



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA
DE UMA ENZIMA TROMBOLÍTICA PRODUZIDA POR *Bacillus megaterium* (IPA-
CC65) ISOLADO DA CANA DE AÇÚCAR**

Recife, PE

2024

RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA
DE UMA ENZIMA TROMBOLÍTICA PRODUZIDA POR *Bacillus megaterium* (IPA-
CC65) ISOLADO DA CANA DE AÇÚCAR**

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre(a) em ciências farmacêuticas. Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

Coorientador(a): Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento

Recife, PE

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Sobral, Renata Vitória da Silva.

Caracterização bioquímica e estudo da atividade fibrinolítica de uma enzima trombolítica produzida por *Bacillus Megaterium* (IPA-CC65) isolado da cana-de-açúcar / Renata Vitoria da Silva Sobral. - Recife, 2024.

80f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Ana Cristina Lima Leite.

Coorientação: Thiago Pajeú Nascimento.

Inclui referências.

1. Enzima fibrinolítica; 2. *Bacillus megaterium*; 3. Caracterização. I. Leite, Ana Cristina Lima. II. Nascimento, Thiago Pajeú. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL

**CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA
DE UMA ENZIMA TROMBOLÍTICA PRODUZIDA POR *Bacillus megaterium* (IPA-
CC65) ISOLADO DA CANA DE AÇÚCAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produção e Controle de Medicamentos.

Aprovado em: ____/____/2024.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr^a Viviane do Nascimento e Silva Alencar (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr^a Aníbia Vicente da Silva (Examinador Externo)
Instituto Federal de Pernambuco - IFPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a mim por não ter desistido dessa etapa tão importante, a Deus, por me conceder saúde e sabedoria para superar os desafios ao longo desta jornada.

À minha família, que sempre me apoiou e esteve ao lado em todas as minhas decisões. Em especial aos meus pais, Valdiane e Cosme, por seu amor, pela educação e valores transmitidos, ao meu irmão Rafael, minha avó Ivonete por acreditarem em mim e sempre vibrarem com minhas conquistas e ao meu namorado Sérgio por todo apoio e amor.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite e meu coorientador Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento, agradeço profundamente pelas orientações, pela paciência, atenção, por compartilharem seu vasto conhecimento e por acreditarem no meu potencial.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia e Hemoderivados (LBHEMO), Pedro, Josué, Viviane e Thiers, que me ajudaram bastante nessa jornada, pela troca de conhecimento e por deixar a rotina mais leve

Aos meus queridos amigos, Dhebora, Madson, Felipe, Josenildo, Ângelo, Manuella, Guilherme, Sinara, Luanne, Nathali, Allisson, Poliane, que me ofereceram suporte emocional, companheirismo, momentos de descontração e por principalmente acreditarem no meu potencial.

As minhas amigas de apartamento, Maryllian, Taiana e Thais por todo suporte e ajuda no cotidiano corrido e minha gatinha Amora.

Aos meus colegas de trabalho da Hemobrás do SPB, especialmente Milena, Rayssa, Karen, Felipe, Tarcísio e Raquel, por todo apoio na rotina de trabalho que me ajudaram na finalização desse trabalho.

A minha psicóloga Andreia pelo apoio emocional e profissional que foi essencial para minha saúde mental, sua ajuda foi essencial na conclusão desta etapa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) por todo apoio e ao secretário Rilvan, pela disponibilidade de sempre.

A CAPES pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram de alguma forma na conclusão desta etapa.

RESUMO

Doenças cardiovasculares são responsáveis pela maioria das mortes no mundo, causadas por múltiplos fatores, dentre eles a formação de coágulos sanguíneos em artérias ou vasos. As terapias convencionais apresentam alguns efeitos indesejáveis, então surgem como alternativa para tratamento as enzimas trombolíticas, que degradam a fibrina, principal componente dos coágulos. Elas atuam de forma semelhante a plasmina, e são encontradas em diversas fontes, como bactérias. Este trabalho objetivou obter, caracterizar bioquimicamente e analisar a atividade fibrinogenolítica de uma enzima trombolítica produzida por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) isolado da cana de açúcar. A enzima foi produzida utilizando fermentação submersa em um meio de cultura modificado e pré-purificada utilizando um sistema de duas fases aquosas (SDFA) com polietilenoglicol (PEG) e fosfato de sódio. Também foi realizada sua caracterização bioquímica, analisando o efeito da temperatura e pH na atividade e estabilidade da enzima, efeito de inibidores e íons na atividade proteásica, SDS-PAGE, zimograma de fibrina, atividade fibrinogenolítica e degradação trombolítica *in vitro*. O período de fermentação ideal para sua produção foi de 72 horas com uma atividade proteásica de 21,82 U/mL, sendo possível observar que a enzima foi particionada para a fase rica em PEG no SDFA. A enzima pré-purificada demonstrou atividade ótima a 50 °C e no pH10, sugerindo que é uma protease alcalina. Além disso, foi observado que esta é sensível a íons metálicos, especialmente ao manganês, com uma atividade residual de 242,30% e, também, que foi inibida pelo fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF). Indicando assim, seu pertencimento à classe das serino proteases. Sua massa molecular foi de aproximadamente 150 kDa, observando-se também sua atividade sobre o zimograma de fibrina. A enzima demonstrou atividade trombolítica *in vitro* e degradou a cadeia A α , B β e γ do fibrinogênio em poucos minutos. Essas descobertas evidenciam o potencial dessa protease como possível candidata para o desenvolvimento de novas terapias trombolíticas, sendo o próximo passo a avaliação de seu efeito em organismos vivos em novos estudos.

Palavras-chave: Enzima fibrinolítica; *Bacillus megaterium*; Caracterização

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are responsible for the majority of deaths worldwide, caused by the formation of blood clots in arteries or vessels. Conventional therapies present some undesirable effects, thus thrombolytic enzymes which degrade fibrin, the main component of clots, emerge as an alternative treatment. These enzymes act similarly to plasmin and are found in various sources, such as bacteria. This study aimed to obtain, biochemically characterize, and analyze the fibrinogenolytic activity of a thrombolytic enzyme produced by *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) isolated from sugarcane. The enzyme was produced using submerged fermentation in a modified culture medium and pre-purified using an aqueous two-phase system (ATPS) with polyethylene glycol (PEG) and sodium phosphate. Its biochemical characterization included analyzing the effects of temperature and pH on enzyme activity and stability, the impact of inhibitors and ions on protease activity, SDS-PAGE, fibrin zymogram, fibrinogenolytic activity, and in vitro thrombolytic degradation. The ideal fermentation period for its production was 72 hours, with an activity of 21.82 U/mL, showing that the enzyme partitioned to the PEG-rich phase in the ATPS. The pre-purified enzyme exhibited optimal activity at 50 °C and pH 10, suggesting it is an alkaline protease. Additionally, it was observed that this enzyme is sensitive to metal ions, especially manganese, with a residual activity of 242.30%, and that it was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), indicating it belongs to the class of serine proteases. Its molecular mass was approximately 150 kDa, and its activity on the fibrin zymogram was also observed. The enzyme demonstrated in vitro thrombolytic activity and degraded the A α , B β , and γ chains of fibrinogen within minutes. These findings highlight the potential of this protease as a promising candidate for the development of new thrombolytic therapies, with the next step being the evaluation of its effect in living organisms through further studies.

Keywords: Fibrinolytic enzyme; *Bacillus megaterium*; Characterization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1- Tromboembolismo Pulmonar.	17
Figura 2- Cascata de coagulação	23
Figura 3- Via da antitrombina.	25
Figura 4- Regulação e alteração da fibrinólise.	27
Figura 5- Dissolução fibrinolítica de trombos.	28
Figura 6- Comparação da estrutura de <i>Bacillus Megaterium</i> com <i>E. coli</i> .	31
Figura 7- Purificação de enzimas por sistema de duas fazes aquosas.	34
Figura 8- Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE).	36

ARTIGO - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM PROTEASE FIBRINOLÍTICA OBTIDA A PARTIR DE UMA BACTERIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO EM PLANTAS.

Figura 1- Efeito das variáveis no coeficiente de partição da enzima fibrinolítica produzida por <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) após 72 horas de fermentação.	51
Figura 2- Efeito da temperatura e estabilidade na atividade fibrinolítica da enzima produzida por <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65.	52
Figura 3- - Influência do pH e estabilidade na atividade fibrinolítica da enzima produzida por <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65	53
Figura 4- A: SDS-PAGE (12%) para determinar massa molecular da protease fibrinolítica da <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) e B: Zimograma de fibrina	56
Figura 5- Atividade fibrinogenolítica da enzima fibrinolítica produzida por <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) extraída por SDFA na fase PEG.	58
Figura 6-Viabilidade celular da enzima fibrinolítica produzida por <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) em células MDA-MB-231 e J774.A1	59
Figura 7- Aparência visual da atividade hemolítica frente a enzima obtida pelo <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) em diferentes concentrações.	60

LISTA DE TABELAS

ARTIGO - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM PROTEASE FIBRINOLITICA OBTIDA A PARTIR DE UMA BACTERIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO EM PLANTAS.

Tabela 1- Planejamento experimental para extração das proteases com atividade fibrinolítica produzidas por fermentação de <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65), utilizando massa molar de PEG 4000 g/mol.	43
Tabela 2- Produção de protease por <i>Bacillus megaterium</i> (IPA- CC65)	49
Tabela 3- Resultados experimentais de acordo com o planejamento fatorial 2 ² de extração das proteases com atividade fibrinolítica produzidas por <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65) com 72 horas de fermentação utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA).	50
Tabela 4- Influência dos íons metálicos (5mM) na atividade da protease produzida por <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65	54
Tabela 5- Efeito dos inibidores (5mM) na atividade fibrinolítica produzida por <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65.	54
Tabela 6- Influência dos surfactantes na atividade proteolítica de <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65.	55
Tabela 7- : Atividade amidolítica da enzima fibrinolítica de <i>Bacillus Megaterium</i> IPA- CC65 utilizando substratos cromogênicos típicos com 30 minutos de incubação	55
Tabela 8- Tempo de protrombina (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica do <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65)	61
Tabela 9- Tempo de tromboplastina parcial ativada (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica do <i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65)	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Proteína C Ativada
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BPCP	Bactérias Promotoras De Crescimento Em Plantas
DCVs	Doenças Cardiovasculares
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food Drug and Administration</i>
FS	Fermentação Submersa
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
pH	potencial Hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDFA	Sistema de Duas Fases Aquosas
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SIM	Sistema de Informações sobre Mortalidade
TP	Tempo de Protrombina
t-PA	ativador do plasminogênio tecidual
TT	Tempo de Trombina
TPPa	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
TVP	Trombose Venosa Profunda
u-PA	ativador do plasminogênio uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 JUSTIFICATIVA	15
4 REVISÃO DA LITERATURA	16
4.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES	16
4.2 DOENÇAS TROMBÓTICAS	17
4.3 FORMAÇÃO DE TROMBOS SANGUÍNEOS	20
4.3.1 Cascata de coagulação	21
4.2.2 Processo de anticoagulação.....	24
4.4 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS.....	28
4.5 <i>Bacillus megaterium</i> (IPA – CC65)	31
4.6 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	33
4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS.....	35
5 ARTIGO- PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM PROTEASE FIBRINOLITICA OBTIDA A PARTIR DE UMA BACTERIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO EM PLANTAS.....	38
4. CONCLUSÕES.....	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são um grupo de doenças, formadas por: doença arterial periférica, doença cerebrovascular, doença cardíaca reumática, doença cardíaca congênita, trombose venosa profunda e embolia pulmonar, suas condições graves podem gerar um infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC), isso se dá pela formação de coágulos sanguíneos dentro dos vasos ou artérias (Kumar e Sabu, 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2019, aproximadamente 17,9 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares, isso representa cerca de 32% de todas as mortes mundiais. Entre elas, 85% são resultantes de ataque cardíaco e acidente vascular cerebral, afetando homens e mulheres quase igualmente, porém, a doença se desenvolve cerca de sete a dez anos mais tarde nas mulheres quando se compara aos homens (World Health Organization, 2021; Zenych *et al.*, 2020). No Brasil existe um indicador criado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), chamado de Cardiômetro, onde é possível acompanhar o número de mortes por doenças cardiovasculares no país, a estimativa é que até o final de 2024, quase 400 mil cidadãos brasileiros morrerão em decorrência das doenças do coração e da circulação (SBC, 2024).

Formados pela conversão do fibrinogênio em fibrina, os coágulos sanguíneos sofrem ação proteolítica da trombina (Sun *et al.*, 2016). A fibrina pode ser hidrolisada pela plasmina, que é ativada a partir do plasminogênio pelo ativador do plasminogênio tecidual (Shirasaka *et al.*, 2012). A formação desses coágulos de fibrina é regulada pelo sistema biológico, porém, quando não ocorre a hidrólise da fibrina, pode desencadear trombose e outros distúrbios cardiovasculares (Silva *et al.*, 2020)

Nos dias atuais, o tratamento dessas patologias baseia-se no uso de drogas antiplaquetárias e anticoagulantes e também na administração intravenosa de agentes trombolíticos ativadores de plasminogênio, como a uroquinase, a estreptoquinase e o ativador do plasminogênio tecidual. Porém esses agentes apresentam muitas desvantagens, como custo elevado, curto período de ação, baixa especificidade, alta toxicidade, reações alérgicas, além do risco de sangramentos (Nascimento *et al.*, 2017).

Como alternativa as abordagens convencionais, soluções inovadoras que melhorem a segurança da terapia trombolítica vêm sendo estudadas. Entre elas temos as enzimas trombolíticas, que são enzimas importantes para a dissolução de um coágulo sanguíneo, visto que degradam a fibrina, seu principal componente (Silva, M. *et al.*, 2019). Essas enzimas atuam de forma semelhante a plasmina, e são encontradas em diversas fontes. Não se tem relato na literatura de enzimas fibrinolíticas produzidas por bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP).

