil

E-mail: ana.porto@ufrpe.br

Alice Maria Gonçalves Santos

PhD in Phytopathology

Institution: Universidade Federal do Piauí

Address: Bom Jesus, Piauí, Brazil

E-mail:

Thiago Pajeú Nascimento

PhD in Biology Applied to Health

Institution: Universidade Federal do Piauí

Address: Bom Jesus, Piauí, Brazil

E-mail: thiagopajeu@ufpi.edu.br

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

PhD in Biological Sciences

Institution: Universidade de Pernambuco

Address: Recife, Pernambuco, Brazil

E-mail: romero.brandao@upe.br

RESUMO

O gênero *Trichoderma* é amplamente reconhecido por seu potencial biotecnológico, destacando-se na produção de enzimas e na promoção do controle biológico, o que o torna um recurso valioso para processos industriais sustentáveis. Este estudo investigou a produção de proteases colagenolíticas pelo *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) cultivado em fermentação em estado sólido (FES) utilizando farelo de frutos de *Pritchardia pacifica* como substrato. O principal objetivo foi explorar o potencial desses resíduos agroindustriais para a obtenção de enzimas com aplicação industrial. As proteases foram extraídas e submetidas a um esquema de purificação que incluiu precipitação com acetona, fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica. Os resultados obtidos apresentaram uma eficiência na purificação de uma enzima com atividade proteolítica exibindo atividade ótima em pH 8,0 e estabilidade térmica, mantendo mais de 70% da atividade após 6 horas de incubação em temperaturas entre 20°C e 50°C. Adicionalmente, a caracterização físico-química indicou que a enzima na presença de íons $AlCl_3$ e $ZnSO_4$ teve sua atividade reduzida em mais de 50% e estabilidade na

presença de surfactantes. A cromatografia em Gel filtração em Superdex-G75 revelou a massa molecular da enzimas em torno de 65kDa. Os resultados demonstram a viabilidade do *T. koningiopsis* como recurso biotecnológico para a obtenção de enzimas de alto valor agregado, promovendo processos sustentáveis que aproveitam resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Arecaceae, Trichoderma, Fermentação em Estado Sólido, Protease, Produção de Enzimas

ABSTRACT

The *Trichoderma* genus is widely recognized for its biotechnological potential, particularly in enzyme production and biological control, which makes it a valuable resource for sustainable industrial processes. This study investigated the production of collagenolytic proteases by *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) cultivated via solid-state fermentation (SSF) using bran from *Pritchardia pacifica* fruits as the substrate. The primary objective was to explore the potential of these agro-industrial residues for obtaining enzymes for industrial applications. The proteases were extracted and subjected to a purification scheme that included acetone precipitation, ammonium sulphate fractionation, and ion exchange chromatography. The results demonstrated an efficient purification of a proteolytic enzyme, which exhibited optimal activity at pH 8.0 and maintained thermal stability, retaining over 70% of its activity after 6 hours of incubation at temperatures ranging from 20°C to 50°C. Additionally, physicochemical characterization indicated that the enzyme's activity was reduced by more than 50% in the presence of AlCl₃ and ZnSO₄ ions, while it remained stable in the presence of surfactants. Gel filtration chromatography using a Superdex G-75 column revealed that the molecular mass of the enzyme is approximately 65 kDa. These findings demonstrate the viability of *T. koningiopsis* as a biotechnological resource for producing high value-added enzymes, thereby promoting sustainable processes that utilize agro-industrial residues.

Key Words: Arecaceae, Trichoderma, Solid State Fermentation, Protease, Enzyme Production.

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a sustentabilidade tem impulsionado a busca por soluções biotecnológicas que promovam o reaproveitamento de resíduos agroindustriais e a produção de bioprodutos de alto valor agregado. No setor industrial, enzimas desempenham um papel crucial na substituição de processos químicos agressivos por alternativas ambientalmente amigáveis e economicamente viáveis (SOUZA et al., 2024). Entre as diversas classes de enzimas industriais, as proteases representam cerca de 60% do mercado enzimático global, com aplicações amplamente distribuídas nos setores alimentício, farmacêutico, têxtil, de biocombustíveis e de tratamento de resíduos (BHAGWAT & DANDGE, 2018). No entanto, a viabilidade econômica desses processos ainda é um desafio, especialmente devido aos altos custos de produção e purificação das enzimas, além das dificuldades associadas ao seu rendimento em larga escala (BOUKID et al., 2023).

Entre as subclasses de proteases, aquelas com atividade colagenolítica têm ganhado especial atenção devido à sua capacidade de degradar colágeno, uma proteína estrutural amplamente presente em resíduos de origem animal e vegetal, caracterizada por sua baixa biodegradabilidade (RANJAN et al., 2024). Essa característica confere a essas enzimas um grande potencial para a recuperação de biomateriais e a valorização de resíduos agroindustriais, com aplicações em setores como a produção de hidrolisados proteicos, biopolímeros, biocurativos, formulações cosméticas e terapêuticas, além da melhoria da digestibilidade de proteínas em alimentos funcionais (ZHANG & HAN, 2024). Dessa forma, a exploração de fontes microbianas capazes de produzir proteases colagenolíticas se apresenta como uma alternativa promissora para atender à crescente demanda industrial por biocatalisadores eficientes e sustentáveis.

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* são amplamente reconhecidos como fontes valiosas de enzimas hidrolíticas, destacando-se por sua capacidade de secretar proteases, celulasas e quitinases de forma eficiente e em diferentes condições ambientais (YANG et al.,

2013; MANZAR et al., 2022). Além disso, sua versatilidade metabólica e a capacidade de crescer em substratos de baixo custo fazem do *Trichoderma* um microrganismo de grande interesse biotecnológico para a produção industrial de enzimas (SHIRZAD et al., 2023; SHAHNAZ et al., 2024). A fermentação em estado sólido (FES) tem se destacado como um método eficiente para a produção de enzimas microbianas, pois proporciona maior concentração enzimática, reduz custos operacionais e minimiza o impacto ambiental, quando comparada à fermentação submersa (LONDOÑO-HERNANDEZ et al., 2020; SAHOO et al., 2021).

No contexto da valorização de resíduos agroindustriais, frutos de *Pritchardia pacifica* (Arecaceae), uma palma endêmica das ilhas Fiji, surgem como uma alternativa viável e pouco explorada para a produção enzimática. Esses frutos são ricos em compostos orgânicos que podem servir como fonte de carbono e nitrogênio para microrganismos, tornando-se um substrato promissor para processos fermentativos sustentáveis (BACON, 2011). Além de possibilitar a produção de proteases colagenolíticas com potencial aplicação industrial, o uso desse resíduo agroindustrial contribui para a redução de passivos ambientais e promove o desenvolvimento de uma economia circular baseada em bioprocessos inovadores.

Diante desse panorama, o presente estudo teve como objetivo principal a obtenção, purificação e caracterização de proteases com atividade colagenolítica produzidas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) por meio de fermentação em estado sólido, utilizando o farelo de frutos de *Pritchardia pacifica* como fonte substrato buscando favorecer o desenvolvimento de novas aplicações industriais a partir de recursos renováveis.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das amostras

A cepa fúngica *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03), isolada do ecótono Caatinga-Cerrado Piauiense, foi obtida a partir da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Piauí (UFPI). O microrganismo foi mantido em meio Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado, garantindo sua preservação e viabilidade para os experimentos subsequentes. Para a indução da esporulação, culturas fúngicas foram cultivadas em meio BDA

e incubadas a 30°C por 72 horas, período necessário para a obtenção de alta densidade esporal. Após essa etapa, os esporos foram utilizados para a inoculação e condução do processo fermentativo (SANTANA et al., 2022).

2.2 Esporulação e Parâmetros fermentativos em Estado sólido (FES)

A inoculação do microrganismo foi realizada em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo meio de cultura BDA previamente esterilizado. As culturas foram incubadas a 30°C por 7 dias em estufa, permitindo a esporulação completa (SANTANA et al., 2022). Para a obtenção da suspensão de esporos, os mesmos foram coletados por meio da adição de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e posteriormente quantificados em câmara de Neubauer. A suspensão foi ajustada para uma concentração final de 10^7 esporos/mL. Em seguida, a suspensão de esporos foi inoculada em Erlenmeyer contendo 5 g da farinha seca do fruto de *Pritchardia pacifica*, previamente autoclavada, e ajustada para 40% de umidade com solução nutritiva. A fermentação ocorreu em câmara BOD a 30°C durante 120h, e ambiente escuro.

2.3 Processo de extração das proteases

Após o processo fermentativo FES, a extração das proteases foi realizada adicionando tampão Tris-HCl (7,5 mL/g substrato), 0,1M, pH 8.0. A técnica ocorreu em mesa agitadora (agitação orbital) a 120 rpm durante duas horas. Em seguida, o líquido denominado extrato bruto foi filtrado em gaze e em seguida com auxílio de bomba à vácuo em papel filtro (120g). O Extrato bruto foi armazenado em freezer -40°C para análises posteriores.

2.4 Dosagem de proteínas

A concentração proteica das amostras foi determinada de acordo com o método de Smith utilizando o ácido bicinconínico-BCA (SMITH et al., 1985). A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão para construção de curva de calibração.