As cepas de *Bacillus* spp. colonizam solos e tecidos das plantas, produzem compostos bioativos que são envolvidos no crescimento das plantas (Shao *et al.*, 2015; Sharifi e Ryu, 2018). Além disso, as espécies do gênero *Bacillus* são fonte de muitos metabólitos e enzimas de interesse biotecnológico e industrial (Eppinger *et al.*, 2011), sendo assim uma fonte potencial para a obtenção de proteases fibrinolíticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar bioquimicamente e analisar a atividade fibrinolítica de uma enzima trombolítica produzida por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) isolado da cana de açúcar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a enzima trombolítica por fermentação submersa através de *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) isolado da cana de açúcar e purificada por sistema de duas fases aquosas (PEG-SAL);
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada em relação ao seu pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH e temperatura, efeito de inibidores, surfactantes e íons;
- Realizar um zimograma de fibrina
- Determinar atividade fibrinogenolítica da enzima purificada;
- Avaliar a degradação de coágulos de fibrina *in vitro* obtidos a partir de plasma humano;

3 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu como meta a redução de 25% das doenças crônicas não-transmissíveis principalmente as cardiovasculares, câncer e doenças respiratórias crônicas até o ano de 2025. Em Pernambuco, segundo a Secretaria Estadual de Saúde, os problemas de natureza circulatória são responsáveis por 29% das mortes no estado anualmente, dentre estas, o infarto agudo do miocárdio é o maior responsável pelo óbito de pernambucanos representando cerca de 5,5 mil mortes todos os anos. Nesse segmento, a relevância deste projeto se encontra na capacidade de obter e purificar uma protease fibrinolítica utilizando tecnologias simples e de baixo custo. Espera-se ainda ampliar os conhecimentos sobre a aplicação dessas proteases na dissolução de coágulos sanguíneos, o qual tem grande aplicação como fármaco em doenças cardiovasculares como a trombose. Sendo possível, portanto, a obtenção de uma nova tecnologia para o desenvolvimento de um fármaco inovador que não apresente os efeitos colaterais que os fármacos atuais provocam e tenham um menor custo de produção e purificação. Neste sentido há um grande interesse médico, farmacêutico e veterinário do desenvolvimento desses agentes trombolíticos que atuem diretamente nos coágulos de fibrina.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

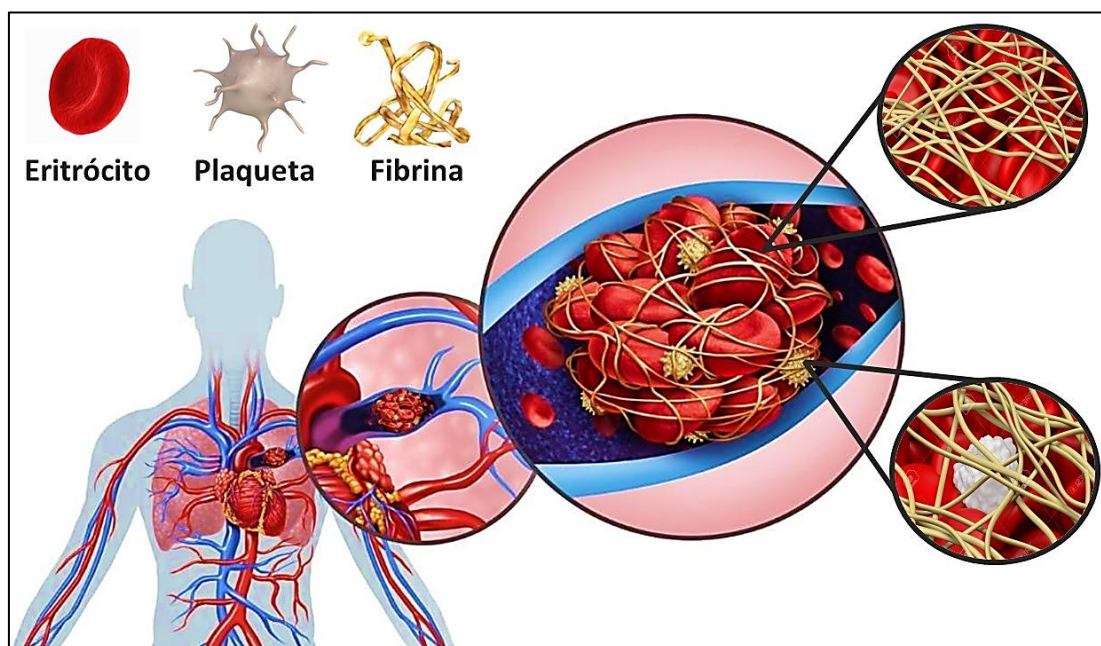
As doenças cardiovasculares (DCVs) afetam o coração e os vasos sanguíneos, incluindo condições como doenças coronarianas, cerebrovasculares, artérias periféricas, reumáticas, congênitas, e trombose venosa. Essas doenças são causadas por um conjunto de fatores de risco, tanto comportamentais quanto subjacentes, que podem levar ao desenvolvimento de complicações graves, como infarto do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca e até mesmo afetar a cognição dos pacientes (Azevedo *et al.*, 2017; Townsend *et al.*, 2022; Zhao, 2021).

As DCVs são a principal causa de morte no mundo, mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa (Malta *et al.*, 2020). De acordo com dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil foi de 188 por 100 mil habitantes em 2021. Essa foi a maior taxa nos últimos 20 anos, sendo mais alta que a taxa dos Estados Unidos de 128 por 100 mil habitantes (OPAS, 2023; Malta *et al.*, 2020). Embora os números absolutos tenham aumentado devido ao crescimento e envelhecimento da população, a taxa de mortalidade ajustada por idade vem diminuindo nas últimas décadas. Comparando os dados entre 1990 e 2019, a taxa de mortalidade teve uma redução de 50,56% no país. Os estados de Alagoas, Maranhão, Pernambuco e Tocantins, são os mais críticos do Brasil, onde a taxa de mortalidade se encontra acima de 200 pessoas por 100 mil habitantes (SBC, 2023).

Algumas das consequências das doenças cardiovasculares pode ser o infarto agudo do miocárdio, infarto cerebral e insuficiência cardíaca que pode causar lesões corporais permanentes e mortais (Lu *et al.*, 2021). Os principais fatores de risco comportamentais para DCVs incluem o consumo excessivo de gorduras saturadas, açúcares e sal, que aumentam os níveis de colesterol e pressão arterial, fatores hereditários, etc (Parikh *et al.*, 2021) (Figura 1). O sedentarismo, que pode levar à obesidade e, conseqüentemente, outros problemas graves para a saúde, como Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes Mellitus e câncer associadas à DCVs (Park *et al.*, 2020). Além disso, o tabagismo aumenta significativamente o risco de doenças cardiovasculares, incluindo infarto do miocárdio e acidentes vasculares corporais.

Pode-se citar também o consumo excessivo de álcool que pode danificar os vasos sanguíneos e aumentar o risco de DCV (Jalali *et al.*, 2021; Rosoff *et al.*, 2020).

Figura 1- Tromboembolismo Pulmonar.



Fonte: Adaptado de VivaBem (2021).

Disponível em:< <https://www.uol.com.br/vivabem>>.

Além dos fatores de risco comportamentais, há também fatores subjacentes ao desenvolvimento de DCVs, incluindo as condições socioeconômicas desfavoráveis que podem levar a menor acesso a cuidados de saúde e maior exposição a fatores de risco (Gullón *et al.*, 2022). O estresse psicossocial que pode aumentar a pressão arterial e contribuir para o desenvolvimento de DCVs (Osborne *et al.*, 2020). Além disso, a hereditariedade também desempenha um papel importante, especialmente em indivíduos com histórico familiar de doenças cardíacas (Tada *et al.*, 2022).

4.2 DOENÇAS TROMBÓTICAS

Dentre as doenças cardiovasculares, a trombose é uma condição grave que ocorre quando coágulos sanguíneos se formam em vasos sanguíneos e obstruem o fluxo de sangue, causando inchaço e dor na região. O problema se agrava quando

um coágulo se desprende e se movimenta na corrente sanguínea, em um processo chamado de embolia. Um trombo pode ficar preso no cérebro, nos pulmões, no coração ou em outra área, levando a lesões graves (MS, 2024). Essa é uma das principais causas de morte em todo o mundo e afeta milhões de pessoas anualmente. Algumas das principais causas inclui cirurgias, sedentarismo, idade avançada, obesidade, uso de anticoncepcionais, câncer, gravidez e outras doenças cardiovasculares (Kristoffersen *et al.*, 2020; Stasyshena *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2021).

A trombose afeta principalmente mulheres, idosos, pacientes com câncer e aqueles hospitalizados por doenças graves (Junior *et al.*, 2023). Dados do Ministério da Saúde revelam uma média de 165 internações diárias por trombose no Brasil entre 2018 e 2022, com predominância na região Sudeste e maior prevalência em mulheres (61% dos casos). A faixa etária mais acometida é entre 40 e 69 anos, e as pessoas brancas representam 40% das internações acometidas pela doença (Jornal da USP, 2023; Chehadi *et al.*, 2023).

A formação de coágulos sanguíneos tende a ocorrer com maior frequência em situações como cirurgias, cortes ou períodos prolongados de imobilidade, sendo especialmente comum após procedimentos ortopédicos, oncológicos e ginecológicos. Embora a trombose seja geralmente mais prevalente entre mulheres, homens também estão suscetíveis ao problema. Em especial, entre os 20 e 40 anos, a incidência em mulheres é ligeiramente superior devido à exposição a certos fatores de risco, incluindo o uso de anticoncepcionais e a gravidez. Se não tratada, a trombose pode levar a complicações sérias, como o tromboembolismo pulmonar, em que o coágulo se desloca, obstruindo a artéria pulmonar e ocasionando falta de ar, arritmia ou até mesmo risco de morte (Figura 1) (MS, 2024; Irigoín *et al.* 2021; Reyna-Villasmil *et al.*, 2021; Khialani *et al.*, 2021).

Na maioria dos casos, a trombose aguda é resolvida pelo próprio organismo, que utiliza seus mecanismos naturais para dissolver os coágulos que obstruem as veias, sem deixar consequências ou evoluir para situações mais graves. Em contraste, a trombose crônica ocorre quando, durante o processo de dissolução natural do coágulo, permanecem alterações dentro das veias que danificam as válvulas. Essas mudanças nas válvulas afetam o fluxo de retorno do sangue, levando ao surgimento

de sintomas como inchaço, varizes, escurecimento e enrijecimento da pele, além de úlceras e outras complicações (Sharma et al., 2021; Kashi et al., 2020; Klok et al., 2020).

Pode ser classificada como do tipo venosa ou arterial, dependendo do local que é encontrado no sistema de fluxo sanguíneo. A do tipo venosa ocorre quando há a formação de coágulos sanguíneos nos vasos venosos, principalmente nas veias profundas das pernas, como no caso da Trombose Venosa Profunda (TVP). Essa condição pode levar ao desenvolvimento de tromboembolismo pulmonar quando o coágulo se desprende e migra para os pulmões. Já a trombose arterial ocorre quando há a formação de coágulos sanguíneos nos vasos arteriais, obstruindo o fluxo sanguíneo, que pode levar a complicações graves como infarto agudo do miocárdio e Acidente Vascular Cerebral (AVC) (Khialani et al., 2020; Irigoín, et al., 2021; Gomes, et al., 2022).

No Brasil, a taxa de incidência de trombose é de cerca de 0,6 a cada 1000 habitantes anualmente. Em outros países, a taxa de incidência é mais alta, com cerca de 5 casos a cada 10.000 indivíduos anualmente (Tavares; Ortiz, 2021). A mortalidade por Tromboembolismo Pulmonar varia entre 6% e 15%, com uma taxa mais alta em pacientes com comorbidades associadas. A mortalidade por Trombose Venosa Profunda também é elevada, com uma taxa de 20 a 30% em pacientes com instabilidade hemodinâmica ou comorbidades associadas (Avelino e Santo, 2018).

Além disso, no Brasil houve tendência crescente na taxa de internação por embolia pulmonar na maioria dos estados, variando de 2,57 em 2008 para 4,44/100 mil em 2019 (Gomes et al., 2022). Os riscos de trombose aumentaram significativamente em todo o mundo após a pandemia da COVID-19, houve um aumento dos problemas relacionados com a Tromboembolismo Pulmonar (TEP) (Gomes et al., 2022), trombose venosa profunda (Pereira et al., 2022) e AVC, associados a COVID-19 (Santana et al., 2021).

Em pacientes acometidos pela COVID-19, a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 pode levar a uma resposta inflamatória intensa, que pode contribuir para a formação de coágulos sanguíneos. Essa condição aumenta significativamente o risco de desenvolver trombose. A imobilidade prolongada durante a infecção, é outro fator que

pode aumentar o risco de trombose, especialmente em pacientes com DCVs pré-existent (Tavares; Ortiz, 2021; Pereira *et al.*, 2022; Gomes *et al.*, 2022).

Nos idosos, principalmente acima dos 65 anos, os riscos de trombose é um reflexo do envelhecimento, no qual, ocorrem alterações fisiológicas que predis põem o idoso a um estado pró-trombótico, como disfunção endotelial, inflamação crônica e alterações no processo fisiológico da cascata de coagulação. As Comorbidades associadas à idade, como câncer, sedentarismo e DVCs, são outros fatores que facilitam a formação de trombos sanguíneos em pacientes com idade avançada (Kristoffersen *et al.*, 2020; Al-Koussa *et al.*, 2022; Rai *et al.*, 2022).

A trombose também é um problema associado aos pacientes com câncer, uma vez que o processo de inflamação da doença, associados aos efeitos dos tratamentos antineoplásicos, também contribuem para a formação de coágulos sanguíneos, ocasionados pela super ativação da cascata de coagulação, levando a um estado de hipercoagulabilidade desses pacientes. A formação de trombos em pacientes com câncer também está ligada a piores desfechos clínicos, incluindo o aumento na taxa de mortalidade (Periayah *et al.*, 2017; Massimiliano *et al.*, 2021).

A formação do coágulo vai depender de vários fatores fisiológicos que são fundamentais para ativação da cascata de coagulação, processo principal da formação de trombos sanguíneos. Além disso, a manutenção de um sistema de coagulação e anticoagulação, através da fibrinólise, é o que representa a homeostasia sanguínea necessária para o organismo (Kietsiroje; *et al.*, 2021; Alo-koussa *et al.*, 2022).

4.3 FORMAÇÃO DE TROMBOS SANGUÍNEOS

A agregação de plaquetas, fibrina e trombina nas artérias causa trombose arterial, contribuindo para o surgimento e disseminação da placa aterosclerótica, resultando em infarto do miocárdio. O trombo formado pode ser tratado removendo-o ou impedindo-o de se formar. O processo de dissolução dos trombos é chamado trombólise, enquanto a degradação apenas da malha de fibrina ao redor do coágulo sanguíneo é chamada fibrinólise (Mutch e Medcalf, 2023; Hazare *et al.*, 2024).

Atualmente, o tratamento dos pacientes para a trombose é realizado com a utilização de drogas antiplaquetárias, anticoagulantes e também na administração de agentes trombolíticos como os ativadores de plasmina, como estreptoquinase, alteplase (t-PA), anistreplase, reteplase (r-PA) e tenecteplase (TNK-t-PA), que estão disponíveis comercialmente e são trombolíticos aprovados pela *Food Drug and Administration* (FDA) (Hazare *et al.*, 2024). No entanto, devido à sua afinidade limitada pela fibrina e à meia-vida curta, devem ser injetados constantemente para serem eficazes, mas também causam outros efeitos negativos, como hemorragias internas e respostas alérgicas devido sua toxicidade (Nascimento *et al.*, 2017).