2.5 Atividade proteásica

A determinação da atividade proteásica foi realizada segundo Ginter (1979). Para a reação foram adicionados 150uL da amostra em uma solução contendo 250uL do substrato

azocaseína a 1% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,4. Essa mistura foi incubada por 1h a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 1000uL de ácido tricloroacético (TCA) (10%, p/v) e em seguida centrifugada por 10 min a 4.000 rpm. Dessa solução, reservar 800uL e adicionar 200uL de uma solução de NaOH 1,8M. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro(420nm).

2.6 Precipitação cetônica, etanólica e sulfato de amônio do Extrato Bruto

O extrato bruto foi submetido a 3 processos separados de precipitação visando obter o maior rendimento proteico. 100mL de extrato bruto foi submetido a precipitação 70% com acetona e 70% com etanol, fração 0-60% com sulfato de amônio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 4000 rpm durante 10 minutos. Os precipitados foram armazenados em freezer -40°C e utilizados nos passos posteriores.

2.7 Cromatografia de troca iônica

Para a análise em cromatografia da amostra com maior atividade proteásica e rendimento proteico, foi utilizada uma coluna manualmente empacotada com a resina QAE-Sephadex A-50 (2,3 x 10 m), equilibrada com Tris HCl 20mM pH 8,0. O fluxo da coluna foi ajustado para 1 mL/min e em seguida foi realizada a injeção de 1mL do precipitado com sulfato de amônio. A fase móvel da coluna consistiu no tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e a eluição foi realizada com o mesmo tampão adicionado de NaCl 1 M. As frações coletadas foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 280nm.

2.8 Caracterização da protease purificada

2.8.1 Temperatura ótima e termoestabilidade

O efeito da temperatura e da termoestabilidade sobre a atividade proteásica foi avaliada na faixa de temperaturas que variou entre 20 e 80°C. Para a temperatura ótima, o ensaio foi realizado por incubação das amostras com o substrato azocaseína (1%), em um banho termostaticado. No teste da estabilidade térmica, o extrato foi incubado durante 6 horas e a atividade remanescente foi então realizada nos intervalos de 1h; 2h; 3h; e 6h; mensurada a 37°C, usando o método de determinação da atividade previamente descrito.

2.8.2 Efeito do pH na atividade da protease

O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado pela incubação da enzima com o substrato azocaseína (1%), preparados em soluções tampões 0,1 M com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 5 e 6); Tris-HCl (pH 7,0, 8,0 e 9,0) e carbonato-bicarbonato (10,0 e 11,0), logo após, foi realizadas as determinações da atividade proteolítica.

2.8.3 Efeito de Íons metálicos e surfactantes sob atividade enzimática

O efeito de soluções iônicas foi avaliado a uma concentração de 10 mM. A enzima exposta aos seguintes íons: sulfato de zinco [(ZnSO₄) • 7H₂O], sulfato de cobre [CuSO₄], cloreto de cálcio [CaCl₂], cloreto de magnésio [(MgSO₄) • 4H₂O], cloreto de potássio [KCl]. para efeito de surfactantes, a enzima foi exposta a Triton X, Tween 80, Tween 20 e SDS nas concentrações 1% e 10%. Após a exposição de 30 min da enzima, foram realizadas as atividades proteolíticas descritas por Ginter (1979).

2.8.4 Efeito de inibidores na atividade

O efeito de substâncias inibidoras da atividade enzimática foi realizado utilizando o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 10 mM como inibidor de metaloproteases, fenilmetanosulfonil (PMSF) 10mM para serino-proteases, pepstatina A 10 mM para aspártico-protease. Cada substância inibidora foi mantida em contato com a enzima por 30 min à temperatura de 37°C, em seguida promoveu-se a reação da atividade proteolítica descrita por GINTER (1979).

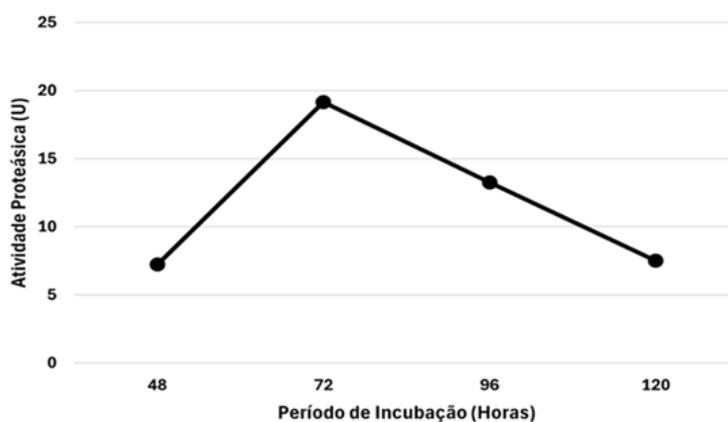
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03)

O efeito do período de incubação na produção de protease pela cepa *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) foi monitorado ao longo de 120 horas (Figura 1). Observa-se que a

atividade proteásica apresentou um comportamento dinâmico durante o experimento, com variações significativas ao longo do tempo. Onde obteve um aumento significativo da produção até 72 horas, momento em que foi observado o pico de atividade enzimática.

Figura 1. Efeito do período de incubação na produção de protease pela cepa de *T. koningiopsis* (UFPIT03).



Fonte: Autor, 2024.

A produção máxima observada em 72 horas está em consonância com estudos semelhantes envolvendo fungos filamentosos, onde as proteases tendem a alcançar picos de atividade durante a fase exponencial de crescimento celular (CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020; Da SILVA *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

A redução da atividade após este período foi observada e pode ser atribuída ao possível esgotamento de nutrientes no meio, alterações no pH que podem inibir a síntese da enzima, além do aumento da temperatura resultante do processo de fermentação, o que pode impactar o metabolismo microbiano (SATTAR *et al.*, 2019; COLLA *et al.*, 2023). Vale ressaltar que o tempo necessário para atingir a produção ideal pode variar conforme o tipo de microrganismo, os substratos utilizados para a indução da síntese da protease e as condições ambientais controladas no processo (JAMILU *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2024).

3.2 MÉTODOS DE PRECIPITAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *T. koningiopsis*

O extrato bruto apresentou uma concentração de proteína de $2,65 \pm 0,07$ mg/mL, com atividade proteolítica de 23,2U/mL e atividade colagenolítica de 118,5 U/mL. A enzima foi então parcialmente purificada por precipitação com acetona, etanol e sulfato de amônio, com a finalidade de obter maior eficiência no processo de obtenção da enzima purificada (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade enzimática de proteases de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) com ação colagenolítica utilizando farinha do fruto de *Pritchardia pacifica* como substrato. AP- Atividade Proteolítica; AC- Atividade Colagenolítica; AE_P- Atividade Proteolítica Específica; AE_C- Atividade Colagenolítica Específica; FP_P – Fator de Purificação Protease; FP_C - Fator de Purificação Colagenase; R- Rendimento

	Proteína (mg/mL)	AP (U)	AC (U)	AE _P (U/mg)	AE _C (U/mg)	FP _P	FP _C	R (%)
Extrato Bruto	2,65±0,07	23,2±0,07	118,5±0,07	8,7	44,6	1	1	100
Precipitado Acetona	1,42±0,02	29,8±0,02	92,7±0,02	20,9	65,1	2,4	1,45	53,5
Precipitado Etanol	0,86±0,02	15,8±0,02	78,37±0,03	18,2	90,4	2,1	2,02	32,6
Precipitado Sulfato de Amônio	3,5±0,02	26,5±0,02	99,9±0,07	7,4	28,5	0,8	0,62	134
QAE-sephadex A50	1,2	38,4	178,4	32,2	148,6	4,8	3,6	12

Fonte: Autor, 2024.

A precipitação com acetona resultou em um aumento de 140% na atividade proteolítica específica (20,9 U/mg) e de 46% na atividade colagenolítica específica (65,1 U/mg). Nesta etapa, foram alcançados um fator de purificação de 2,4 para a protease e de 1,45 para a colagenase, com um rendimento de 53,5%.

Já a precipitação com etanol promoveu um aumento de 109% na atividade proteolítica específica (18,2 U/mg) e de 103% na atividade colagenolítica específica (90,4 U/mg), com fatores de purificação de 2,1 para a protease e de 2,02 para a colagenase. O rendimento foi reduzido para 32,6%.

Por outro lado, a precipitação com sulfato de amônio resultou em uma concentração de proteína de 3,5 mg/ml, porém com redução na atividade específica, atingindo valores de 7,4 U/mg para a protease e 28,5 U/mg para a colagenase. Nesta etapa, o fator de purificação foi de 0,8 para a protease e de 0,62 para a colagenase, mas o rendimento foi elevado, alcançando 134%, indicando concentração de proteínas sem purificação efetiva.

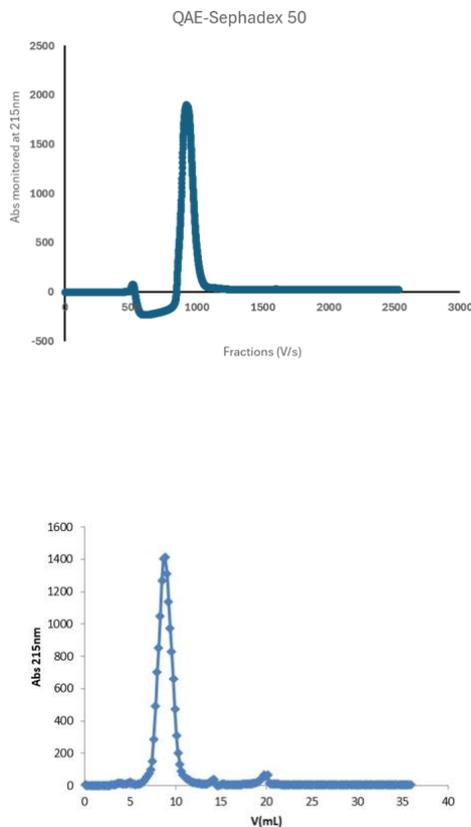
A precipitação de proteínas por solventes orgânicos é uma técnica amplamente utilizada na purificação de enzimas, explorando a redução da solubilidade proteica em meios com baixa constante dielétrica (NICKERSON *et al.*, 2022). A adição de solventes orgânicos, como acetona e etanol, promove a desestabilização das interações hidrofóbicas e eletrostáticas das proteínas, favorecendo a agregação e formação de precipitados. A acetona, por exemplo, é utilizada para otimizar a recuperação proteica (CARVALHO, 2015). A utilização de solventes orgânicos pode afetar a atividade enzimática. No entanto, algumas proteases demonstram estabilidade em diversos solventes (LIMA, 2016).

3.3 PURIFICAÇÃO DE PROTEASE DE *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03)

A purificação da enzima com atividade colagenolítica, obtida do cultivo do fungo filamentosos, foi realizada utilizando uma coluna de troca iônica do tipo aniônica em QAE-Sephadex e Superdex-G75

(Figura 2). Após o carregamento da amostra bruta e a aplicação do gradiente de eluição com NaCl, observou-se apenas um pico significativo no cromatograma, indicando que a maior parte da proteína com afinidade pela resina aniônica foi eluída em uma única etapa (figura 2A).

Figura 2. Cromatografia em resina para purificação da enzima oriunda do processo FES. (A) Cromatografia de troca iônica em QAE-sephadex. (B) Cromatografia de exclusão molecular em resina superdex-G75 Hr 10/300GL.



Fonte: Autor, 2024.

O pico único observado apresentou atividade colagenolítica quando testado, demonstrando que a estratégia de purificação foi eficiente em isolar a enzima alvo. Este resultado é consistente com estudos prévios que utilizam colunas de troca iônica para purificação de enzimas extracelulares de fungos, como observado em trabalhos de Wu et al. (2022) e Zhang et al. (2023), que relataram a recuperação de proteínas funcionalmente ativas com alto grau de pureza utilizando abordagens similares. O perfil cromatográfico também

sugere que a enzima possui uma carga líquida negativa em pH neutro, justificando sua interação com a matriz aniônica. O fato de apenas um pico apresentar atividade colagenolítica indica a especificidade do sistema de purificação empregado. Estudos semelhantes, como os de Liu et al. (2021), indicam que colunas QAE-Sephadex são especialmente adequadas para separar enzimas de baixa complexidade proteica ou altamente específicas. Comparativamente, o desempenho do método utilizado é superior em simplicidade e custo-benefício em relação a abordagens mais complexas, como as que envolvem múltiplas etapas cromatográficas (Zhao *et al.*, 2022). Os resultados obtidos neste estudo reforçam o potencial do QAE-Sephadex como uma matriz confiável para purificação de enzimas extracelulares, especialmente aquelas de interesse biotecnológico, como colagenases.

A figura 2B apresentou o processo de purificação da enzima em gel filtração. A técnica amplamente utilizada para verificar a massa molecular de biomoléculas, apresentou com resultado uma proteína com massa estimada em ~65kDa. Benmrad et al., (2019) descreveu uma protease de origem fúngica com massa molecular próxima a 65 kDa identificada como SPPS, uma serinoprotease do fungo basidiomiceto *Pleurotus sajor-caju*. Essa enzima foi caracterizada por suas potenciais aplicações industriais, particularmente em formulações de detergentes, devido à sua estabilidade e eficiência em várias condições. A massa molecular do SPPS foi determinada em aproximadamente 65 kDa por meio de várias técnicas bioquímicas, incluindo SDS-PAGE e cromatografia de exclusão de tamanho

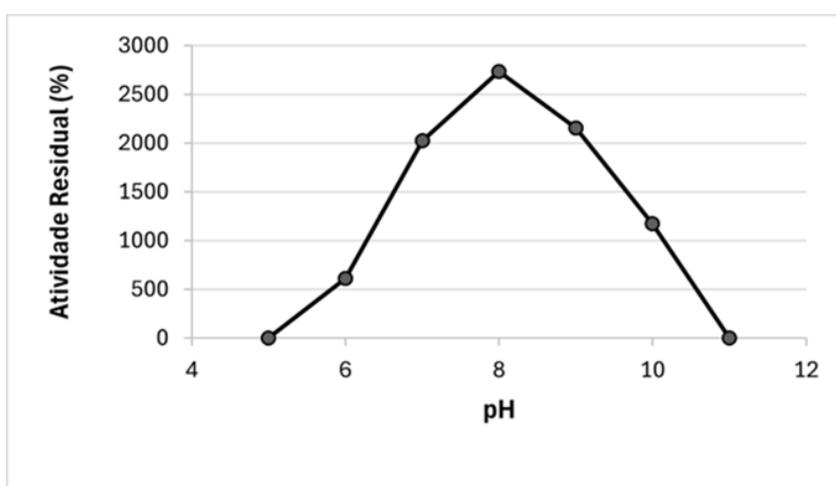
3.4 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PURIFICADA DE *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03)

3.4.1 EFEITO DO PH NA ATIVIDADE DA PROTEASE

A atividade da protease foi avaliada em diferentes valores de pH (Figura 2). A enzima apresentou atividade na faixa de pH alcalino de 7,0–9,0, com um ótimo em pH 8,0. A atividade enzimática foi drasticamente reduzida em pH abaixo de 7,0 e acima de 9,0, indicando que a enzima é sensível a extremos de pH. Em valores de pH mais ácidos, a enzima ficou inativa, o

que sugere uma provável desnaturação da estrutura enzimática devido às condições inadequadas para a estabilidade da proteína. Da mesma forma, em pH acima de 10,0 a perda de atividade pode estar associada à alteração conformacional da enzima, uma vez que altas concentrações de íons hidroxila interferem nos sítios ativos responsáveis pela catálise.

Figura 3. Curva de pH ótimo da protease de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03)



Fonte: Autor, 2024.

Resultados semelhantes foram encontrados por Da Silva *et al.*, (2018), onde a serino-protease de *Aspergillus tamarii* URM4634, apresentou atividade na faixa de pH alcalino 7,9-9,0 com pH ótimo de 9,0. Assim com a protease analisada por Da Silva *et al.*, (2018), a protease obtida de *T. koningiopsis* (UFPIT03) possui características compatíveis com proteases alcalinas, que podem ter a maior atividade nessa faixa devido a uma ligação da enzima com o substrato mais específica (Da SILVA *et al.*, 2018), devido ao pH ter a capacidade de interferir no crescimento e na regulação metabólica dos microrganismos, por conta da sensibilidade à variações na concentração de íons hidrogênio do meio (SATTAR *et al.*, 2019).

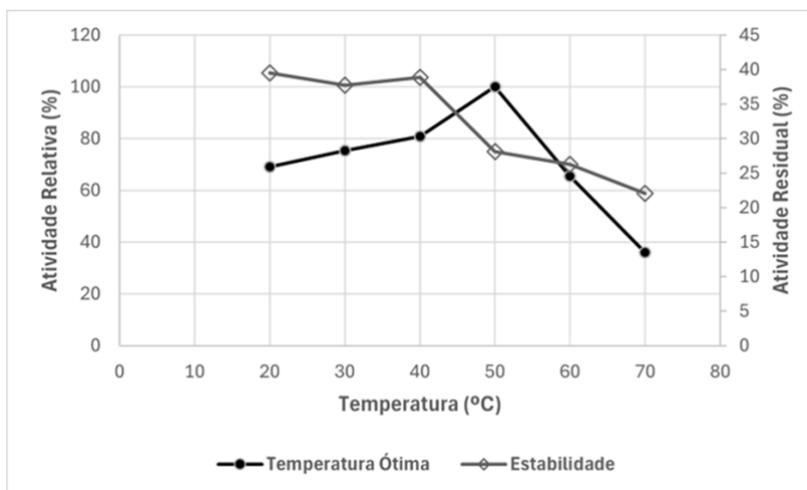
As proteases alcalinas representam o maior grupo de enzimas industriais, ocupando uma fatia significativa do mercado devido à sua ampla aplicação e importância em diversos setores.

Essas enzimas são amplamente utilizadas em processos industriais, como nas indústrias de detergentes, couro, alimentos e farmacêutica. Tais aplicações evidenciam a versatilidade e relevância das proteases alcalinas, destacando sua capacidade de atuar de forma eficiente em condições alcalinas (MEENA & SINGH, 2024).