4.3.1 Cascata de coagulação

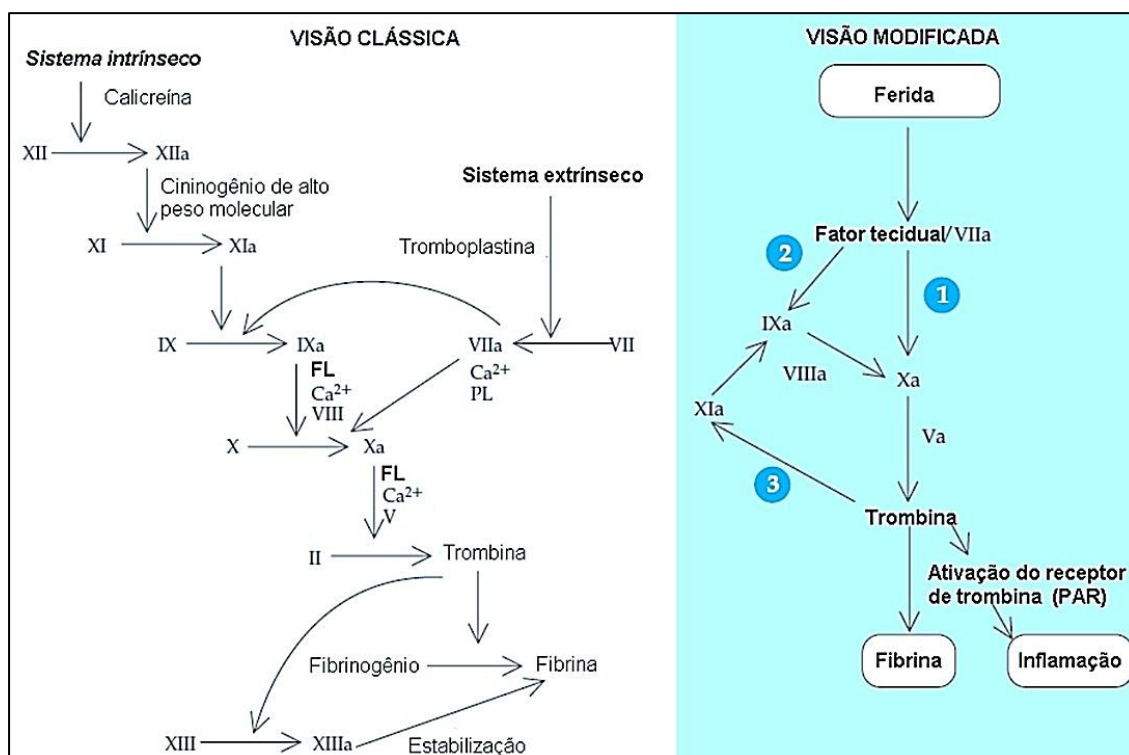
As três principais características da coagulação sanguínea são: Rapidez, com a cessação do sangramento ocorrendo em questão de segundos; Proporcionalidade, com o tamanho do trombo sendo apropriado para a magnitude da lesão vascular; Reversibilidade, com eventual dissolução do trombo e remodelamento vascular. O sistema de cascata de coagulação é responsável pela rapidez da resposta. A proporcionalidade indica que a cascata está sujeita a uma regulação rigorosa, enquanto a reversibilidade desse processo é resultado da fibrinólise (Leung, 2012; Periyah *et al.*, 2017; Al-Koussa *et al.*, 2022).

O modelo de “Cascata de coagulação” proposto por Davie e Ratnoff (1964) explica a fisiologia da coagulação do sangue. Nesse modelo, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica sequencial de proenzimas (zimogênios) por proteases plasmáticas, resultando na formação de trombina que então converte a molécula de fibrinogênio em fibrina, reforçando o tampão plaquetário (Al-Koussa *et al.*, 2022; Hazare *et al.*, 2024).

Tradicionalmente, essa cascata é apresentada como composta por duas vias principais: a intrínseca e a extrínseca. Nesse modelo, a via extrínseca envolve componentes do sangue, mas também elementos que usualmente não estão presentes no espaço intravascular e uma via intrínseca é ativada por fator tecidual ou tromboplastina. Ambas as vias convergem na ativação do fator X, que então converte a protrombina (fator VII) em trombina (II), enzima final da cascata de coagulação (Hazare *et al.*, 2024; Leung, 2012).

Atualmente, sabe-se que a ativação ou presença do fator tecidual no local de uma lesão é o principal evento fisiológico que dá início à coagulação. O fator tecidual atua como cofator essencial para que o fator VII seja ativado (fator/VIIa) e inicie a coagulação (Figura 2). O fator VIIa ativa o fator X diretamente e, indiretamente, via ativação do fator IX. Esta via dupla de ativação do fator X é necessária devido à quantidade limitada de fator tecidual gerada in vivo e à presença do Inibidor da Via do Fator Tecidual (TFPI) que, ao se fixar ao fator Xa, inibe o complexo fator tecidual VIIa. A trombina pode promover feedback de ativação do fator XI que, então, ativa o fator IX. Esta via de amplificação terciária gera trombina extra que se torna necessária no contexto de lesões vasculares significativas, e que provavelmente explica a observação de que os pacientes com deficiência de fator XI em geral sangram somente após sofrerem traumatismos graves ou serem submetidos a cirurgia (Al-Koussa et al., 2022; Stark e Massaberg, 2021; Zabczyk et al., 2023; Williams e Mackman, 2012).

Figura 2- Cascata de coagulação



Na visão clássica da cascata de coagulação (esquerda), a via intrínseca é iniciada pela exposição do sangue a uma superfície de carga negativa (p. ex., vidro) e a via extrínseca é ativada pelo fator tecidual ou tromboplastina. Na perspectiva renovada (direita), a geração ou exposição de fator tecidual no sítio da ferida é o evento fisiológico primário que inicia a coagulação. O fator tecidual ativa o fator X diretamente, atuando como cofator com o fator VIIa (via 1), e indiretamente, ativando o fator IX (via 2). A trombina pode ativar o fator XI por meio de feedback e isto ativa o fator IX (via 3). Esta via de amplificação terciária gera trombina adicional, a qual é necessária no evento de uma lesão vascular significativa. PAR = receptor ativado por protease; FL = fosfolípido. Fonte: Ferreira et al. (2010).

A ativação do fator X pelo fator tecidual VIIa, dá origem a uma pequena quantidade de trombina que, por sua vez, ativa o fator V, fator VIII e plaquetas, expondo os fosfolípidos aniônicos para sustentar a montagem de complexos enzimáticos de componentes (intrínseca e pró-trombinase). Dessa forma, a quantidade inicial de trombina produzida estabelece a ativação da cascata de coagulação e ativa as plaquetas, resultando em uma produção intensa de trombina na fase de propagação. (Zabczyk et al., 2023; Al-Koussa et al., 2022).

Depois de serem ativadas, as plaquetas sofrem alterações morfológicas significativas e produzem pseudópodes alongados. Também se tornam extremamente adesivas. A resposta funcional das plaquetas ativadas envolve quatro processos

distintos: adesão (deposição de plaquetas na matriz subendotelial); agregação (coesão plaquetária); secreção (liberação de proteínas dos grânulos plaquetários); e atividade pró-coagulante (intensificação da geração de trombina) (Stark e Massaberg, 2021; Massimiliano *et al.*, 2021).

4.2.2 Processo de anticoagulação

A anticoagulação é um processo biológico que ocorre no corpo humano e é responsável por prevenir a formação excessiva de coágulos sanguíneos. O objetivo da anticoagulação é manter a fluidez do sangue e evitar a formação de trombos que podem obstruir os vasos sanguíneos. Os mecanismos de anticoagulação envolvem a ação de proteínas e moléculas que inibem a formação de coágulos sanguíneos. Esses mecanismos incluem (Rezaie e Giri, 2020):

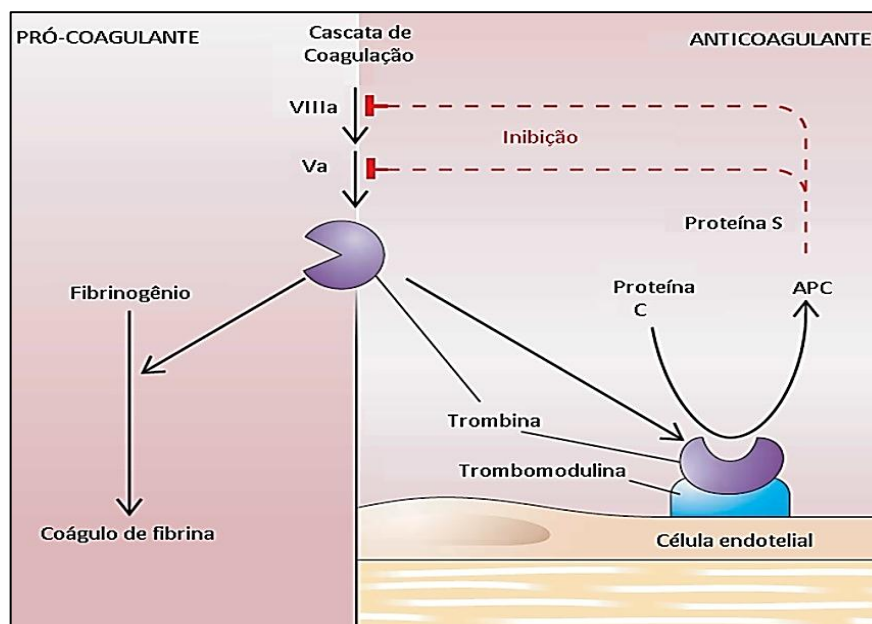
- **Inibição da trombina:** A trombina é uma enzima que converte o fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo. Os inibidores da trombina, como a heparina e o varfarina, impedem a formação de trombos por inibição da atividade enzimática da trombina.
- **Inibição do fator Xa:** O fator Xa é uma proteína que ativa a trombina. Os inibidores do fator Xa, como a rivaroxabana e a apixabana, impedem a formação de trombos por inibição da atividade enzimática do fator Xa da cascata de coagulação.
- **Inibição da proteína C e S:** As proteínas C e S são anticoagulantes naturais que inibem a formação de coágulos sanguíneos. Essas proteínas são responsáveis por inibir a formação de trombos pela cascata de coagulação (Rezaie e Giri, 2020).

A ligação da trombina à trombomodulina altera significativamente as especificidades do substrato da trombina. Isso significa que ela não pode ativar plaquetas ou formar coágulos de fibrinogênio. Por outro lado, a trombina aprende a ativar a proteína C presente no plasma. Um receptor endotelial distinto para a proteína C foi identificado. Isso intensifica a ativação da proteína pelo complexo trombina-trombomodulina. O complexo de protrombinase e a tenase intrínseca na cascata de coagulação são comandados pelos cofatores fator Va e fator VIIIa, que são decompostos pela proteína C ativada. Deficiências em antitrombina (AT), proteína C

e proteína S são causas importantes de estados hipercoaguláveis. (Esmon, 2003; Gleeson *et al.*, 2011).

Ademais, a via da proteína C/S é complementar à via da antitrombina (Figura 3). Quando a trombina se liga à trombomodulina, sua conformação muda e ela deixa de ativar plaquetas ou formar coágulos de fibrinogênio. Ao mesmo tempo, adquire a capacidade de ativar a proteína C presente no plasma. A proteína S atua como cofator para a proteína C ativada (APC). A APC, por sua vez, degrada os fatores Va e VIIIa, que são cofatores essenciais na cascata de coagulação responsáveis pela ativação do fator Xa (Obeagu *et al.*, 2022).

Figura 3- Via da antitrombina.



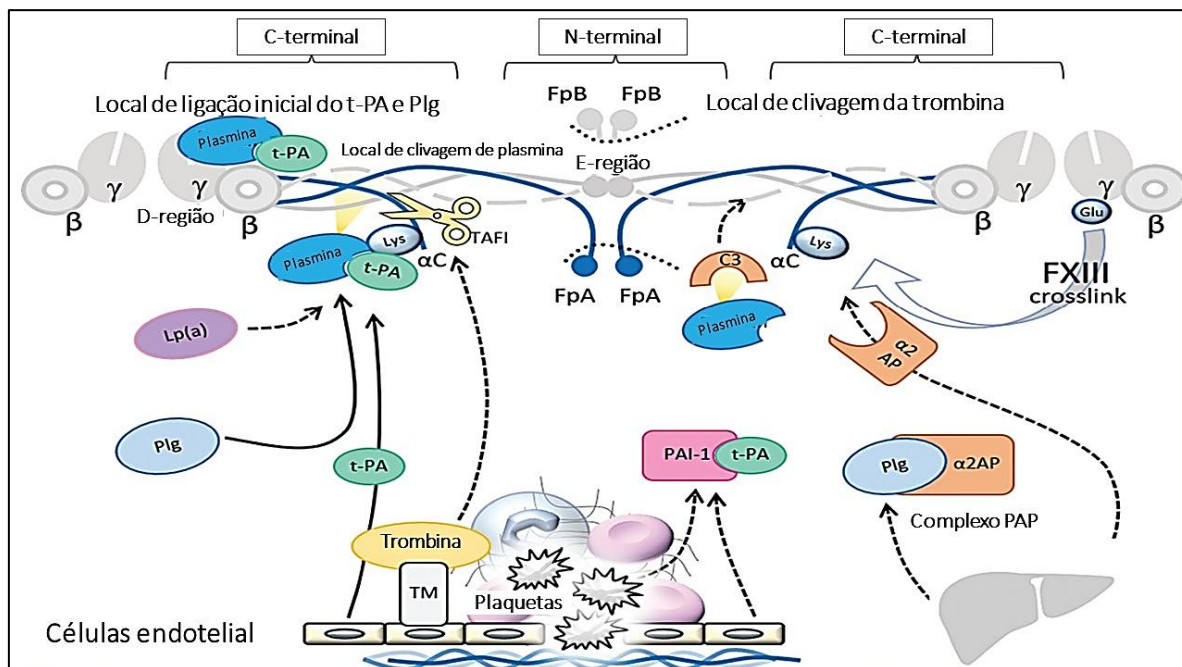
Proteína C ativada (APC). V/fator ativado (Va). VIII/fator ativado (VIIa). Fonte: Leung (2012).

Além disso, ainda ocorre o processo de fibrinólise, um processo biológico que ocorre no corpo humano e é responsável por degradar a fibrina, uma proteína insolúvel que forma um tampão plaquetário durante a coagulação do sangue. O objetivo da fibrinólise é restaurar a fluidez do sangue e evitar a formação de trombos que podem obstruir os vasos sanguíneos. O processo de fibrinólise ocorre em três etapas (Medcalf e Keragala, 2021):

- **Conversão do plasminogênio em plasmina:** O plasminogênio é convertido em plasmina por ativadores específicos, como o ativador de plasminogênio tecidual (t-PA)
- **Degradação da fibrina:** A plasmina degrada a fibrina, formando uma rede de fibrina que é dissolvida.
- **Regulação da fibrinólise:** A antiplasmina se combina com o excesso de plasmina liberada, impedindo a formação de fibrinólise generalizada (Longstaff e Kolev, 2015).

A degradação da fibrina pela plasmina expõe o resíduo de lisina C-terminal - o local de ancoragem para plasminogênio e ativador de plasminogênio tecidual (t-PA) na cadeia α do fibrinogênio, iniciando a fibrinólise (Figura 4). Esta proteólise induzida pela plasmina é aparentemente interminável e requer que outros reguladores endógenos limitem este processo. A interação entre trombina e trombomodulina (TM), localizado nas células endoteliais, ativa o inibidor de fibrinólise ativável pela trombina (TAFI), que cliva o resíduo de lis da superfície da fibrina, comprometendo a ligação do plasminogênio e a fibrinólise. As plaquetas ativadas liberam o inibidor 1 do ativador da plasmina (PAI-1) para inibir o t-PA. Além disso, α_2 antiplasmina 2 (α_2 AP) é reticulada em fibrina e inibe Plg. O complemento (C) 3 é um substrato para a plasmina que previne competitivamente a plasmina da clivagem da fibrina. A lipoproteína (a) (Lp(a)) possui homologia semelhante ao plasminogênio, ligando-se competitivamente ao fibrinogênio, prevenindo assim, a ativação da plasmina. A Lp(a) também estimula a secreção de PAI-1 pelas células endoteliais (Kietsiroje *et al.*, 2021; Stallone, *et al.*, 2022).