3.4.2 EFEITO DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA PROTEASE

As condições ideais de temperatura e a estabilidade térmica da atividade proteolítica dos cultivos foram investigadas (Figura 3). A máxima atividade da protease foi encontrada a 50°C. A enzima demonstrou grande estabilidade térmica ao manter uma alta atividade residual de 100%, mesmo após 6 horas de incubação entre 20°C e 40°C; portanto, a atividade enzimática foi bastante resistente nessas condições. Temperaturas acima de 50°C causaram uma queda significativa no nível de atividade observada da enzima com base em restrições térmicas; a atividade residual começou a diminuir após atingir os 50°C e chegando a cerca de 25% em 70°C, sugerindo que a estabilidade da enzima é comprometida em temperaturas mais altas.

Figura 4. Curva de temperatura ótima e estabilidade após 6 horas da protease de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03)



Fonte: Autor, 2024.

Estes resultados estão em linha com pesquisas anteriores realizadas por Rocha et al (2021), onde constataram que as proteases de *Aspergillus sydomyi* URM5774 possuem sua

temperatura ideal de atuação em 45°C e apresentam estabilidade entre 35°C e 50°C; por sua vez JU et al (2023), determinaram uma temperatura óptima de 50°C para protease do *Aspergillus flavipes*; também é relevante ressaltar que segundo JAMILU et al (2022), as proteases dos *Aspergillus spp* alcançam temperaturas ideais entre 40°C e 45°C.

Esses resultados indicam que a enzima protease de *T. koningiopsis* (UFPIT03) funciona melhor em temperaturas moderadas e mantém sua atividade ótima 50°C com estabilidade térmica entre 20°C e 40°C. Esse padrão é benéfico para aplicações biotecnológicas que necessitam estabilidade da atividade enzimática em temperaturas controladas, evitando danos por desnaturação.

3.4.3 EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DA PROTEASE

Os resultados dos efeitos dos íons (Tabela 2) demonstraram diferenças importantes, indicando que a interação entre a protease e os íons testados pode afetar a atividade catalítica desta enzima. A análise revelou que KCl, NaCl, MgSO₄ e CaCl₂ não interferiram significativamente na atividade proteolítica, mantendo níveis próximos ou iguais ao controle, sugerindo que esses íons não exerceram efeitos inibitórios ou ativadores relevantes.

Tabela 2. Atividade enzimática residual frente a íons metálicos (10mM). Fonte: Autor, 2024.

Íons	Atividade Residual (%)
Controle	100%
MgSO ₄	95,4±0,07
AlCl ₃	43,1±0,03

ZnSO ₄	58,6±0,02
KCl	100,0±0,03
CuSO ₄	53,9±0,01
NaCl	100,5±0,01
CaCl ₂	96,6±0,01

Por outro lado, os cátions AlCl₃, ZnSO₄ e CuSO₄ apresentaram efeitos inibitórios, reduzindo a atividade enzimática para 43,1%, 58,6% e 53,9%, respectivamente. Esses resultados sugerem que tais metais podem interagir com resíduos específicos da enzima, modificando sua estrutura ou função catalítica. Em concordância com Da Silva et al. (2018), Zn²⁺ inibiu significativamente a atividade da serina-protease, comportamento também descrito para outras proteases em estudos anteriores. A maior inibição no presente trabalho foi observada com AlCl₃, indicando uma interação mais intensa desse cátion com a enzima. Os dados apresentados corroboram parcialmente os achados de Sattar, Aman e Qader (2017), que relataram inibição da protease de *Aspergillus niger* por Cu²⁺ e Al³⁺.

Em conclusão, esses dados destacam a importância dos íons metálicos na modulação da atividade enzimática, sugerindo que a escolha de cátions adequados pode ser uma estratégia importante para otimizar a funcionalidade de proteases em aplicações industriais.

3.4.4 EFEITO DE SURFACTANTES E INIBIDORES NA ATIVIDADE DA PROTEASE

Entre os surfactantes testados, o SDS apresentou um aumento significativo na atividade enzimática, atingindo 159,5%, o que sugere que esse surfactante pode ter atuado como um agente capaz de facilitar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima ou de estabilizar sua

estrutura (Tabela 3). As descobertas sugerem que o uso controlado de SDS pode ser uma estratégia promissora para melhorar a solubilidade e a atividade de proteínas (Mu *et al.*, 2024).

Essa ativação na presença de SDS também reforça seu potencial como componente em formulações de detergentes, conforme relatado por Da Silva *et al.* (2018), que observaram um aumento expressivo na atividade residual de uma serina-protease de *Aspergillus tamaritii* URM4634, alcançando 191,4% e 348,7% em concentrações de 1% e 10%, respectivamente. Bajpai & Tyagi (2007) e Niyonzima & More (2015) sugerem que esse comportamento é resultado da interação entre as cargas negativas do SDS e os íons cálcio e magnésio presentes na água dura, desativando-os e, assim, favorecendo a atividade enzimática.

Tabela 3. Atividade enzimática residual frente a surfactantes e inibidores (10mM). Fonte: Autor, 2024.

Surfactantes	Atividade Residual (%)
Controle	100%
SDS	159,5±0,03
Tween 20	103,2±0,04
Tween 80	104,7±0,03
Triton X-100	124,7±0,05
Inibidores	

EDTA	100±0,01
PMSF	100±0,01
Pepstatina A	100±0,02
Benzamidina	100±0,04

O TritonX-100 também promoveu um aumento considerável na atividade, atingindo 124,7%. Resultados semelhantes foram reportados por Da Silva et al. (2018), que demonstraram um aumento na atividade residual da serina-protease em concentrações de 1% e 10% de Triton X-100, com valores de 90,1% e 121,5%, respectivamente. Esses dados corroboram a capacidade do Triton X-100 em melhorar ou manter a estabilidade de proteases em formulações contendo surfactantes não iônicos.

Por outro lado, os surfactantes não iônicos Tween 20 e Tween 80 não apresentaram efeitos significativos no presente estudo, mantendo a atividade residual próxima ao controle, com valores de 103,2% e 104,7%, respectivamente. Em contraste, Da Silva et al. (2018) observaram um comportamento variável para essas mesmas enzimas, com aumentos moderados de 111,9% e 94,4% para o Tween 20 e Tween 80, respectivamente, em concentrações de 1%, e incrementos mais evidentes em 10%, atingindo 132,1% e 109,5%. Esses resultados indicam que o desempenho de surfactantes não iônicos, como Tween 20 e Tween 80, pode variar conforme o tipo de enzima e suas interações com o microambiente, como também relatado por Raval et al. (2014).

Ao analisar dos inibidores (EDTA, PMSF, Pepstatina A e Benzamidina) revelou que nenhum dos compostos testados interferiu na atividade enzimática, com valores de 100%, indicando que a protease não foi inibida por esses agentes. Esse resultado sugere que a enzima

pode não depender de íons metálicos específicos, já que EDTA não causou inibição, e que também não é afetada por inibidores comuns de serino, ácido ou proteases de cisteína, como PMSF, Pepstatina A e Benzamidina, respectivamente.

Esses dados indicam a estabilidade e resistência da protease frente a condições que normalmente afetam outras enzimas, o que reforça seu potencial para aplicações industriais em ambientes contendo surfactantes e inibidores.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram a viabilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato para a produção sustentável de proteases colagenolíticas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) por fermentação em estado sólido. O objetivo de desenvolver um processo eficiente e sustentável foi atingido, evidenciado pela obtenção de enzimas com atividade ótima em pH alcalino (8,0) e boa estabilidade térmica. Essas características destacam a relevância das enzimas para aplicações industriais em setores como alimentos, cosméticos e processamento de resíduos. As contribuições deste estudo não apenas ampliam o conhecimento sobre a biotecnologia de fungos filamentosos, mas também reforçam o potencial de abordagens sustentáveis para a valorização de resíduos, oferecendo soluções inovadoras e economicamente viáveis para a indústria.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar profunda gratidão à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio essencial aos projetos de pesquisa. O fomento concedido pela FACEPE tem sido fundamental para impulsionar a inovação científica, fortalecer nossas atividades de pesquisa e contribuir para o avanço do conhecimento em diversas áreas estratégicas.

5. REFERÊNCIAS

- BAJPAI, D; Tyagi, V.K. Laundry detergents: an overview. *Journal of oleo science*, v. 56, n. 7, p. 327-340, 2007.
- CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M.. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by aspergillus brasiliensis strain BCW2. *Scientific African*, v. 8, p. E00398, 2020.
- COLLA, L. M. et al. Simultaneous production of proteases and antioxidant biopeptides by solid-state fermentation. *Sustainable Food Technology*, v. 1, n. 6, p. 874-885, 2023.
- COSTA S., M. et al.. Production of milk-coagulating protease by fungus pleurotus djamor through solid tate fermentation using wheat bran as the low-cost substrate. *Preparative Biochemistry e Biotechnology*, p. 1-7, 2024.
- DA SILVA, O. S, et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus Tamarii* URM4634. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 117, p. 1081-1088, 2018.
- DA SILVA, O. S.et al. Novel protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Advances In Enzyme Research*, v 4, n. 04, p. 125-143, 2016.
- DARANAGAMA, N. D., SHIOYA, K., YUKI, M., SATO, H., OHTAKI, Y., SUZUKI, Y., SHIDA, Y., & OGASAWARA, W. (2019). Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* in cellulase-inducing condition reveals a role for trichodermapepsin (TrAsP) in cellulase production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 46(6), 831–842. <https://doi.org/10.1007/S10295-019-02155-9>.
- HADIZA, J., ELEWECHI, ONYIKE., SITI, HANA, NASIR.. Otimização da produção de protease utilizando residuos agropecuarios por *Aspergillus* spp. Em uma fermentação em estado solido. *Revista Internacional de avanços científicos*, 2022.