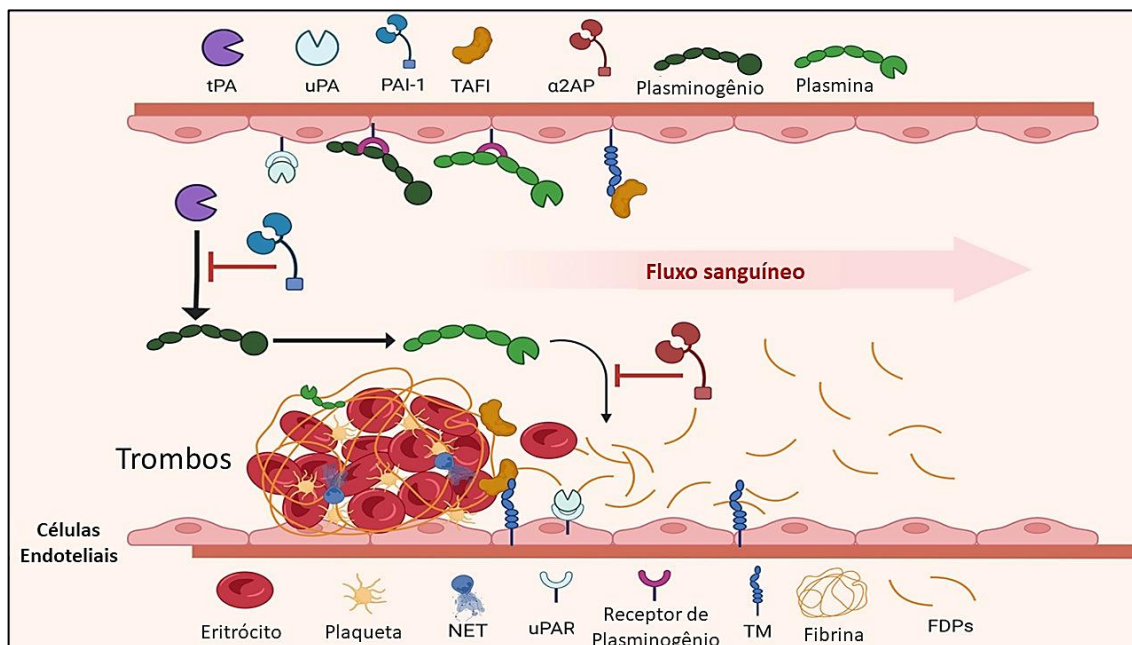
Figura 4- Regulação e alteração da fibrinólise.



A fibrinólise é iniciada por ativadores do plasminogênio que convertem o plasminogênio circulante em sua forma ativa, plasmina, promovendo assim a degradação da fibrina. Os produtos solúveis da degradação da fibrina podem ser eliminados da circulação. A fibrinólise é regulada ao nível da ativação do plasminogênio, via inibidor-1 do ativador do plasminogênio ou pela inibição direta da plasmina pelo $\alpha 2$ -antiplasmina. O inibidor da fibrinólise ativável pela trombina impede a fibrinólise removendo os resíduos C-terminais da fibrina; esses resíduos de lisina são vitais para a ligação do plasminogênio à fibrina. Vários receptores celulares, incluindo aqueles para plasminogênio e receptor ativado por protease de uroquinase, localizam fatores fibrinolíticos dentro da vasculatura para aumentar a ativação do plasminogênio mediada pela superfície. Siglas: Resíduo de lisina (lys). Plasminogênio (Plg). Complexo plasmina-antiplasmina (PAP). Ativador de plasminogênio tecidual (t-PA). Trombomodulina (TM). Inibidor de fibrinólise ativável pela trombina (TAFI). Inibidor 1 do ativador da plasmina (PAI-1). α A antiplasmina 2 ($\alpha 2$ AP). Lipoproteína (a) (Lp(a)). Fator XIII (FXIII). Cadeias α e β (FpA e FpB). Fonte: Adaptado de Kietsiriroje; Ariëns; Ajan, 2021. p. 3

Embora a plasmina degrade não somente a fibrina mas também o fibrinogênio, o fator V e o fator VIII, em condições fisiológicas a fibrinólise ocorre como processo que é altamente específico para a fibrina de ativação localizada e restrita, e não sistêmica, cumprindo desta forma sua função de remover o excesso de fibrina do sistema intravascular de modo equilibrado (Figura 5) (Kietsiriroje *et al.*, 2021; Medcalf e Keragala, 2021).

Figura 5- Dissolução fibrinolítica de trombos.



Ativador de plasminogênio tecidual (tPA). Ativador de plasminogênio uroquinase (uPA). Trombomodulina (TM). Inibidor de fibrinólise ativável pela trombina (TAFI). Inibidor 1 do ativador da plasmina (PAI-1). α 2 Antiplasmina 2 (α 2AP). Receptor da uPA (uPAR). Produto de degradação da fibrina (FDPs). Armadilhas extracelular de neutrófilos (NET). Fonte: Adaptado de Mutch e Medcalf (2023). p. 3306

4.4 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

As enzimas fibrinolíticas são proteases que atuam na peptidase, elas pertencem à classe de enzimas hidrolase, que degradam fibrina, a principal proteína envolvida na coagulação do sangue. A maioria das peptidases variam em tamanho de ~20 kDa até de 0,7 – 6 MDa que cliva ligações peptídicas α e ligações isopeptídicas de proteínas alvo, levando à proteólise ou às vezes até auto-hidrolisar suas cadeias polipeptídicas. Essas enzimas podem atuar de duas formas: na fibrinólise indireta, que converte o plasminogênio circulante em plasmina, que atua na fibrina. E na fibrinólise direta, com a degradação da fibrina insolúvel em fragmentos (Rai *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2013).

As enzimas fibrinolíticas podem ser extraídas de vários microrganismos como, por exemplo, *Streptococcus hemolyticus*, que produz estreptoquinase (Banerjee *et al.*, 2004), *Bacillus subtilis*, que produz nattoquinase (Weng *et al.*, 2017) e *Bacillus sp.*,

que produz bafibrinase (Mukherjee et al., 2012). Além disso, os *Bacillus* sp. obtidos de alimentos fermentados apresentam propriedades para prevenir a trombose. Outro estudo com *B. subtilis* demonstrou alta especificidade, baixo custo de produção e apresentando potencial industrial. Alguns trabalhos ainda sugerem que as enzimas fibrinolíticas obtidas de fontes alimentares parecem ser mais específicas para fibrina do que as não alimentares (Ali; Bavisetty, 2020).

Essas enzimas constituem a maior família de enzimas, representando cerca de 2% do genoma humano. Seu mecanismo de ação pode ser amplamente classificado em três tipos diferentes: as serina proteases, metaloproteases e serina metaloproteases que podem ser extraídas de bactérias, fungos, plantas, crustáceos, e outros organismos (Ali e Bavisetty, 2020; Hazare et al., 2024; Krishnamurthy et al., 2018; Simkhada et al., 2010).

- **Serina proteases:** As serina proteases são um grupo de endopeptidases que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Essas enzimas que correspondem a 1/3 das enzimas proteolíticas conhecidas e possuem serina em seu sítio ativo como aminoácido nucleofílico. Possuem atividade fibrinolítica direta e indireta. Algumas como as tripsinas, plasmina e brinase podem hidrolisar diretamente a trombina e outras como as t-PA e u-PA, são duas proteases indiretas licenciadas pela FDA. Ela pode ser isolada de bactérias como *Bacillus flexus* BF12 e *Streptomyces parvulus*, assim como, crustáceos, plantas e fungos (Page e Cera, 2008; Jeffries e Buckley, 1980; RAJ et al., 2021; Alencar et al., 2021).
- **Metaloproteases:** As metaloproteases são uma classe de enzimas que possuem um íon metálico, geralmente zinco, em seu sítio ativo, o qual é essencial para a catálise da hidrólise de ligações peptídicas em proteínas. Elas atuam em diferentes etapas da cascata de coagulação, desde a ativação de fatores de coagulação até a degradação da fibrina. Diversas metaloproteases podem ser encontradas em diferentes organismos, incluindo seres humanos, animais, bactérias e vírus. Algumas das metaloproteases mais conhecidas são a trombina, plasmina, elastase e a collagenase. Devido ao seu papel crucial na coagulação sanguínea, as metaloproteases têm sido alvos de desenvolvimento de medicamentos anticoagulantes aprovados pela FDA. Alguns exemplos

incluem os inibidores diretos da trombina, como o dabigatran, e os inibidores do fator Xa, como o rivaroxaban, apixaban e edoxaban (Turk, 2006; Eriksson, *et al.*, 2009; Weitz; *et al.*, 2012; Simões *et al.*, 2022).

- **Serina metaloproteases:** As serina metaloproteases são uma classe de enzimas que possuem tanto um resíduo de serina quanto um íon metálico, geralmente zinco, em seu sítio ativo. Elas atuam em diferentes etapas da cascata de coagulação, desde a ativação de fatores de coagulação até a degradação da fibrina. Assim como as outras, essa enzima pode ser encontrada nos mais diversos organismos. Alguns medicamentos como Nelfinavir, ritonavir, saquinavir foram desenvolvidos a partir do estudo da interação dessas enzimas com a enzima alvo da Infecção do Vírus da Imunodeficiência Humana (protease do HIV-1) (Zimmer, *et al.*, 2009; Kini w Koh, 2016; Krishnamurthy; Belur, 2018).

O primeiro teste em humanos com a enzima fibrinolítica estreptoquinase, foi realizado em 1958 proveniente de um estreptococo hemolítico. No entanto, apenas em 1980, com o advento da tecnologia de DNA recombinante, que se conseguiu produzir essa biomolécula em larga escala. Ao contrário da heparina e varfarina, que apenas previnem a extensão e recorrência de trombos, as enzimas fibrinolíticas lisam os trombos pré-existentes. Além disso, em pacientes com embolia pulmonar, a estreptoquinase e a uroquinase pode eliminar os trombos 3 vezes mais do que em pacientes tratados apenas com heparina (Medcalf; Keragala, 2021).

Novas alternativas de soluções inovadoras que melhorem a segurança da terapia trombolítica vêm sendo estudadas. Entre elas destaca-se a utilização de enzimas trombolíticas, que vão atuar de forma semelhante a plasmina, e são encontradas em diversas fontes (SILVA *et al.*, 2019). Dentre essas alternativas, o estudo com enzimas fibrinolíticas produzidas por *Bacillus megaterium* (Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP) é recente e pode ser uma alternativa promissora capaz de facilitar o meio de produção e isolamento de biomoléculas para futuras aplicações em medicamentos trombolíticos.

4.5 *Bacillus megaterium* (IPA – CC65)

Bacillus megaterium é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastão, com dimensões de 1-1,2 μm de largura por 3-5 μm de comprimento. Elas são aeróbicas, formadora de esporos, encontrada em habitats amplamente diversos, desde solo, água do mar, sedimentos, canaviais, arrozais, mel, peixes e comida seca. A bactéria pode crescer em meios simples em mais de 62 fontes de carbono (Varry *et al.*, 2007). Em 1884, De Bary denominou *B. megaterium*, com origem do grego “*megatherium*”, que significa “grande besta” devido ao seu grande tamanho com um volume de aproximadamente 100 vezes maior que o da *Escherichia coli* (Figura 6).

Figura 6- Comparação da estrutura de *Bacillus Megaterium* com *E. coli*.

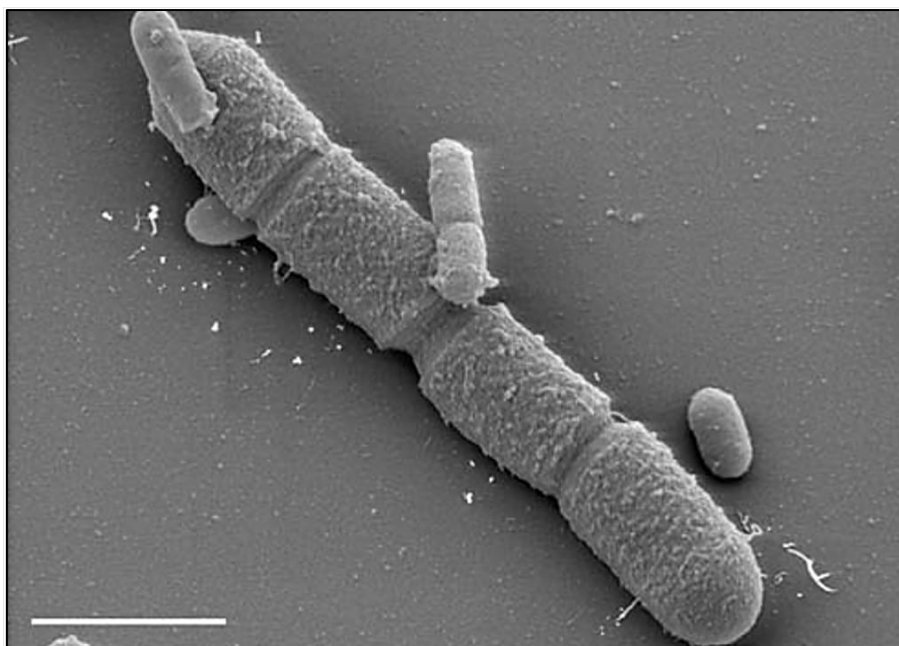


Imagem de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) de *Bacillus megaterium* e células vegetativas de *Escherichia coli*. As células de *B. megaterium* crescem até um volume superior a 60 μm^3 (2,5×2,5×10). Comparado com o volume de *E. coli* de 0,5 μm^3 (0,5×0,5×2), *B. megaterium* tem um volume pelo menos até 100 vezes maior. Na imagem as bactérias foram fixadas em aldeído e desidratadas com uma série graduada de acetona, secas em ponto crítico com CO_2 líquido e revestidas por pulverização catódica com ouro. As amostras foram examinadas em um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo Zeiss DSM982 Gemini a uma tensão de aceleração de 5 kV usando o detector *Everhart-Thronley* SE e o detector SE-Inlens em uma proporção de 50:50. Ampliação ×15.000; barra branca 2 μm . Fonte: Varry *et al.* (2007). p. 2.

Devido à dimensão da forma vegetativa e dos esporos, *B. megaterium* é adequado para pesquisas morfológicas, como biossíntese da parede celular e da membrana citoplasmática, esporulação, estrutura dos esporos e organização celular, particionamento do DNA e localização de proteínas (Hrafnisdottir *et al.*, 1997; Lwoff; Gutmann, 1950; Velloso *et al.*, 2023; Jazbec *et al.*, 2024). Além disso, por produzir diversas substâncias de relevância biotecnológica, *B. megaterium* é aplicado a mais de 60 anos na indústria, principalmente por produzir penicilina acilase, usada para construir penicilinas semissintéticas (por exemplo, a ampicilina). Também é bastante utilizado como o maior produtor de vitamina B12 para a indústria (Lopes *et al.*, 2023; Calvillo *et al.*, 2022).

Suas proteínas também são muito aplicadas na indústria, e entre seus produtos, estão as proteínas de interesse na modificação do amido na indústria de panificação, glicose desidrogenase (Shofiyah *et al.*, 2020), usado para regeneração do cofator NADH/NADPH em reações bioquímicas e exames de glicemia (Tadi *et al.*, 2022). Além disso, é utilizado para produção de toxinas fungicidas e oxetanocina (Saleh *et al.*, 2021), assim como, um agente viral inibidor ativo do vírus da hepatite B, úlceras de córnea e herpes simplex (Shen *et al.*, 2020).

Além disso, *B. megaterium* também é muito utilizado como BPCP, como nesse caso, na produção de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Essas bactérias atuam promovendo substâncias de crescimento vegetal para a planta, controlando o crescimento e a disseminação de organismos nocivos e aumentando a absorção e a disponibilidade de nutrientes e minerais. *B. megaterium* é uma bactéria endófito fixadora de nitrogênio, podendo aumentar em até 35% de incremento na produção. Constituindo assim, uma alternativa viável ao uso desenfreado de produtos químicos na agricultura (Singh *et al.*, 2020; Chandra *et al.*, 2021; De Melo *et al.*, 2021).

Nesse cenário, a bactéria *B. megaterium* é comumente utilizada como BPCP na produção de cana-de-açúcar do Brasil. O Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) é de grande referência no estudo de potenciais aplicações de biomoléculas de plantas e microrganismos (Da Costa, 2020; De Melo *et al.*, 2021). A cana-de-açúcar se destaca devido a seu valor econômico para o país, principalmente na indústria de alimentos, bebidas e na produção de biocombustíveis. Mas também, pela sua

versatilidade no aproveitamento de produtos desde a matéria-prima até resíduos (bagaço) da planta (Vedana *et al.*, 2020; De Araújo; Sobrinho, 2020).

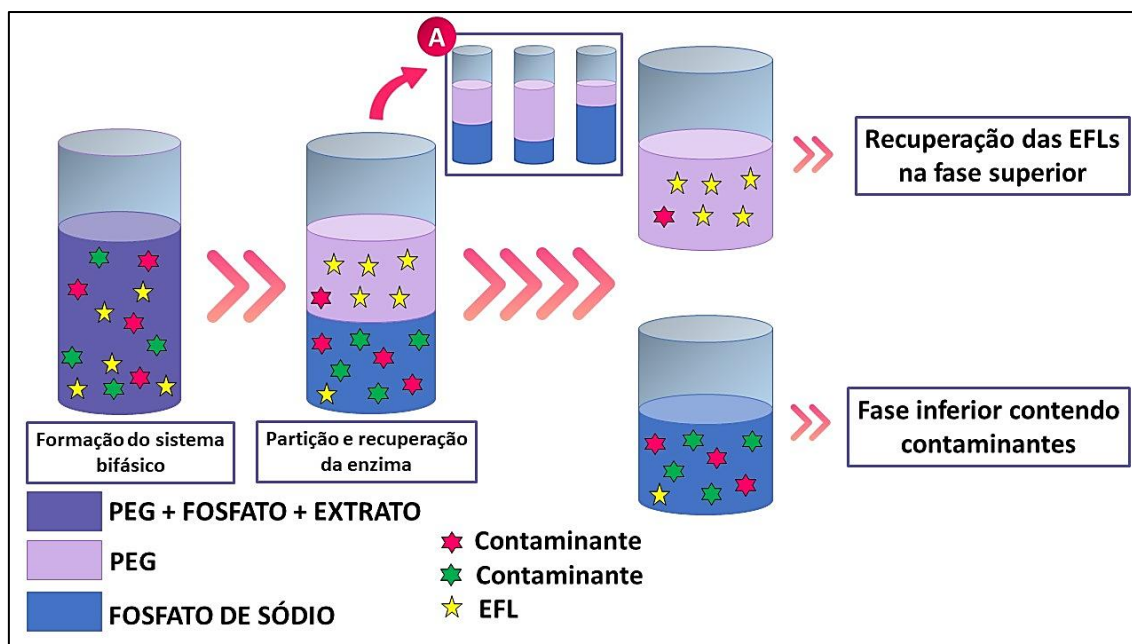
B. megaterium (IPA - CC65) é uma variedade das espécies em estudo pelo IPA, com grande potencial para obtenção de enzimas para diversos tipos de aplicações, incluindo a obtenção de enzimas fibrinolíticas (De Melo *et al.*, 2021; Lestari; *et al.*, 2021). Os primeiros passos para o estudo de dessas enzimas é o processo de obtenção de enzimas fibrinolíticas, que incluem o isolamento dessas moléculas, bem como, sua purificação e caracterização (Couto *et al.*, 2022).

4.6 SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS

Em seguida ao processo de obtenção das enzimas, é necessário realizar a purificação desse caldo fermentado. O meio de fermentação submersa contém diversos componentes além da proteína-alvo, como células microbianas, metabólitos e nutrientes. O isolamento permite separar a proteína de interesse desses contaminantes, além de concentrá-la, facilitando sua utilização, bem como, caracterização das suas atividades biológicas, posteriormente (Rosso *et al.*, 2012; Porto *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2020).

Um dos processos mais promissores de bioseparação é o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA), que é uma técnica eficiente para a extração de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Ele é formado pela mistura de dois ou mais polímeros incompatíveis em ambiente aquoso. A separação de fases ocorre em certas concentrações dos componentes das fases. Alternativamente, polímero e sal podem ser usados para gerar um sistema aquoso de duas fases (Figura 7) (Porto *et al.*, 2008; Da Silva *et al.*, 2020).

Figura 7- Purificação de enzimas por sistema de duas fases aquosas.



Polietilenoglicol (PEG). Enzima fibrinolítica (EFL). A – O volume das fases vai depender das concentrações dos componentes da extração, obtidos por sistema de duas fases aquosas. Fonte: A autora (2024)

Nesses sistemas, as proteínas se distribuem entre as duas fases aquosas de acordo com um coeficiente de partição que se define como:

$$K = \frac{[Pt]}{[Pb]}$$

Onde $[Pt]$ e $[Pb]$ são suas concentrações na fase superior e inferior respectivamente. O coeficiente de partição depende de uma série de variáveis experimentais: pH, temperatura, presença de sais, peso molecular e concentração do Polímeros de Cadeia Flexível (PCF), hidrofobicidade e tamanho da proteína, entre outras. Mediante o controle dessas variáveis, é possível fazer com que uma proteína contida em uma mistura complexa seja transferida para uma das fases, mantendo as proteínas não desejadas na fase oposta (Da Silva *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2020).

O Polietilenoglicol (PEG) – e os sais (fosfato de potássio, fosfato de sódio e sulfato de magnésio) estão entre os sistemas polímero–sal mais frequentemente usados. O SDFA também é adequado para produção em larga escala porque o PEG, que é frequentemente usado em uma de suas fases, tem propriedades físicas e químicas favoráveis (Nascimento *et al.*, 2016; Da Silva *et al.*, 2020).

O SDFA tem sido usado como uma etapa de purificação para remover grandes quantidades e diferentes tipos de contaminantes por meio de operação unitária simples e econômica. Ele apresenta muitas vantagens sobre os métodos convencionais para isolar e purificar proteínas. Algumas delas incluem, o equilíbrio de partição é alcançado muito rapidamente, condições operacionais suaves, facilidade de aumento de escala, capacidade de contínuo, ecologicamente correto e de baixo custo (Fernandes *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2021).

4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

Finalmente, após a extração e purificação das enzimas fibrinolíticas, é necessário realizar a caracterização dessas proteases através de vários testes bioquímicos. Alguns deles incluem: o efeito de inibidores, pH, temperatura e íons metálicos na atividade e estabilidade da enzima, bem como, o zimograma de fibrina, efeitos da albumina sérica na atividade enzimática e a atividade fibrinogenolítica. Esses parâmetros são necessários para a caracterização bioquímica padrão de uma nova enzima fibrinolítica, afim de classificar a enzima (Nascimento, 2017; Jain *et al.*, 2024; Leite *et al.*, 2022).

Diferentes métodos de ensaio de atividade permitem identificar a classe de protease presente, como serino proteases, metaloproteases, serino metaloproteases etc. Isso fornece informações sobre a estrutura e o mecanismo catalítico da enzima. Assim também, ensaios de atividade ao longo do tempo e sob diferentes condições (temperatura, pH, presença de inibidores) permitem avaliar a estabilidade e resistência da protease (Nascimento, 2017; Leite *et al.*, 2022; Al-Dhabi *et al.*, 2020).

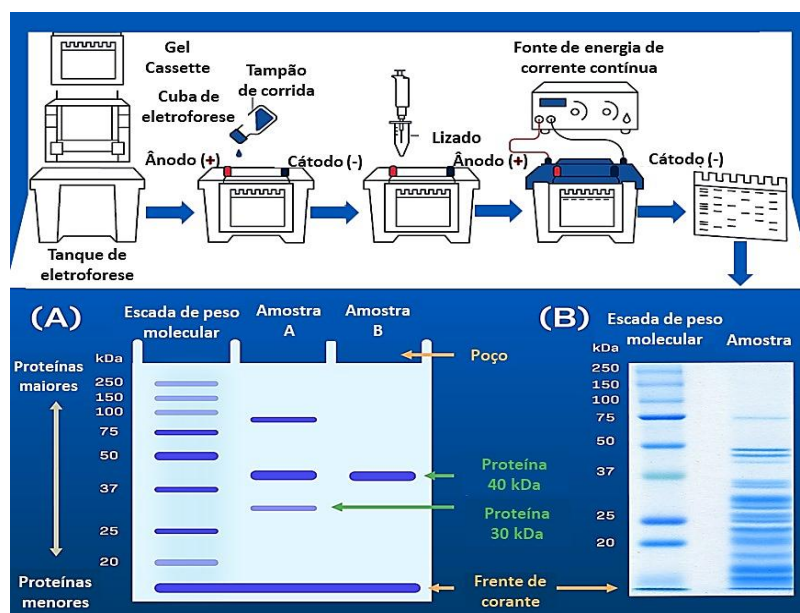
Outros ensaios sobre a atividade com diferentes substratos peptídicos, permitem determinar a especificidade de clivagem da protease. Essa informação é crucial para entender sua função biológica em trombos sanguíneos, por exemplo. Outros parâmetros cinéticos como K_{max} e V_{max} podem ser obtidos a partir de ensaios de atividade em diferentes concentrações de substrato, caracterizando a eficiência catalítica da protease (D' Souza *et al.*, 2020; Jain *et al.*, 2024).

Além disso, também tem que analisar os efeitos dos íons metálicos sobre a atividade proteásica. Alguns íons metálicos, como Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} ,

podem atuar como cofatores essenciais para a atividade catalítica de certas classes de proteases, como as metaloproteases. O efeito de íons sobre a atividade permite otimizar as condições de processos que envolvem proteases, como na produção enzimática ou na hidrólise de proteínas. Para proteases dependentes de íons, como as metaloproteases, o estudo da atividade com diferentes íons pode fornecer *insights* sobre o mecanismo de catálise e o papel estrutural desses cofatores (Al Farraj *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2022).

A Elefrorese em Gel de Poli-acrilamida na presença de Dodecil-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) também é uma importante técnica que permite a detecção e a caracterização da atividade de proteases em uma amostra, mesmo em misturas complexas de proteínas, bem como, estimar a massa molecular e carga elétrica das proteínas (Figura 8). Envolve a separação das proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo um substrato específico para a protease. Ao utilizar diferentes substratos no gel, o zimograma pode fornecer informações sobre a especificidade de clivagem da protease, ajudando a classificá-la em diferentes classes (Souza *et al.*, 2020; Gao *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2022)

Figura 8- Gel de eletroforese em poliacrilamida (SDS-PAGE).



O gel de poliacrilamida corado por Coomassie pode ser usado para visualizar proteínas separadas em uma amostra. O painel (A) mostra uma representação de dados de SDS-PAGE: os poços e a frente do corante são ambos rotulados. Proteínas maiores são encontradas no topo do gel, e proteínas menores são encontradas na parte inferior do gel. O primeiro poço 1 tem uma escala de peso molecular, como padrão, e os poços 2 e 3 são amostras de duas tentativas separadas de purificar uma proteína de 40 kDa

kDa. A amostra no poço 3 é mais pura do que a amostra no poço 2, uma vez que proteínas adicionais podem ser vistas na amostra do poço 2. O painel (B) mostra uma parte de um gel real usado para analisar as proteínas em uma amostra purificada de ribossomos eucarióticos. O ribossomo eucariótico consiste em 80 proteínas, razão pela qual há um número tão grande de bandas na tira de amostra. Fonte: Adaptado de Labxchange (2021). Disponível em: <www.labxchange.org>.

Por fim, é realizado o teste de atividade fibrinogenolítica das enzimas fibrinolíticas, que pode fornecer *insights* sobre o mecanismo de ação, como o modo de clivagem do fibrinogênio. Para isso, é cronometrado o tempo de coagulação do fibrinogênio na presença da enzima. Através do espectrofotômetro é possível medir a absorbância da solução, que diminui à medida que o fibrinogênio é degradado pela enzima. Ao final desse processo de extração, purificação e caracterização, as enzimas com forte atividade fibrinogenolíticas possuem grande potencial para futuras aplicações terapêuticas no tratamento de distúrbios de coagulação sanguínea, como a trombose (Nascimento, 2017; Couto *et al.*, 2022).

5 ARTIGO- PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UM PROTEASE FIBRINOLÍTICA OBTIDA A PARTIR DE UMA BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO EM PLANTAS.

ABSTRACT

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade em todo o mundo, frequentemente associadas ao acúmulo excessivo de fibrina nos vasos sanguíneos. Os tratamentos trombolíticos atuais, embora eficazes, apresentam limitações como riscos de sangramento e altos custos. Este estudo explora o potencial de uma nova protease fibrinolítica derivada de *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) como uma alternativa mais segura e econômica. A protease foi produzida por fermentação submersa em meio de cultura modificado contendo filtrado de sementes de *Gliricidia sepium* e pré-purificada utilizando um sistema de duas fases aquosas (SDFA) com polietilenoglicol (PEG) e fosfato de sódio, em seguida foi caracterizada bioquimicamente, SDS-PAGE, zimograma de fibrina, atividade fibrinogenolítica, degradação trombolítica *in vitro*, além de testada sua toxicidade. O melhor tempo de fermentação foi de 72 horas com uma atividade de 21,82 U/mL; após o SDFA, foi possível observar o coeficiente de partição $K > 1$, indicando que a enzima foi para a fase rica em PEG. A enzima parcialmente purificada apresentou atividade ótima a 50 °C e pH 10, indicando ser uma protease alcalina. Também foi considerada sensível a íons metálicos, particularmente ao manganês com uma atividade residual de 242,30%, e parcialmente inibida pelo fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), sugerindo que pertence à classe das serina proteases. A enzima pré-purificada degradou 41,52% do coágulo *in vitro*. Degradou efetivamente o fibrinogênio, demonstrou ser atóxica nas linhagens de células testadas (MDA-MB-231 e J774.A1) e levemente hemolítica. Por fim apresentou um discreto prolongamento do Tempo de Protrombina (TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) e não influenciou no o Tempo de Trombina (TT). Estes achados destacam o potencial desta protease fibrinolítica de *Bacillus megaterium* como uma candidata promissora para o desenvolvimento de novas terapias trombolíticas para doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Enzima fibrinolítica; *Bacillus megaterium*; Caracterização

1. INTRODUÇÃO

A fibrina é uma glicoproteína essencial na coagulação sanguínea, sendo responsável pela formação do trombo. O acúmulo excessivo de fibrina nos vasos sanguíneos está tipicamente associado a doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, que são as principais causas de mortalidade em seres humanos. A estreptoquinase, o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio uroquinase (u-PA) são os agentes trombolíticos comumente utilizados no tratamento da trombose. Embora eficazes, esses agentes apresentam algumas limitações, incluindo efeitos colaterais indesejáveis como hemorragia excessiva e recorrência de trombose em local residual, além de custos elevados (Vijayaraghavan *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). Portanto, é crucial a pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias trombolíticas que sejam seguras e eficazes na remoção de trombos sanguíneos. Complementarmente, as proteases encontradas em plantas, animais e microrganismos emergem como moléculas bioativas promissoras para a degradação de trombos sanguíneos. Utilizando técnicas de fermentação, essas proteases podem ser obtidas e purificadas em um período relativamente curto, demonstrando alta seletividade de substrato e atividade catalítica significativa (Razzaq *et al.*, 2019).