ISMAIL, N.; ZAINUDDIN, E. Z. Effects of precipitation methods on the properties of protease extracted from starfruit (*averrhoa carambola* l.) Of different maturity index. *Scientific Research Journal*, v. 12, n. 1, p. 11-23, 2015.

KABIR, M.D. FAUZUL; JU, L. On Optimization of enzymatic processes: temperature effects on activity and long-term deactivation Kinetics. *Process Biochemistry*, v. 130, p. 734-746, 2023.

LONDOÑO-HERNANDEZ, L. ET AL. Advantages and progress innovations of solid-state fermentation to produce industrial enzymes. *Microbial enzymes: Roles and applications in industries*, p. 87-113, 2020.

MANZAR, N. ET AL. Trichoderma: advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. *Sustainability*, v. 14, n. 19, p. 12786, 2022.

MU, J. et al. Re-engineering lysozyme solubility and activity through surfactant complexation. *Materials Advances*, v. 5, n. 21, p. 8515-8523, 2024.

NASCIMENTO T.P. et al. Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. *ADV ENZYME RES* 3: 81-91, 2015.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. 3 Biotech, v. 5, p. 61-70, 2015.

RANJAN, P. et al. Application of enzymes in biomass waste management. In: valorization of biomass wastes for environmental sustainability: greenpractices for the rural circular economy. Cham: Springer nature switzerland, p. 189-205, 2024.

RAVAL, V.H. et al. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 6, p. 955-962, 2014.

ROCHA, F. T.B. ET AL. Purification and characterization of a characterization of protease from *Aspergillus sydwwii* URM5774: coffee ground residue for protease production by solid

state fermentation. *Anais da academia brasileira de ciências*, v. 93, n. SUPPL 3, p. E20200867, 2021.

SANTANA, R. DA S., FARIAS, V. G. DE, SEVALHO, E. DE S., CANDIDO, K., CARPIO, K. C. R., GOMES, W. R., & CARVALHO, R. (2022). Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years. *Research, Society and Development*, 11(14), e530111436652. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36652>

SATTAR, H.; AMAN, A.; QADER, S. A. U. Effect of metal ions, solvents and surfactants on the activity of protease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Journal of Basic & Applied Sciences*, v. 13, p. 491-495, 2017.

SATTAR, HAFSA et al. Degradation of complex casein polymer: production and optimization of a novel serine metalloprotease from *Aspergillus niger* KIBGE-IB36. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101256, 2019.

SCHALAMUN, M.; SCHMOLL, M.. *Trichoderma*—Genomes and genomics as treasure troves for research towards biology, Biotechnology and Agriculture. *Frontiers in Fungal Biology*, v. 3, p. 1002161, 2022.

SHAHNAZ, E. ET AL. *Trichoderma*-plant interactions for sustainable crop production under organic farming systems. *Futuristic trends in agriculture engineering & food sciences*, BOOK 22, v. 3, p.170-182, 2024.

SOUSA, T. DE O., RAMOS, A. V. DA S., PINOTTI, T. I., SANTOS, A. M. G., & NASCIMENTO, T. P. (2024). Utilização de resíduos agroindustriais como substratos para produção de proteases coagulantes do leite por *Trichoderma* spp. Isolado do cerrado piauiense (pp. 414–434). Instituto Internacional Despertando Vocações. <https://doi.org/10.31692/978-65-88970-43-0.414-434>

YANG, X. ET AL. Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma Asperellum* in *Pichia pastoris*. *World Journal of microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 2087-2094, 2013.

ZHANG, K.; HAN, Y. Thermostable bacterial collagenolytic proteases: A Review Journal of Microbiology and Biotechnology v. 34, n. 7, p. 1385, 2024.

CAPÍTULO 2 - PATENTE



23/08/2023 870230074688
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

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:

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:

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND

Utilidade (54): 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 colagenase 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

Inventor 1 de 12

Nome: ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO

CPF: 25514776468

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua José Paraíso, n. 25, Apto 1701,Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51030-390

País: BRASIL

Telefone: (81) 991 051528

Fax:

Email: analuporto@yahoo.com.br

Inventor 2 de 12

Nome: ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA

CPF: 04399311428

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Padre Antônio Fernandes, 66, Cordeiro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50630-010

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 172610

Fax:

Email: romero.brandao@upe.br

Inventor 3 de 12

Nome: KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

CPF: 11157415431

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Gregório de Matos Guerra, 100, Zumbi do Pacheco

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 54230-422

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 696930

Fax:

Email: kethybarbara@gmail.com

Inventor 4 de 12

Nome: ROMUALDO BRANDAO COSTA JUNIOR

CPF: 04375271400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Padre Antônio Fernandes, 66, Cordeiro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50630-010

País: BRASIL

Telefone: (81) 995 931015

Fax:

Email: romualdo.brandao@outlook.com

Inventor 5 de 12

Nome: JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA

CPF: 06743387401

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Avenida José Francisco dos Santos, Nº668, casa 03, Pau Amarelo

Cidade: Paulista

Estado: PE

CEP: 53435-590

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 103851

Fax:

Email: juanizematias@yahoo.com.br

Inventor 6 de 12

Nome: VIVIANNE FERREIRA ARAUJO BRANDAO

CPF: 05245807408

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Padre Rodrigues Campelo, 398, Rua Padre Rodrigues
Campelo, 398

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50730-050

País: BRASIL

Telefone: (81) 986 001428

Fax:

Email: vivianne.araujo@ufrpe.br

Inventor 7 de 12

Nome: DANIELA DE ARAUJO VIANA MARQUES

CPF: 00785395440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Arnobio Marques, Santo Amaro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50100-130

País: BRASIL

Telefone: (81) 995 047420

Fax:

Email: dani.viana@yahoo.com.br

Inventor 8 de 12

Nome: RAQUEL PEDROSA BEZERRA

CPF: 03304394486

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: 1ª Travessa Bezerra de Menezes, 54

Cidade: Camaragibe

Estado: PE

CEP: 54753-181

País: BRASIL

Telefone: (81) 332 06345

Fax:

Email: rpbezerra@yahoo.com.br

Inventor 9 de 12

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

Nome: RAPHAEL LUIZ ANDRADE SILVA

CPF: 08177728474

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Lage do Una, 23, Mangabeira

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52110-455

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 403674

Fax:

Email: raphaelluizandradesilva@gmail.com

Inventor 12 de 12

Nome: MARIA ERCILIA DE LIMA BARREIRO

CPF: 05042557466

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Arnóbio Marquês. 310,Santo Amaro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50100-130

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 157926

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	COMPROVANTE DE PAGAMENTO.pdf
Portaria	PORTARIA 119-220 DIRETOR NEI - LEONARDO FERRAZ.pdf
Procuração	Procuracao - UFPE.pdf
Procuração	Procuração - UPE.pdf
Procuração UFPI	Procuração - UFPI.pdf
Relatório Descritivo	1-Relatório_Descritivo_Patente_Filme.pdf
Reivindicação	2-Quadro_Reivindicatório_Patente_Filme.pdf
Resumo	0-Resumo_Patente_Filme.pdf
Desenho	3-Desenhos_Patente_Filme.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético

Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

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

Campo da invenção

[01] Essa invenção pertence ao setor técnico de biotecnologia e cuidados com a saúde. Descreve um produto inovador à base de quitosana e nanopartículas de prata associadas a hidrolisado de colágeno, com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e pró-cicatrizantes, para o tratamento de lesões cutâneas em humanos e animais. Esse produto, obtido por um processo específico, apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas. Além disso, destaca-se o baixo custo relativo da quitosana e o alto teor de substâncias benéficas do hidrolisado de colágeno. A aplicação desse produto e processo pode beneficiar indústrias médicas, veterinárias, cosméticas, de curativos e farmacêuticas, ampliando as opções terapêuticas e promovendo avanços no cuidado da pele e cicatrização de feridas. Essa inovação representa uma contribuição significativa para a área, oferecendo um produto eficaz e versátil para o tratamento de ferimentos em diversas aplicações e setores industriais. Além disso, o uso desses biofilmes pode ser explorado em outras indústrias relacionadas à saúde, como a cosmética e a fabricação de curativos.

Fundamentos da invenção

[02] A cicatrização ocorre em várias fases distintas. A primeira fase é a inflamatória, que envolve a vasoconstrição seguida de vasodilatação em resposta à cascata de coagulação e às vias do complemento (Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *Int. J. Inflamm.*, 2019). A fase seguinte é a proliferação celular, que inclui a fibroplasia, onde ocorre a síntese e deposição da matriz extracelular; a granulação, caracterizada pela formação de tecido rico em vasos neoformados, macrófagos e fibroblastos; a contração tecidual, que ocorre em feridas abertas, queimaduras profundas, deiscência ou feridas tratadas com enxertos cutâneos, permitindo o fechamento da ferida sem a formação de novo tecido.

[03] Por fim, a epitelização, onde ocorre a migração de queratinócitos e a mitose de células epidérmicas para cobrir a ferida a partir da camada basal (Tan, S. T., & Dosan, R. Lessons From Epithelialization: The Reason Behind Moist Wound Environment. *The Open Dermat. J.* 2019). Após a fase de proliferação celular, ocorre a remodelação da ferida, que envolve a síntese, degradação e orientação das fibras colágenas.

[04] Existem várias opções de coberturas e substitutos de pele disponíveis comercialmente para otimizar o processo de cicatrização. Essas opções variam desde gaze estéril a procedimentos mais sofisticados. Discutiremos alguns exemplos abaixo.

[05] 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 a 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 e Tufail. Perf. Eval. Anti Pilling and Easy-Care Finished Rayon and Rayon/Cotton Satin Fabric. *Jour. Nat. Fib.* Vol. 19; nº3, 2020).

[06] 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. Prep. and Phys. Prop. of Cav. Calc. Alg. Wound Dressings. *AMR* 332–334, 1670–1675. 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. Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. *IWJ.* V.5, Pg. 602 – 613. 2008).

[07] Já coberturas de espuma que além de possuir alta capacidade de absorção do exsudato, possui maior permeabilidade ao vapor e promove maior amortecimento, mas ainda precisam de trocas frequentes e podem atingir maiores espessuras que suas concorrentes, delimitando as áreas de uso (Santamaria et al. *Clinical perf. Charact. for*

bord. foam dress. in the treat. of complex wounds: An int. wound dress. Tech. Exp. panel review. Int Wound J. Pg.1–7; 2023).

[08] Buscando reduzir a toxicidade e rejeição as opções também são usadas matrizes biopoliméricas como celulose e colágeno, que além da biocompatibilidade, fornecem suporte estrutural e estimulam a cicatrização (Tenorová et al., Prep. and eval. of bilayer films based on collag. and carboxymethylcellulose for wound therapy. Ceska a Slovenska farmacie. Pg. 229-236. 2019). Entretanto o custo elevado da obtenção desses materiais limita seu uso. (Dai, C., Shih, S., & Khachemoune, A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. Journal of Dermatological Treatment, 2020).

[09] Ainda podemos listar como alternativa a terapia a vácuo, terapia com oxigênio hiperbárico, enxertos de pele, suturas e pontos e desbridamento cirúrgico. No entanto, nenhuma dessas opções demonstra superioridade em acelerar a cicatrização e prevenir a infecção autóloga, sendo necessária a combinação com outros tratamentos e, conseqüentemente, o aumento nos processos e no custo.

[0010] 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 possuam ação antimicrobiana, acelerando assim o processo de cicatrização. Neste sentido, esta patente propõe um produto composto nanopartículas de prata agregadas a peptídeos de colágeno imobilizados em biofilme de polissacarídeos e seu processo de obtenção. Uma vez que os peptídeos de colágeno associados ao biofilme podem atuar na cicatrização e as nanopartículas de prata promovem uma ação antimicrobiana fornecendo um produto completo. Além disso, o processo de obtenção desse produto, descrito no presente invento é composto por etapas simples e matéria prima barata, ampliando assim sua possibilidade de uso.

[0011] Os documentos que antecedem a presente patente descrevem produtos e processos que não atendem a todas as necessidades do mercado atual, como pode ser observado nos documentos patentários a seguir.

[0012] A patente PI08038074A descreve o processo de obtenção de sistema de liberação controlada de fármacos Lipofílicos com base em filme multicamada constituído por uma camada de polímero biodegradável de quitosana e outra do mesmo polímero contendo o fármaco disperso. A presente invenção se diferencia da patente PI08038074A ao

oferecer propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa, baixo custo relativo com a utilização da quitosana e alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno. Além disso, a sua inovação é versátil e possui aplicações em diversos setores, ampliando as opções terapêuticas para o tratamento de feridas e lesões cutâneas.

[0013] A patente BR1320130338671E2 dispõe de um produto para tratamento de lesões cutâneas complexas em pele humana e animal, produzido a partir de filme de quitosana, ácido (orgânico ou inorgânico) e fração hidroalcoólica de Barbatimão das espécies *Stryphnodendron obovatum*, *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron poyphyllum*. Esta invenção difere da patente BR1320130338671E2 ao oferecer um biofilme cicatrizante formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), associado a nanopartículas de prata associadas a peptídeo de colágeno. As vantagens incluem propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa, baixo custo relativo com a utilização da quitosana e alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno, além de ampla aplicação em diversos setores.

[0014] A patente BR01020190023708A2 descreve filme a base de quitosana e zeína para liberação controlada de antimicrobianos como ácido elágico. Obtendo atividade contra *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*. Diferente da patente PI08038074A, o presente invento oferece propriedades antimicrobianas aprimoradas com as nanopartículas de prata, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa. Em comparação com a patente BR1320130338671E2, destaca-se pelo baixo custo relativo da quitosana e da galactomanana extraída de *Cassia grandis*, alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno e ampla aplicação em diversos setores. Além de oferecer propriedades antimicrobianas aprimoradas e um amplo espectro de atividade contra microorganismos patogênicos. Essas vantagens tornam o presente invento uma opção eficaz, versátil e economicamente viável para o tratamento de feridas e lesões cutâneas.

[0015] A patente BG66767B1 refere-se a uma composição biologicamente ativa para tratamento de feridas crônicas contendo protease, glicerina, hidrolisado de colágeno, íons de magnésio e zinco, vitaminas e anti-sépticos. Sendo previsto para uso de tratamento de defeitos da pele, como picadas, inflamação em queimaduras ou insetos, atingindo hematoma de ferimento, para líquen ou sarna de psoríase e afins. A presente

patente apresenta vantagens distintas em relação à patente BG66767B1, destacando-se pela presença de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas aprimoradas e liberação controlada da substância ativa. Além disso o biofilme é relativamente mais barato uma vez que é composto por quitosana e galactomanana e pode ser obtido de fontes diversas, facilitando sua extração. Além disso, a protease com atividade colagenolítica e os peptídeos de colágeno aceleram o processo de cicatrização proporcionando uma abordagem eficaz e versátil para o tratamento de diversos tipos de feridas, incluindo picadas, inflamações, queimaduras, lesões cutâneas e afins.

[0016] A patente US4060081A descreve uma pele sintética composta por membrana de múltiplas camadas, cuja primeira camada é formada por hidrolisado de colágeno e polissacarídeo e a segunda camada composta por uma membrana de material sintético como resinas de silicone, poliacrilato ou ésteres de polimetacrilato ou seus copolímeros e poliuretanos. A presente patente difere de US4060081A por proporcionar biofilme cicatrizante biocompatível, flexível, biodegradável e com capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas complexas.

[0017] A patente EP0187703B1 defende sistema de liberação continuada composto por preparação de quitosana, polímero e fármaco que não inclua uma proteína solúvel em água. A presente invenção difere da citada uma vez que propõe biofilme incorporado com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno, proporcionando não só um produto pró-cicatrização como antimicrobiano.

[0018] A patente BR1020180751573A2 defende o uso de colagenase em composição de creme dermatológico para o tratamento de queimaduras e feridas compreendendo um ingrediente ativo farmacêutico API Sulfadiazina de Prata 1% (10 mg/g) e Colagenase 0,006% 0,6 U/g e um sistema de base para creme hidrofílico. A presente patente difere de BR1020180751573A2 por utilizar biofilme incorporado com nanopartículas de prata (AgNP) associada a hidrolisado de colágeno, favorecendo a epitelização e cicatrização de feridas, além de reduzir as chances de contaminação microbiana pela ação antimicrobiana da AgNP.

[0019] A patente PI96069970A descreve uso de polímeros solúveis em água para liberação controlada de colagenase usado no melhoramento de tecido cutâneo. Diferentemente, a presente patente utiliza blend polissacarídico associado a nanopartículas de prata oriundas de bioativos de origem microbiana. Essa combinação proporciona propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa. Além disso, o biofilme cicatrizante formulado na sua patente possui biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas.

[0020] US109530433B2 apresenta um produto, composto por múltiplos componentes junto a nanopartículas de prata, que propõe tratamento para infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. A presente patente difere de US109530433B2 por associar as nanopartículas de prata a substâncias com ação cicatrizando, possibilitando seu uso no tratamento de feridas. O biofilme cicatrizante formulado nessa patente apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas complexas em humanos e animais.

[0021] A patente US20160220606A1 descreve sistema multicamadas composto por prata coloidal, cobre coloidal e óxido de zinco coloidal misturados em água purificada estéril para tratamento de feridas, funcionando como antimicrobiano. A presente patente difere da citada por utilizar biofilme composto por quitosana e galactomanana associados a nanopartícula de prata com hidrolisado de colágeno, possibilitando o uso tópico de um produto com alta durabilidade, biodegradável e com ação cicatrizante e antimicrobiana.