As enzimas fibrinolíticas são proteases responsáveis pela clivagem da malha de fibrina em coágulos sanguíneos, que são os principais agentes causadores de doenças cardiovasculares (Ali e Bavisetty, 2020). Atraindo assim interesse médico devido essa especificidade a fibrina e por seu baixo custo de produção (Pan *et al.*, 2019). Devido suas vantagens, as enzimas fibrinolíticas de origem microbiana vêm ganhando destaque, por sua especificidade de substrato, facilidade de manuseio, e por sua facilidade de manipulação genética para produção de enzimas de alto nível. Existem várias cepas promissoras que foram isoladas especialmente de alimentos fermentados (Ali *et al.* 2022)

Bactérias do gênero *Bacillus*, como *Bacillus megaterium*, são habitantes comuns de solos e fazem parte do microbioma de diversas plantas hospedeiras ao redor do mundo, atuando principalmente como bactérias promotoras do crescimento em plantas (BPCP). Essas bactérias são capazes de colonizar solos e tecidos vegetais e produzir uma variedade de compostos bioativos que estão envolvidos na

promoção do crescimento vegetal, sendo de interesse biotecnológico e industrial por ser fonte de metabólitos e enzimas (Nascimento *et al.*, 2020). O gênero *Bacillus* é o principal produtor da maioria das enzimas fibrinolíticas bacterianas, sendo a Nattokinase uma protease fibrinolítica e comumente conhecida produzida a partir da *Bacillus subtilis* *natto* (Ahamed *et al.*, 2022; Salunke *et al.*, 2022).

Diante desta problemática, o presente trabalho visa produzir e caracterizar uma nova enzima proteolítica obtida do *Bacillus megaterium*, mediante processo fermentativo. Portanto, a biomolécula foi purificada, seguida de análise de sua atividade enzimática por meio de ensaios de hidrólise de substratos proteicos específicos. Adicionalmente, foram realizadas a caracterização bioquímica, visando identificar as condições ideais. Este estudo poderá contribuir para distintas áreas biotecnológicas, especialmente, para futuras aplicações industriais farmacêuticas.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da bactéria e produção da enzima

A bactéria *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) foi isolada da cana de açúcar e encontra-se depositada na coleção de cultura do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA).

A produção da enzima foi realizada por fermentação submersa, inoculada em meio TSB (Tryptic Soy Broth) (50 mL) em Erlenmeyer de 125 mL a 28 °C por 24 horas. Após a padronização da concentração celular de cada microrganismo em 10⁶ UFC/mL, e posteriormente cultivada em Erlenmeyer de 250 mL. O meio de cultura utilizado para a produção da enzima foi o meio MS-2, descrito por Porto, em 1996. No entanto, o meio foi modificado adicionando 50 mL de filtrado de sementes de *Gliricidia sepium*. O meio de cultura consistiu em 2,0% (p/v) de farinha de semente de *Gliricidia sepium* como substituto da soja, além de 0,06% (p/v) de MgSO₄ .7H₂O, 0,1% (p/v) de NH₄Cl, 0,435% (p/v) de K₂HPO₄, 1% de glicose e 0,1 mL de solução mineral contendo 100 mg de FeSO₄, MnCl₂.4H₂O, ZnSO₄ e CaCl₂.H₂O dissolvidos em 100 mL de água destilada. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0, e as culturas foram

incubadas em um agitador orbital a 160 rpm e 29 °C. A cada 24 horas, foram coletadas alíquotas dos Erlenmeyer contendo o extrato fermentativo, até completar 120 horas de fermentação. O método de coleta consistiu em centrifugar os conteúdos a 5000 rpm por 15 minutos e coletar o sobrenadante, que foi chamado de extrato bruto.

2.2. Determinação da atividade proteásica

Para determinar a atividade proteásica, utilizou-se o método de Ginther (1979). Nesse método, adicionou-se 150 µL do extrato bruto fermentado, contendo proteases fibrinolíticas, em seguida adicionou 250 µL de substrato de azocaseína a 1% em microtubos (1,5 mL) (Kasvi, Curitiba, Brasil), foram incubadas a 28 °C por 1 h. Em seguida ocorreu a interrupção da reação pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, as amostras foram centrifugadas (14.000g 15 min) e o sobrenadante 0,8 mL foi homogeneizado com 0,2 mL de NaOH 1,8 M. As amostras foram misturadas no vórtex e a absorbância foi medida a 420 nm e a atividade enzimática (1 U/mL) foi definida como um aumento de 0,1 na absorbância.

2.3. Determinação de proteína

A concentração de proteína total das amostras foi medida pelo método de Bradford (1976). Utilizou-se o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 e a albumina sérica bovina como padrão. Cada experimento foi feito em triplicata e os resultados, corrigidos pelas amostras em branco, foram expressos como média dos valores obtidos.

2.4. Preparação do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato para purificação da enzima

Para preparação do sistema de duas fases aquosas (SDFA) foram utilizados tubos graduados de 15 mL a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, contendo fosfato de sódio e soluções de polietilenoglicol (PEG) em diferentes concentrações. Foi adicionado 2,0 g de extrato bruto até obter um peso final de 10 g a 37 °C, todos os componentes do sistema foram combinados e em seguida agitados em vórtex por 1 minuto. Posteriormente, as fases superior e inferior foram separadas por sedimentação espontânea durante 60 minutos, e os volumes das fases de PEG e Sal (V_{PEG} e V_{SAL})

foram medidos. Por último, as duas fases foram submetidas à análise para determinação de proteínas e atividade proteásica.

2.5. Determinação dos parâmetros do Sistema de Duas fases aquosas

O coeficiente de partição da protease foi determinado como a proporção da atividade proteolítica, em U/mL, em sua fase superior de polietilenoglicol (F_{PEG}) e na fase inferior de sal (F_{SAL}):

$$K = \frac{F_{PEG}}{F_{SAL}}$$

O rendimento da atividade foi calculado como a proporção da atividade total na fase superior ou inferior em relação ao extrato bruto ($F_{EXTRATO}$), expressa em porcentagem. Para isso, multiplicamos a atividade fibrinolítica na fase PEG (AF_{PEG}) ou atividade fibrinolítica na fase sal (AF_{SAL}) pelo volume de PEG ou SAL (V_{PEG} ou V_{SAL}), respectivamente, e a atividade fibrinolítica do extrato bruto ($AF_{EXTRATO}$) pelo volume total inicial do extrato bruto ($V_{EXTRATO}$):

$$\frac{Y_{PEG} (\%)}{Y_{SAL}} = \frac{\left(\frac{AF_{PEG}}{AF_{SAL}} \times \frac{V_{PEG}}{V_{SAL}} \right)}{AF_{EXTRATO} \times V_{EXTRATO}} \times 100 \quad (2)$$

A atividade específica (AE) foi estabelecida como a relação entre a atividade enzimática (U/mL) e a concentração de proteína (mg/mL).

O fator de purificação na fase PEG ou SAL foi determinada como a razão entre a atividade específica correspondente (AE_{PEG} ou AE_{SAL}) e a atividade específica do extrato bruto ($AE_{EXTRATO}$), todas expressas em U/mg:

$$FP_{\frac{PEG}{SAL}} = \frac{\frac{AE_{PEG}}{SAL}}{AE_{EXTRATO}} \quad (3)$$

2.6. Planejamento fatorial para a seleção preliminar dos parâmetros de purificação

Para a influência das variáveis independentes, como a concentração de PEG (C_{PEG}) e concentração de fosfato de sódio (C_{SAL}) sobre as variáveis de resposta K , $FP_{PEG/SAL}$ e $Y_{PEG/SAL}$. Foi adotado o planejamento fatorial 2^2 , conforme detalhado na tabela 1, com quatro repetições no ponto central para permitir uma estimativa de erro experimental. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo Software Statistica 8.0.

Tabela 1- Planejamento experimental para extração das proteases com atividade fibrinolítica produzidas por fermentação de *Bacillus megaterium* (IPA-CC65), utilizando massa molar de PEG 4000 g/mol.

Variáveis	Níveis		
	Abaixo (-1)	Central (0)	Alto (+1)
^a C_{PEG} (% m/m)	12,5	15,0	17,5
^b C_{PHO} (% m/m)	10,0	12,5	15,0

^aConcentração do PEG

^bConcentração do sal

2.7. Caracterização bioquímica

2.7.1. Efeito da temperatura na atividade e na estabilidade da enzima

Foram avaliados a influência da temperatura na atividade enzimática por meio da incubação da enzima em diferentes temperaturas (10, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C) por 60 minutos, seguido pela medição da atividade residual. Para a estabilidade térmica foi testada a 50°C onde as atividades enzimáticas residuais foram analisadas com variações de tempo (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 minutos), conforme Nascimento *et al.* (2017). As análises foram realizadas em triplicata.

2.7.2. Efeito do pH na atividade e na estabilidade da enzima

O pH ótimo da enzima fibrinolítica foi identificado seguindo a metodologia de Nascimento *et al.* (2017), por meio da avaliação da sua atividade proteolítica. Para entender os efeitos do pH nessa atividade, a enzima foi mantida em temperatura

ambiente em diversas soluções de tampão (0,1M), acetato de sódio- ácido acético (pH 3,0 a 5,0), citrato fosfato (pH 5,0 a 7,0), Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0 a 11,0). Para avaliar a estabilidade do pH, a enzima foi incubada em seu pH ótimo até 36 horas, e as atividades enzimáticas residuais foram analisadas com variações de tempos 0, 1, 6, 12, 24 e 36 horas. Foram realizadas triplicata das análises.

2.7.3. Efeito de íons metálicos sobre a atividade proteásica

A atividade da enzima foi examinada na presença dos íons metálicos: Cu^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , em uma concentração de 5,0 mM após ser incubada por 60 minutos em temperatura ambiente (Nascimento *et al.* 2017).

2.7.4. Efeito de inibidores e surfactantes na atividade proteásica

Para análise dos efeitos dos inibidores na atividade proteolítica, a enzima foi exposta incubada por 60 minutos à temperatura ambiente a diferentes inibidores em uma concentração de 5,0 mM, foram eles: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ácido iodoacético 1%, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), e 2-mercaptoetanol. Da mesma forma, foram testadas substâncias surfactantes: Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween 20), monooleato de sorbitano etoxilado (Tween 80), dodecilsulfato de sódio (SDS) e Triton X-100. Após esse período de incubação, a atividade residual foi quantificada e os resultados apresentados como uma porcentagem em relação ao controle (Nascimento *et al.* 2017).

2.7.5. Determinação da atividade amidolítica

A atividade amidolítica seguiu a metodologia de Kim *et al.* (1996), onde foi medida espectrofotometricamente usando cloridrato de N α -benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida (número de catálogo B4875, Sigma-Aldrich), N-succinil-Gly– Gly–Phe-p-nitroanilida (número de catálogo S1899, SigmaAldrich) e N -succinil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (número de catálogo S2628, SigmaAldrich) como substratos cromogênicos. A mistura de reação (200 μL) contendo 30 μL de solução de enzima, 30 μL de um substrato cromogênico e 140 μL de 20 mM Tris–HCl, pH 7,4, incubada por 30 min à 37° C, e a quantidade de p- nitroanilina determinada por espectrofotometria UV-Vis a 405 nm. Uma unidade de atividade amidolítica (UA) foi

expressa como o número de micromoles de substrato hidrolisado pela enzima por minuto e por mL.

2.8. Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE)

O procedimento de SDS-PAGE seguiu o método de Laemmli (1970). O gel foi preparado nas concentrações de 5% (gel de empilhamento) e 12% (gel de corrida) utilizando reagentes cuba da Bio-rad. O gel foi corado com solução de Coomassie Brilliant Blue, em seguida analisado pelo densitômetro Bio-DS-5000 plus Microtek e pelo software LPixImage (Loccus Biotecnologia®).

2.9. Zimograma de fibrina

A atividade fibrinolítica foi analisada por meio de um zimograma de fibrina, seguindo a metodologia de Kim *et al.* (1998) com algumas modificações. Foi preparado um gel de poliacrilamida a 12% contendo 0,12% (m/v) de fibrinogênio, o qual foi incubado em banho-maria a 37°C até a dissolução completa do fibrinogênio. Em seguida, foi adicionado uma solução de trombina (1 U/ml) e 10 µL da enzima pré-purificada foram utilizadas para realizar a eletroforese no gel de fibrina. Após a eletroforese, o gel foi lavado com Triton X-100 a 2,5% (v/v) por 10 minutos, lavado 3 vezes com água destilada e incubado em tampão de reação (100 mM Tris-HCl pH 7,5) em banho-maria a 37°C por 16 horas. Ao finalizar o gel foi novamente lavado com água destilada e para coloração foi utilizado o Coomassie Brilliant Blue R-250, conforme a metodologia de Laemmli (1970).

2.10. Obtenção do fibrinogênio humano e degradação trombolítica *in vitro*

A atividade trombolítica foi avaliada usando fibrinogênio humano proveniente do plasma sanguíneo fornecido pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE, em uma colaboração aprovada pelos comitês de Ética em Pesquisa da UFPE e do HEMOPE (CAAE: 57637516.7.0000.5208).

Seguindo a metodologia de Couto *et al.* (2022) a avaliação da degradação trombolítica *in vitro* foi realizada utilizando tubos de vidros, nos quais foram adicionados 1 mL de plasma, 200 µL de solução de trombina (20 U/mL) e incubados a 37 °C por 10 minutos. Após esse período, cada trombo de fibrina formado foi pesado utilizando balança analítica. Em seguida, em cada tubo contendo o trombo

previamente pesado, foi adicionado 200 µL do extrato contendo a protease fibrinolítica, seguido de uma nova incubação à 37 °C por 90 minutos. Este procedimento foi realizado em triplicata, sendo o controle efetuado utilizando 200 µL de solução salina 0,15 M.

Ao final da reação, o trombo foi pesado e o cálculo do percentual de degradação foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Degradação \%} = (\text{Peso do trombo antes da enzima} - \text{Peso do trombo depois da enzima}) \times 100$$

(4)

2.10. Determinação da atividade fibrinogenolítica da protease

A atividade fibrinogenolítica foi medida de acordo com o descrito por Park et al. 2013. Para o ensaio foi incubado a 37 °C um total de 200 µL de mistura da reação consistindo em 100 µg de fibrinogênio humano (bolsas de plasma cedidas pelo HEMOPE) e 100 µL da enzima trombolítica purificada em tampão Tris-HCl 25mM (pH 7,5); toda essa mistura foi realizada em um tubo de microcentrífuga. Foram retirados 20 µL dessa mistura nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. A reação é interrompida pela adição de 4 µL de tampão de amostra SDS-PAGE. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE 12 % como descrito por Chang et al. (2005).