[0022] A patente KR20120137642A é constituída por nanopartícula de prata atrelada a sulfato de condroitina para tratamento de feridas ao mesmo passo que previne a proliferação de bactérias e assim, acelerando a recuperação do tecido. A presente patente difere de KR20120137642A por apresentar produto com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno associados a biofilme polissacarídico com capacidade de liberação controlada da substância ativa, permitindo uma ação prolongada e eficaz no local da ferida, reduzindo a necessidade de trocas. Ele também promove a estabilidade do ambiente da ferida, mantendo umidade adequada e evitando a desidratação do tecido, bem como biocompatibilidade evitando reações adversas. Além disso, o biofilme polissacarídico é flexível, o que facilita sua aplicação em diferentes tipos de feridas, incluindo feridas complexas. Por fim, seu baixo custo relativo, principalmente devido à disponibilidade e preço acessível da quitosana e da galactomanana, torna essa tecnologia mais viável economicamente.

[0023] A patente WO2018015976A1 descreve produto usado para tratamento de feridas e controle de infecção composto por nanopartículas de prata como agente antibacteriano, um agente antioxidante como ácido gálico e Esfingosina-1-fosfato como indutor da proliferação de células endoteliais. A presente patente difere de WO2018015976A1 ao oferecer um produto que combina nanopartículas de prata, hidrolisado de colágeno e biofilme polissacarídico, proporcionando liberação controlada da substância ativa, estabilidade do ambiente da ferida, biocompatibilidade, flexibilidade e baixo custo.

[0024] WO2014147638A1 descreve matriz para uso em cicatrização de feridas compostas por: algodão, quitosana, nanopartícula de prata e antioxidante, a presente patente diferencia-se por proporcionar produto mais eficaz e economicamente viável para o tratamento de feridas, representando uma inovação significativa no campo da cicatrização e cuidados com a pele.

Breve descrição dos desenhos

[0025] A presente patente é detalhada na imagem a seguir:

A Figura fluxograma do processo de obtenção do produto descrito na presente patente. Onde, [A] representa fórmula geral de galactomanana extraída de *Cássia grandis*; [B] representa fórmula geral de quitosana; [C] representa a junção de [A] e [B] por meio de agitação; [D] ilustra a ação de uma colagenase para formação dos peptídeos de colágeno; [E] representa os peptídeos formados a partir da ação da colagenase; [F] ilustra a Ag⁺ utilizada para formação das nanopartículas de prata (AgNP); [G] representa a união de [E] e [F] para formação de AgNP com hidrolisados de colágeno; [H] simboliza a junção do gel polissacarídico a AgNP para formulação do produto e [I] representa a confecção do biofilme.

Descrição da invenção

[0026] A presente invenção propõe a formulação de um biofilme gerado a partir da fusão de um gel contendo uma mistura de galactomanana extraído das sementes de *Cassia grandis* e quitosana com uma mistura de nanopartículas de prata com peptídeo obtido através da degradação do colágeno tipo IV por colagenases.

[0027] A potencialidade dessa invenção está em conduzir ao mercado um produto que traz a combinação de ingredientes naturais, juntamente com as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata, oferecendo assim uma possível aplicação na área biomédica e veterinária, como em curativos de feridas, dispositivos médicos revestidos e outras aplicações relacionadas à cicatrização de tecidos e prevenção de infecções.

[0028] O produto proposto passa por três etapas distintas para sua obtenção: I. Formação de blend por meio da associação da galactomanana com a quitosana; II. Obtenção das nanopartículas de prata pela união de Ag⁺ com o peptídeo resultante da

quebra do colágeno tipo IV e colagenase industrial; III. Fusão das etapas anteriores para a formação do biofilme. A seguir, serão detalhadas as descrições de cada uma dessas etapas.

[0029] Etapa I: Formação de blend polissacarídico. A formação do gel ocorre pela combinação da galactomanana e da quitosana, dois polissacarídeos, resultando em uma estrutura gelatinosa. O processo envolve os seguintes passos:

[0030] Obtenção da galactomanana: A galactomanana é um polissacarídeo presente nas sementes de leguminosas, sendo particularmente abundante nas sementes de *Cassia grandis*. Sendo assim, preferencialmente deve ser realizada a coleta e lavagem das sementes de *Cassia grandis* utilizando desinfetantes químicos como álcool, peróxido de hidrogênio, clorexidina ou, preferencialmente, hipoclorito de sódio em baixas concentrações, preferencialmente 0,1% para remoção de impurezas e redução da contaminação microbiana. As sementes devem passar por secagem e trituração.

[0031] O extrato vegetal é obtido por meio de agitação de solução composta por solução salina, preferencialmente NaCl a 0,15 mol/L e da farinha de sementes de *Cassia grandis*. A agitação pode ser realizada por meio de agitador magnético, mecânico ou orbital, preferencialmente orbital, no período de 1h a 24h, preferencialmente 4h, em temperatura de 4°C a 16°C, preferencialmente 4°C. Após o período de agitação, o extrato deve ser centrifugado em velocidade média de 11.180xg entre 10 a 20 min, preferencialmente 15 min, para remoção de impurezas com densidade mais elevada.

[0032] Obtenção da quitosana: A quitosana, um polissacarídeo derivado da quitina, é geralmente comercializada na forma de um pó ou flocos. A obtenção de quitosana a partir de quitina envolve a remoção seletiva da N-acetilação, resultando em um polímero mais solúvel em meio aquoso. Diferentes métodos de extração podem ser utilizados, incluindo a hidrólise ácida, em que a quitina é submetida à hidrólise com ácido clorídrico ou ácido acético, resultando em uma solução contendo quitosana; a desacetilação alcalina, em que a quitina é tratada com uma solução alcalina, como hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, em altas temperaturas, promovendo a conversão em quitosana; e a desacetilação enzimática, que utiliza enzimas como quitinase e quitosanase para catalisar a desacetilação da quitina em quitosana, sendo um método mais suave que preserva as propriedades funcionais do polímero.

[0033] Mistura das soluções: a solução de galactomanana (0,5% a 1,5%,

preferencialmente 1%) é adicionada gradualmente à solução de quitosana (1% a 2%, preferencialmente 1%) sob agitação constante. Durante esse processo, as cadeias moleculares da galactomanana interagem com as da quitosana, promovendo a formação de ligações físicas eletrostáticas e interações moleculares, resultando na formação do gel.

[0034] Etapa II: Síntese de nanopartículas de prata. A síntese das nanopartículas de prata pela união de Ag⁺ com um peptídeo resultante da quebra do colágeno tipo IV e colagenase industrial envolve um processo complexo que combina a ação enzimática da colagenase sobre o colágeno tipo IV, resultando em fragmentos de peptídeos específicos, essa reação deve ocorrer por pelo menos 30min, preferencialmente durante 1 hora a 37°C. Esses fragmentos são posteriormente combinados com íons de prata, resultando na formação das nanopartículas de prata. A união entre os fragmentos de colágeno e a prata ocorre por meio de interações eletrostáticas ou ligações covalentes. Durante a reação, os íons de prata são reduzidos, levando à formação das nanopartículas. Esse processo pode durar de 5 minutos a 1 hora, preferencialmente durante 1 hora para garantir o máximo aproveitamento.

[0035] Etapa III: Formação do Biofilme. As soluções contendo a mistura de polissacarídeos e a AgNP com hidrolisado de colágeno são combinadas para formação completa do biofilme, essa mistura deve, preferencialmente, estar na proporção de 1:100. Após a mistura completa das soluções, o sistema é deixado em repouso para permitir que o gel se forme. Esse período de repouso é conhecido como gelificação, no qual ocorrem interações mais fortes entre as cadeias moleculares da galactomanana e da quitosana, resultando na formação de uma matriz gelatinosa estável.

[0036] O processo de formação do biofilme envolve a combinação sinérgica de componentes bioativos. A associação da galactomanana com a quitosana forma um gel que proporciona uma matriz polimérica tridimensional estável, essencial para o suporte estrutural e adesão celular, importantes na engenharia de tecidos e regeneração de tecidos danificados. As nanopartículas de prata, carregando o peptídeo do colágeno tipo IV obtido pela quebra com colagenase industrial, conferem ao biofilme atividade antibacteriana e propriedades bioativas, inibindo o crescimento de micro-organismos indesejados e interagindo com células e tecidos para uma resposta biológica adequada. Essa fusão de componentes resulta em um biofilme com características distintas, como

estabilidade, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e potencial regenerativo.

Exemplos de concretizações da invenção

[0037] A presente invenção é mais bem descrita de acordo com os exemplos a seguir:

Exemplo 1: Obtenção da galactomanana.

[0038] As sementes de *Cassia grandis* foram coletadas na zona rural do estado de Pernambuco, no município de Angelim (Brasil). O espécime botânico foi identificado no Herbário DÁRDANO DE ANDRADE LIMA do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), onde foi depositado um Voucher [Identificação Botânica N°32/2011; Código de identificação IPA-102.086; *C. grandis*. As sementes coletadas foram limpas com hipoclorito de sódio a 0,1% e trituradas até pó para obtenção de uma farinha fina e o extrato aquoso foi obtido utilizando pó seco (10:90, p/v) em solução de NaCl 0,15 mol/L, seguido de agitação em agitador orbital por 4h a 4°C. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 11.180×g por 15min e o sobrenadante foi armazenado a -20°C.