2.11. Ensaio de citotoxicidade

Foram utilizadas células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231) e macrófagos (J774A.1) obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem MDA-MB-231 foi cultivada em meio L-15 de Leibovitz e F-12 (50% de cada meio) com 2 mM de L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO₂. A linhagem J774A.1 foi mantida em Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 5% de CO₂. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer para determinar a viabilidade celular.

Um ensaio de 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) foi utilizado para avaliar a viabilidade celular a partir da enzima fibrinolítica do

Bacillus megaterium, seguindo a metodologia de Mosmann (1983). As células foram inseridas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1×10^4 de células/mL e após 24h de incubação a enzima fibrinolítica foi exposta durante 24h às concentrações finais de 300, 150, 75, 17,5 e 8,75 µg/mL. Após o período de exposição, foram adicionados 20µL de solução de MTT (4mg/mL), e as placas foram incubadas durante 2-3h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 100µL de DMSO (Dimethylsulfoxide) foram adicionados. A absorbância (Abs) foi medida em Leitor de Microplaca (Biotek Elx808) a 630nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular:

(Abs da população celular tratada X 100 / Abs da população celular não tratada) e os resultados da atividade citotóxica foram expressos como as médias das repetições $\pm$ desvio padrão (Da Silva *et al.*, 2019).

2.12. Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada usando sangue humano de um voluntário saudável do sexo masculino. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CAAE: 63547722.6.0000.5208). A análise foi realizada seguindo a metodologia de Rajendran *et al.* (2017). Inicialmente, foram adicionados 2 mL de sangue total em 4 mL de PBS e centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos para isolar as células vermelhas do sangue (RBCs). As hemácias foram lavadas duas vezes com 10 mL de PBS e, em seguida, diluídas em 20 mL de PBS. Da suspensão final, 0,4 mL foi diluído em 1,6 mL da enzima fibrinolítica em concentrações final de 2,5; 5 e 10 mg/mL. Os grupos controle foram divididos em: PBS: (controle negativo), água destilada e Triton-X (controle positivo). As amostras foram incubadas a 37 °C por 1 hora e, posteriormente, centrifugadas por 5 minutos a 10.000 rpm a 20 °C. A absorbância foi medida a 540 nm. O grau de hemolítico foi calculado usando a fórmula:

$$Hemólise \% = \left(\frac{Absorbância_{TESTE} - Absorbância_{NEGATIVO}}{Absorbância_{POSITIVO} - Absorbância_{NEGATIVO}} \right) \times 100$$

(5)

2.13. Determinação dos tempos de coagulação

Para determinar os tempos de coagulação foram realizados os testes de tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) realizados

em um coagulômetro semiautomático (Maxcoag, Urit medical Eletronic CO., China) utilizando os reagentes da BIOS Diagnóstica (Sorocaba, Brasil), conforme as instruções do fabricante. Para a realização do ensaio, foi utilizado um pool de plasma humano de 5 indivíduos saudáveis para os testes fornecidos pelo fabricante. O estudo foi realizado mediante a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (CAAE nº 63547722.6.0000.5208). Os controles dos ensaios TTPa e TP foram realizados com 25µL de solução salina (NaCl, 0,9%) e 100µL de plasma. Para avaliar o efeito anticoagulante, foi utilizada protease fibrinolítica pré-purificada nas concentrações de 2,5 mg/mL, 5 mg/mL e 10 mg/mL, deixando-as em contato com o plasma padrão por até 30 min. Após esse tempo, foi analisada a obtenção dos tempos de coagulação através do equipamento apropriado. A avaliação de tempo de trombina (TT) foi realizada de acordo com a metodologia de Wang *et al.* (2011) com algumas modificações. Inicialmente, 50 µL de protease fibrinolítica (1 mg/mL) foram colocados em contato com 100 µL de trombina (20 U/mL) por 30 min, logo após este período, a solução foi transferida para eppendorfs (2 mL) contendo uma mistura de 400 µL de Tris-HCl-NaCl 150 mM pH 7,75, 100 µL de tampão fosfato 245 mM pH 7,0 e fibrinogênio bovino 0,72%, sendo colocados em banho-maria a 37 °C até observação da formação de coágulo de fibrina.

3. RESULTADOS

3.1. Produção das proteases fibrinolíticas e determinação das atividades proteásica e proteínas totais

Foi possível observar na tabela 2 a produção da protease em relação ao tempo de fermentação submersa da bactéria produtora *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) em um meio de cultura modificado com adição de filtrado de sementes de *Gliricidia sepium*, a atividade variou entre 7,55 e 21,82 U/mL, com o melhor tempo de produção de 72 horas de fermentação. No mesmo intervalo de tempo foi analisada a quantidade total de proteínas, onde foi determinado um quantitativo de 0,161 mg/mL. Considerando tanto a atividade proteásica quanto a atividade de proteínas, atingimos uma atividade específica da enzima de 134,39 U/mg de proteína após 72 horas. Esse

resultado foi superior ao obtido por Couto et al., (2022) na produção de uma protease por *Paenibacillus graminis* MC 2213, onde o melhor tempo de fermentação foi de 96 horas com atividade proteica de 15,9 U/mL.

Tabela 2- Produção de protease por *Bacillus megaterium* (IPA- CC65)

<i>Bacillus megaterium</i> (IPA-CC65)	
Tempo (horas)	Atividade Proteásica (U/mL)
24	7,55
48	8,37
72	21,82
96	17,92
120	9,22

3.2. Purificação da protease produzida por sistema de duas fases aquosas (SDFA)

Após a fermentação de 72 horas do *Bacillus megaterium* (IPA-CC65), o extrato bruto foi submetido ao SDFA. Os resultados experimentais, conforme o planejamento fatorial 2², apresentados na Tabela 3. De acordo com a tabela foi possível observar que os ensaios apresentaram um coeficiente de partição $K > 1$, indicando que a enzima foi preferencialmente para a fase superior que é rica em PEG.

Tabela 3- Resultados experimentais de acordo com o planejamento fatorial 2² de extração das proteases com atividade fibrinolítica produzidas por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) com 72 horas de fermentação utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA).

Ensaio	^a C _{PEG} 4000 (%)	^b C _{fosfato} % (m/m)	^c Atividade Proteásica a (PEG)	^d Atividade Proteásica (SAL)	^e PT (mg/mL) PEG	^f PT (mg/mL) SAL	^g K	^h Y (PEG)	ⁱ Y (SAL)	^j FP (PE G)	^k FP (SAL)	^l BM (%)
1	12,5	10,0	14,33	12,00	46,00	97,56	1,19	23,88	15,38	2,47	0,97	98,16
2	17,5	10,0	26,66	15,00	61,93	88,18	1,77	41,02	189,47	3,42	1,35	100,66
3	12,5	15,0	20,66	10,33	144,43	63,81	2,00	21,19	257,69	1,13	1,28	104,68
4	17,5	15,0	25,33	13,33	46,31	95,68	1,90	25,98	199,56	4,35	1,10	109,35
5 C	15,0	12,5	19,60	8,66	43,81	78,18	2,26	175,89	88,88	3,55	0,88	106,75
6 C	15,0	12,5	21,00	8,00	49,43	70,06	2,62	188,46	82,05	3,37	0,90	102,15
7C	15,0	12,5	19,66	9,00	49,75	81,93	2,18	176,49	92,30	3,14	0,87	106,34
8C	15,0	12,5	18,30	9,33	68,81	85,68	1,96	164,23	95,69	2,11	0,86	103,09

^a Concentração de PEG

^b Concentração de fosfato

^c Atividade proteásica na fase PEG

^d Atividade proteásica na fase SAL

^e Proteínas totais na fase PEG

^f Proteínas totais na fase SAL

^g Coeficiente de partição

^h Rendimento da atividade proteásica na fase PEG

ⁱ Rendimento da atividade proteásica na fase SAL

^j Fator de purificação da fase PEG

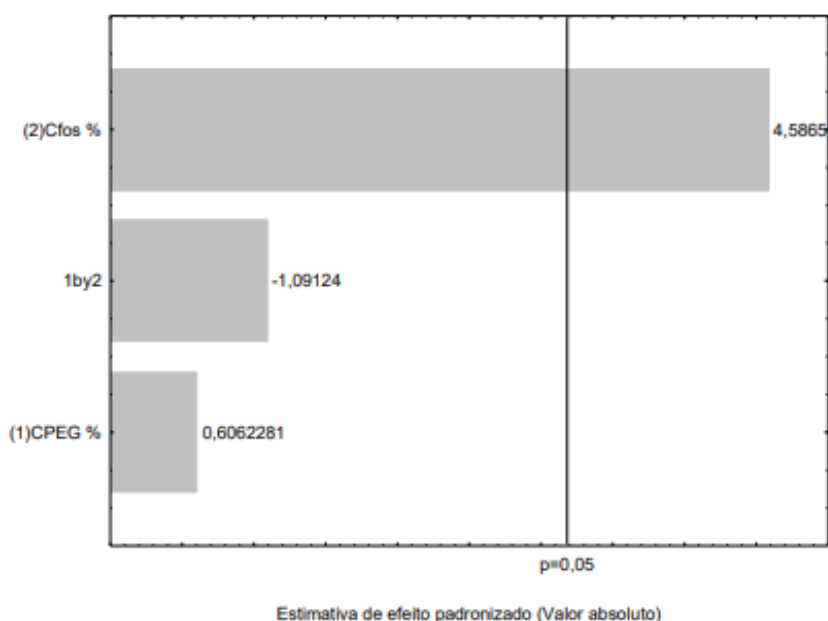
^k Fator de purificação da fase SAL

^l Balanço de massa

Na tabela 3 podemos observar que os pontos centrais (C) foram os relevantes entre todos os ensaios, ao particionar a enzima para a fase rica em PEG, na maior massa molar de PEG ($M_{\text{PEG}} = 4000 \text{ g/mol}$), concentração de PEG ($C_{\text{PEG}} = 15,0 \%$) e concentração de fosfato ($C_{\text{FOSFATO}} = 12,5\%$).

A análise estatística revelou a influência das variáveis de PEG (C_{PEG}) e concentração de fosfato (C_{FOSFATO}) no coeficiente de partição (K). Na figura 1, observamos que C_{FOSFATO} (4,58) teve um impacto positivo na partição da enzima de forma isolada, isso significa que aumentando na quantidade de C_{FOSFATO} resulta em uma maior partição da enzima para a fase PEG. Essa preferência da enzima pela fase PEG pode ser explicado por um efeito chamado *salting-out*, onde a biomolécula migra para a fase superior devido à grande quantidade de sal na fase inferior do sistema, enquanto as moléculas de água saem da estrutura proteica para interagir com os íons (SILVA *et al.*, 2020), resultados semelhantes foram descritos na produção de protease obtidas a partir de *Streptomyces parvulus* (Alencar *et al.*, 2021), *Aspergillus aculeatus* URM4953 (Silva *et al.*, 2018) onde as enzimas também se concentraram na fase superior rica em PEG.

Figura 1- Efeito das variáveis no coeficiente de partição da enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) após 72 horas de fermentação.

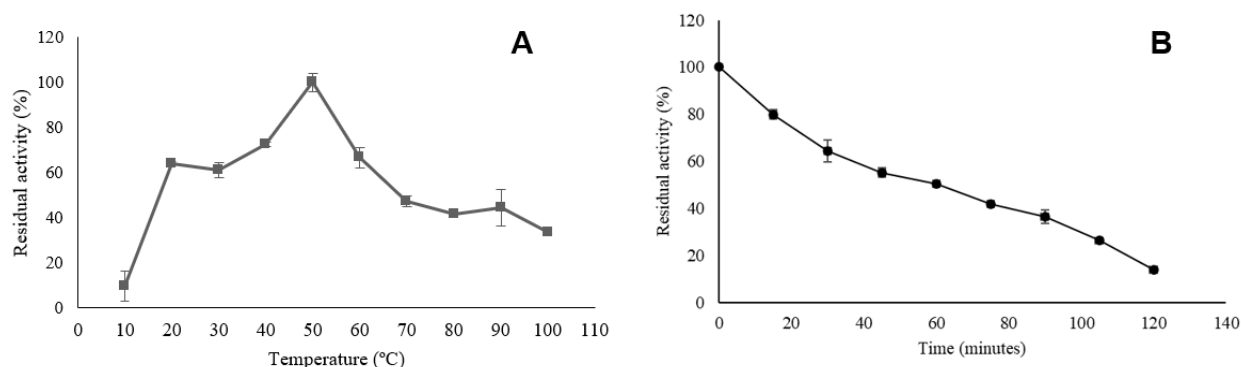


3.3. Caracterização bioquímica

3.3.1. Efeitos da temperatura e do pH sob a estabilidade e atividade enzimática

A temperatura ótima da atividade da enzima foi realizada através de testes de atividade relativa com variações de temperatura da reação entre 10 e 100°C, na figura 2A é possível observar que a enzima teve atividade máxima a 50 °C, e permaneceu estável por 20 minutos a 50°C, com atividade residual de 80% (figura 2B), corroborando com outros estudos similares. Asker e colaboradores (2013) demonstraram a obtenção da atividade máxima das fracções de protease purificadas de *B. megaterium* em 50°C, mantendo a termoestabilidade até 80°C. Outros estudos relatam a obtenção de proteases obtidas a partir de bactérias do gênero *Bacillus*, com temperatura ideal da enzima semelhantes como *Bacillus tequilensis* (Xin *et al.*, 2018), *Bacillus subtilis* DC27 (Hu, *et al.*, 2019), *Bacillus cereus* RSA1 (Sharma *et al.*, 2019), onde apresentaram sua atividade máxima em 40, 45 e 50° C, respectivamente.

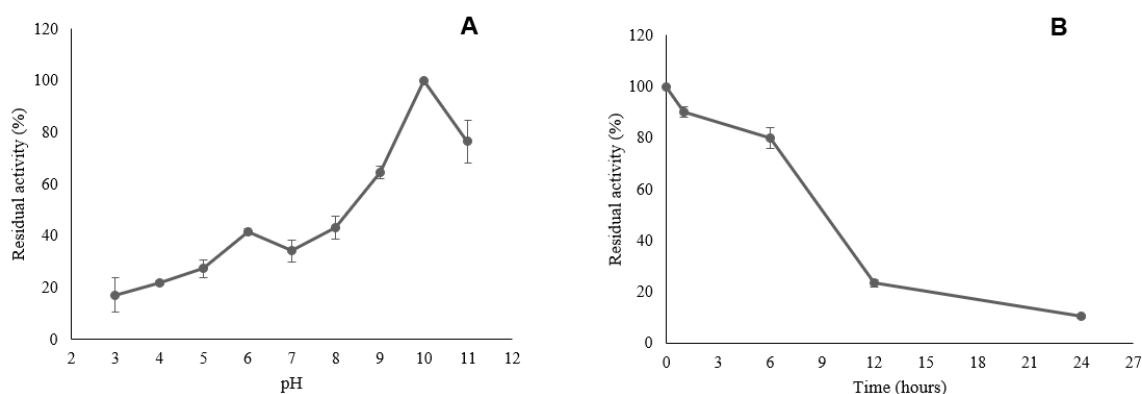
Figura 2- Efeito da temperatura e estabilidade na atividade fibrinolítica da enzima produzida por *Bacillus Megaterium* IPA- CC65.