Exemplo 2: Formação de blend polissacarídico.

[0039] O extrato de *Cassia grandis* contendo galactomanana foi incorporado a quitosana comercial em solução aquosa, ambas a 1%, sob agitação constante a 25°C até a formação de um gel.

Exemplo 3: Síntese de nanopartículas de prata.

[0040] A priori, foram sintetizados peptídeos de colágeno a partir da incorporação de colagenases com colágeno do tipo IV, e essa reação ocorreu por Uma hora a 37°C. Após esse período foi adicionada Prata (Ag+) à solução rica em enzima e hidrolisado de colágeno, resultando na nanopartícula de prata (AgNP+E+PC).

Exemplo 4: Formação do biofilme.

[0041] Foi realizada a combinação das soluções dos exemplos 2 e 3, formando um gel rico em polissacarídeo e AgNP agregadas a hidrolisados de colágeno. Foi utilizado a concentração de 0,01% de peptídeo de colágeno nesta mistura, e mesmas concentrações de protease colagenolítica e AgNP. Este material foi então disposto sobre superfície lisa até que atinja a espessura de 1mm e acondiciona a 25°C por 24h.

[0042] Exemplo 5. Análise Histológica da ação do biofilme.

[0043] Todos os tratamentos de animais foram realizados de acordo com os princípios éticos para o trabalho experimental (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório, SBCAL, São Paulo, Brasil, 2013) e o Guia dos Institutos Nacionais de Saúde para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (Publicações NIH No. 8023, revisado em 1978). O procedimento experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (Processo nº 23076.047366/2013-97).

[0044] Em cada experimento, 4 ratos Wistar machos adultos (350 g, 90 dias de idade) foram anestesiados; a região dorsal foi tricotomizada e limpa com iodopovidona e depois com etanol 70% (v/v). A pele foi excisada das costas abaixo do pescoço usando uma punção de aço (1 cm), criando uma ferida de espessura total. Os biofilmes formados foram aplicados sobre as feridas e imediatamente aderidos à cavidade da ferida. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com acesso total a água e comida.

[0045] Após 3, 6, 10 e 14 dias de experimento, as lesões foram medidas quanto ao comprimento e largura, e em seguida, removidas com uma tesoura cirúrgica estéril, garantindo uma margem de pelo menos 2 mm de borda cutânea. Para avaliar a porcentagem de contração da ferida em áreas circulares, foi utilizada a seguinte fórmula: % de contração da ferida = $(\text{Área inicial} - \text{Área no dia X}) / \text{Área inicial} \times 100$. Logo após a remoção das lesões, amostras de pele foram cuidadosamente colocadas em quadrados de papel de filtro e fixadas em uma solução de formalina a 10% tamponada em PBS (pH 7,2). Após um período máximo de 48 horas, os tecidos foram submetidos a cortes histológicos. Para isso, foram desidratados em uma série graduada de etanol, seguido por clarificação em xilenol e, por fim, imersão em cera de parafina. Os cortes obtidos tinham uma espessura de 5 μm e foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Em seguida, as lâminas de vidro foram montadas para análise microscópica. Esse procedimento permitiu a observação detalhada das características histológicas das amostras de pele, fornecendo informações relevantes sobre o processo de cicatrização das lesões. A coloração com hematoxilina e eosina destacou diferentes estruturas celulares, permitindo a identificação e análise das células presentes na região da ferida. Essas etapas metodológicas foram fundamentais para avaliar a evolução das lesões ao longo do tempo e compreender os mecanismos envolvidos no processo de cicatrização. A análise histológica proporcionou uma visão mais aprofundada das alterações teciduais,

auxiliando na interpretação dos resultados obtidos e na obtenção de informações valiosas para a pesquisa.

[0046] Como resultado o curativo proposto na presente invenção aumentou significativamente a velocidade de cicatrização da ferida quando comparado ao controle. A porcentagem de contração da ferida foi determinada para o controle sem tratamento (grupo controle, $51,7 \pm 5,3\%$), biofilme (grupo 2, $65,3 \pm 3,2\%$). Após 3 dias pós-ferimento, há clara abundância de tecido de granulação e neovascularização em tratamentos com o biofilme proposto. Além disso, os grupos com o biofilme apresentaram abundância de tecido de granulação em maturação, o que indica um processo ativo de epitelização da ferida.

REIVINDICAÇÕES

- [01] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, **caracterizada por** conter os ingredientes quitosana, galactomanana, peptídeos de colágeno, enzima, e nanopartículas de prata em uma base hidrossolúvel.
- [02] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o ingrediente quitosana está presente em uma concentração que varia de 0,5% a 1,5% e o ingrediente galactomanana está presente em uma concentração que varia de 1,0% a 2%.
- [03] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** conter ainda os ingredientes peptídeos de colágeno e enzima colagenolítica
- [04] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o ingrediente peptídeo de colágeno está presente em uma concentração que varia de 0,01% a 0,03% e o ingrediente enzima colagenolítica está presente em uma concentração 0,01%.
- [05] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, **caracterizada por** apresentar atividade cicatrizante e antibacteriana.

[06] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato dos compostos quitosana, galactomanana, peptídeos de colágeno e enzima apresentarem atividade cicatrizante.

[07] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO de acordo com a reivindicação 2, **caracterizada pelo** fato dos compostos nanopartículas de prata apresentarem ação antibacteriana.

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 colagenase 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.

DESENHOS

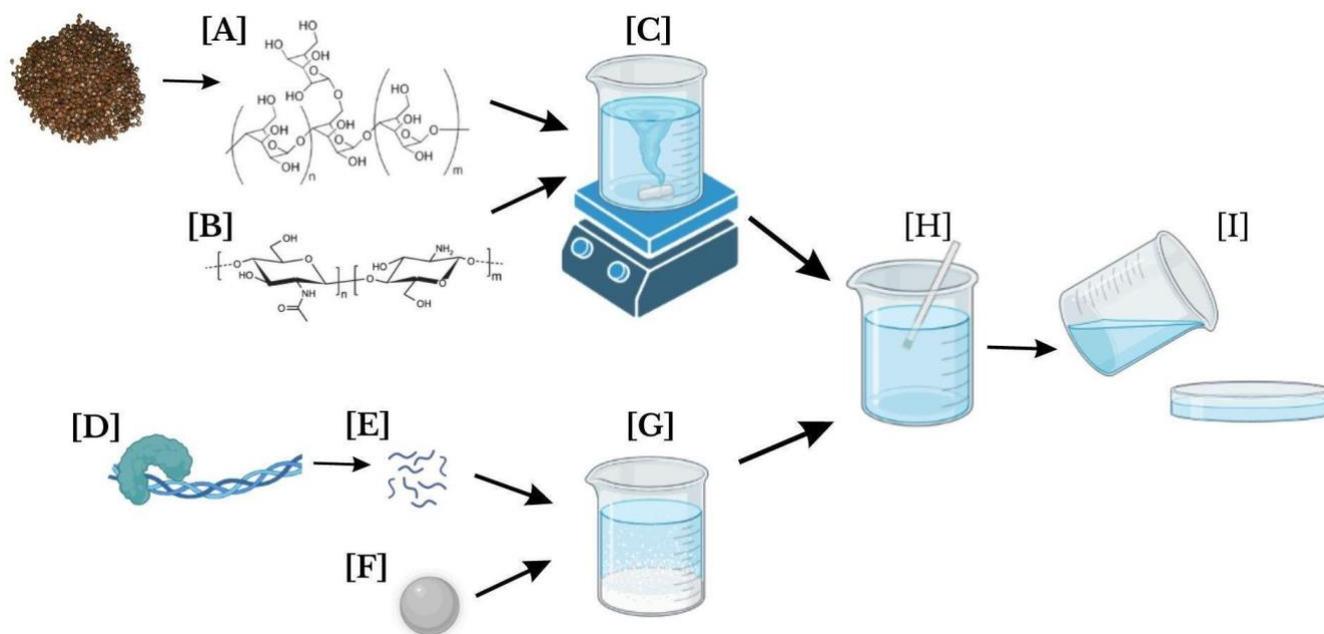


Figura 1

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou a viabilidade de utilizar resíduos agroindustriais como substrato para a produção sustentável de proteases colagenolíticas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) por fermentação em estado sólido. O objetivo de desenvolver um processo eficiente e sustentável foi atingido, evidenciado pela obtenção de enzimas com atividade ótima em pH alcalino (8,0) e boa estabilidade térmica. Sendo assim, torna-se relevante o uso das enzimas colagenolíticas para aplicações industriais em setores como alimentos, cosméticos e processamento de resíduos. As contribuições deste estudo não apenas ampliam o conhecimento sobre a biotecnologia de fungos filamentosos, mas também reforçam o potencial de abordagens sustentáveis para a valorização de resíduos, oferecendo soluções inovadoras e economicamente viáveis para a indústria. Quanto ao desenvolvimento do biofilme cicatrizante a base de quitosana e galactomanana associado a nanopartículas de prata com hidrólise de colágeno, rico em bioativos, apresentam ação hipoalergênica, e são capazes de acelerar o processo cicatricial. Dessa forma, é possível explorar suas propriedades funcionais e possíveis aplicações industriais.