O pH ótimo para atividade da protease foi detectado no pH 10,0 na presença do tampão de NaOH-glicina, na qual a atividade enzimática atingiu 100%, foi possível observar também perda dessa atividade no pH ácido (figura 3A), sendo assim caracterizada como uma protease alcalina. A protease se manteve estável durante 6 horas como pode ser observado na figura 3B. Esta característica está de acordo com estudos anteriores que reportam proteases alcalinas bacterianas que possuem espectro de atividade entre os pH 8,0 e 12,0 além de possuir termoestabilidade em temperaturas elevadas (Solanki *et al.*, 2021). Estudos experimentais com enzimas

produzidas a partir de *Bacillus safensis* RH12, obtiveram dados com pH ótimo em 9,0 mostrando estabilidade na faixa de pH de 7 a 11 (Rekik et al., 2019), para a *Bacillus tequilensis* apresentou pH ideal em 10,5 mantendo-se estável na faixa de pH 5,0 e 12,0 (Xin et al., 2018).

Figura 3- - Influência do pH e estabilidade na atividade fibrinolítica da enzima produzida por *Bacillus Megaterium* IPA- CC65



3.3.2. Efeitos dos íons metálicos na atividade proteásica

Foi realizada análise dos íons metálicos pois atuam como moduladores positivos e negativos da atividade enzimática, sendo seu efeito de extrema importância para melhorar o potencial terapêutico das enzimas (Couto et al. 2020). Como podemos observar na tabela 4, dos íons analisados na concentração de (5mM), o Ferro Férrio (Fe^{3+}) foi o único que reduziu parcialmente a atividade proteásica levando a uma atividade residual de 73,07%, em contrapartida houve um aumento na atividade residual na presença dos íons (Cu^{2+} , Mn^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}) em especial o Manganês (Mn^{2+}) com uma atividade residual de 242,30%. Na caracterização da enzima produzida pelo *Bacillus velezensis* BS2 observou aumento da atividade Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} e inibida por Fe^{3+} , Zn^{2+} , K^+ , e Co^{2+} (Yao et al., 2019), já a produzida pelo *Bacillus safensis* RH12 as atividades enzimáticas foi ativada pelo Mn^{2+} , e inibida pelo Ni^{2+} , Hg^{2+} e moderadamente inibida pelo Fe^{2+} (Rekik et al., 2019). A estimulação por Mn^{2+} pode estar relacionada ao seu papel como cofator em diversas enzimas.

Tabela 4- Influência dos íons metálicos (5mM) na atividade da protease produzida por *Bacillus Megaterium* IPA- CC65

Íons metálicos	Atividade Residual (%)
Controle	100.00
Cu²⁺	126.94
Mn²⁺	242.30
K⁺	176.92
Zn²⁺	146.15
Mg²⁺	130.77
Na⁺	157.69
Ca²⁺	100.00
Fe²⁺	134.61
Fe³⁺	73.07

3.3.3. Efeitos da inibidores e surfactantes na atividade proteásica

Foram analisados vários inibidores da atividade proteásica como descrito na tabela 5, que ficaram em contato com a enzima por 60 minutos e após esse tempo foi possível observar que houve inibição parcial da atividade enzimática pelo Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF). O PMSF é conhecido por apresentar um comportamento de inibidor específico de serino proteases, sugerindo que a enzima pertence a essa classe, onde apresentam atividade fibrinolítica indireta e direta e são inativadas na presença do inibidor (Hazare *et al.*, 2024).

Tabela 5- Efeito dos inibidores (5mM) na atividade fibrinolítica produzida por *Bacillus Megaterium* IPA- CC65.

Inibidores	Atividade Residual (%)
Controle	100
EDTA	93.75
Ácido iodoacético	122.5
PMSF	36.25
2-Mercaptoetanol	92.5

A atividade proteásica da enzima também foi analisada na presença de diferentes surfactantes na concentração de 5mM, como pode ser observado na tabela

6 não houve aumento na atividade enzimática após incubação, pois a atividade relativa se manteve abaixo de 100%, nenhum dos surfactantes testados estimularam a atividade enzimática.

Tabela 6- Influência dos surfactantes na atividade proteolítica de *Bacillus Megaterium* IPA- CC65.

Surfactantes	Atividade Residual (%)
Controle	100.00
Tween 20	50.66
Tween 80	46.04
SDS	26.43
Triton X-100	35.72

3.3.4. Atividade amidolítica

A atividade amidolítica da protease foi avaliada utilizando três tipos de substratos cromogênicos diferentes, conforme na tabela 7. A enzima demonstrou maior especificidade em contato com o substrato S-1899 (N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide), pouca afinidade pelo substrato S-2628 (N-Succinyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide) e nenhuma afinidade pelo substrato em contato com o B-4875 (N-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride). Esses resultados sugerem que a enzima é uma serino protease com características similares à quimotripsina. Outros estudos com proteases fibrinolíticas apresentaram características semelhantes, como a *Streptomyces sp.* CS624 (Mander *et al.*, 2011), *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Nascimento *et al.*, 2017).

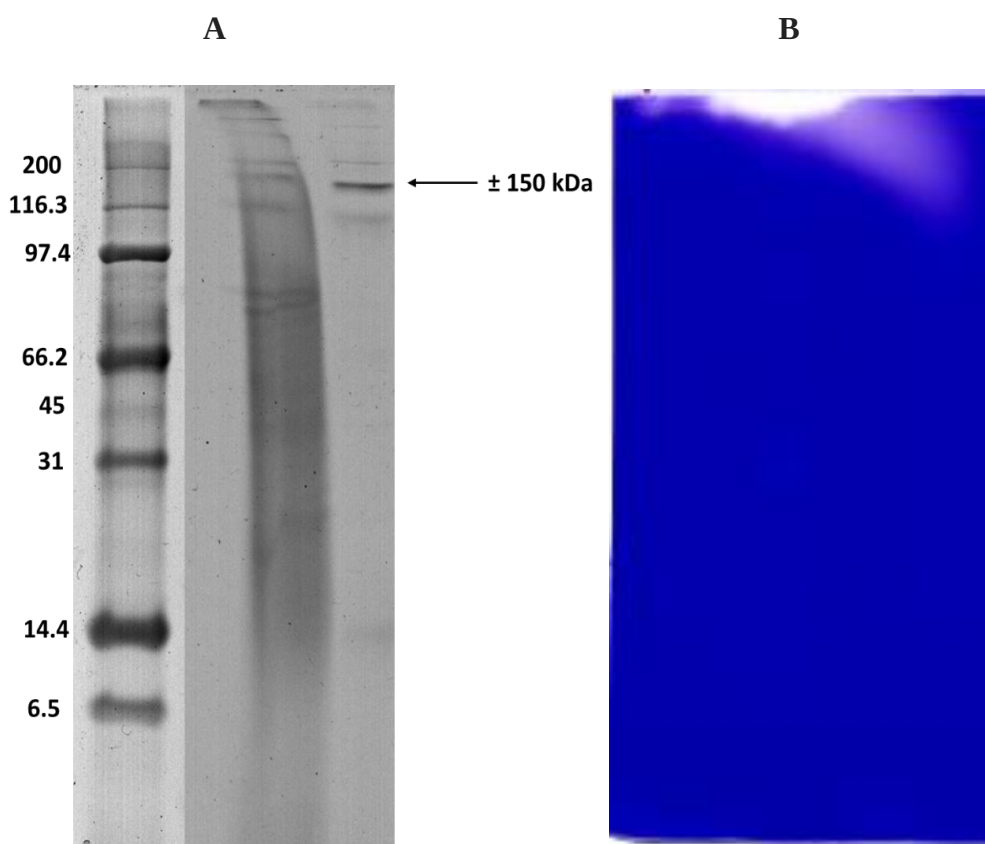
Tabela 7- : Atividade amidolítica da enzima fibrinolítica de *Bacillus Megaterium* IPA-CC65 utilizando substratos cromogênicos típicos com 30 minutos de incubação

Substrato	Enzima	Atividade amidolítica
N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide	Quimotripsina	+++
N-Succinyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide	Quimotripsina	+
N-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride	Tripsina	-

3.4. Eletroforese SDS-PAGE e zimograma de fibrina

Foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE com amostras do extrato bruto e com a fase superior do SDFA rica em PEG onde a enzima fibrinolítica foi preferencialmente particionada para analisar seu grau de pureza, como pode ser observado na figura 4A a massa molecular da protease foi de aproximadamente 150 kDa. Destaca-se que a enzima fibrinolítica descrita neste estudo apresentou um peso molecular em conformidade com os relatos existentes na literatura. Cita-se como exemplo, a protease A4095, isolada de *Anoxybacillus caldiproteolyticus*, que possui um peso molecular de 142,16 kDa (Cheng, PDB: 7XR8). Também se destacam as serinas proteases S393A com um peso molecular de 105,68 kDa (Minasov PDB: 3T41), e a SplA com peso molecular 87.54 kDa (Stec-Niemczyka, *et al.*, 2009) isoladas da *Staphylococcus aureus*.

Figura 4- A: SDS-PAGE (12%) para determinar massa molecular da protease fibrinolítica da *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) e B: Zimograma de fibrina



Também foi realizado um zimograma de fibrina para analisar a capacidade fibrinolítica da enzima, onde foi possível verificar uma zona degradada no gel (Figura 4B), confirmando sua atividade fibrinolítica, a área degradada é compatível com a área da massa molecular encontrada no SDS-PAGE.

3.5. Degradação trombolítica *in vitro*

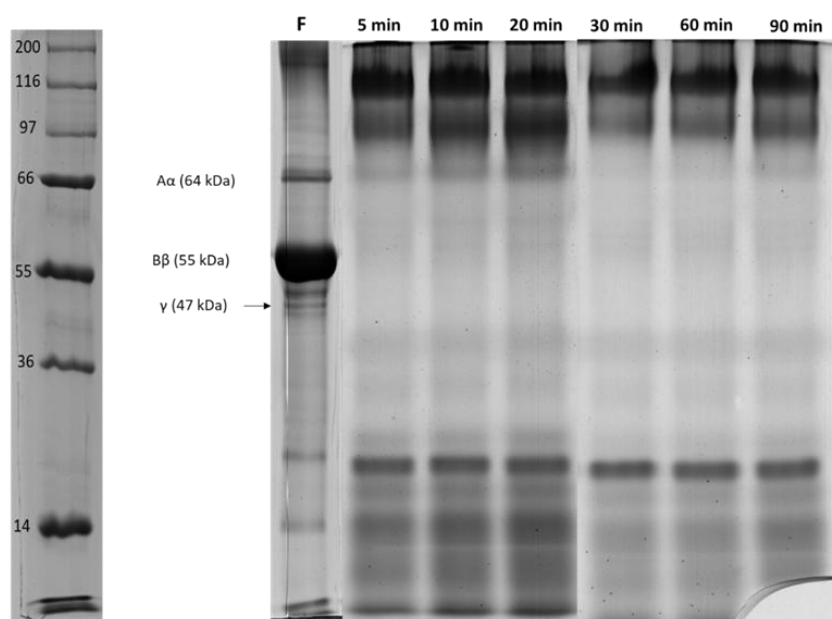
O extrato bruto produzido foi coletado para a determinação da capacidade de degradação trombolítica *in vitro*, e foi obtido um percentual de 29,80% de degradação do trombo *in vitro* com 90 minutos de contato com extrato bruto. Após o extrato passar pelo sistema de duas fases aquosas, a fase PEG foi coletada para análise e foi possível observar um aumento significativo, atingindo 41,52% de degradação do trombo com 90 minutos de contato. O extrato enzimático bruto e a fração purificada demonstraram capacidade de degradar trombos *in vitro*, mas com a fração purificada observou-se um percentual de degradação ainda maior. O resultado obtido foi superior ao obtido pela protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Silva *et al.*, 2019) onde apresentou um percentual de degradação de 32,23% dos trombos *in vitro*.

3.6. Atividade fibrinogenolítica

Em relação a atividade fibrinogenolítica da protease fibrinolítica extraída por SDFA, observou-se uma degradação da cadeia A α do fibrinogênio após 30 minutos de reação, enquanto as cadeias B β e γ foram degradadas em apenas 5 minutos de reação como podemos observar na figura 6. Outros estudos analisaram resultados semelhantes da clivagem da cadeia A α do fibrinogênio após 30 minutos de incubação por uma α fibrinogenase de lagartas *Lonomia obliqua* e uma pró-metaloprotease coagulante (Pinto *et al.*, 2004; Mukherjee, 2008), enquanto que Silva *et al.* (2020) observou também a degradação da cadeia B β por uma protease fibrinolítica de *Gliricidia sepium* com 5 minutos de reação, confirmando os nossos achados. Essa capacidade de degradar fibrinogênio é essencial para a atividade trombolítica, pois o

fibrinogênio é o precursor da fibrina, principal componente dos trombos (Hazare *et al.*, 2024)

Figura 5- Atividade fibrinogenolítica da enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) extraída por SDFA na fase PEG.

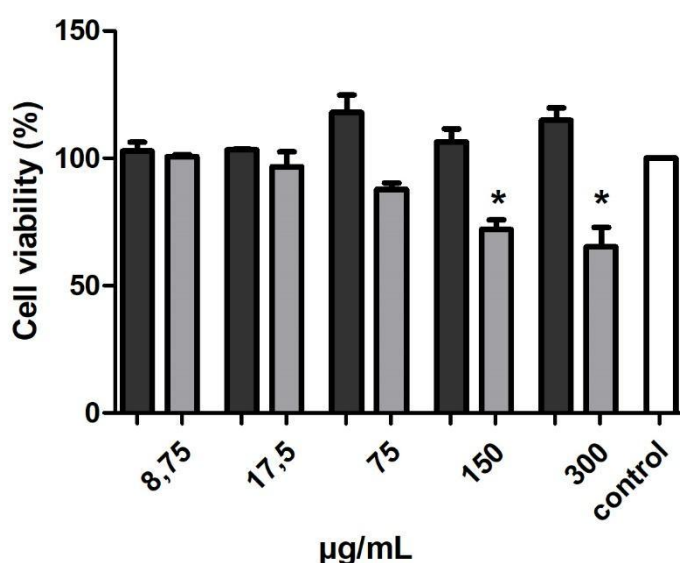


3.7. Citotoxicidade

Foi realizado o teste de citotoxicidade para avaliar a toxicidade da protease produzida pelo *Bacillus Megaterium* IPA- CC65. Foram utilizadas células de macrófagos saudáveis (J774.A1) e células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231). Essas células são frequentemente usadas para avaliar perfis básicos de citotoxicidade de moléculas candidatas a fármaco. Antes da realização de ensaios *in vivo*, essas células permitem uma avaliação preliminar importante porque mostram como os rins e o sistema imunológico respondem a possíveis alterações ou toxicidade (Silva, *et al.*, 2019). Os resultados demonstraram que a enzima fibrinolítica produzida pelo *Bacillus Megaterium* IPA- CC65 mostrou-se atóxica, apresentando uma viabilidade celular superior a 80% frente linhagem celular MDA-MB-231 após 24 horas. Na linhagem J774.A1, a enzima também se mostrou atóxica, mas foi possível observar que com o aumento da concentração 150, 300 µg/mL, respectivamente, houve uma diminuição da viabilidade celular (Figura 6). Resultados semelhantes foram encontrados nos estudos de citotoxicidade da

protease fibrinolítica AfeE produzida por células *Streptomyces* sp. CC5 em células HUVEC que são células endoteliais da veia umbilical humana (Sun *et al.*, 2016) outro estudo com a serino protease Brevithrombolase produzida pela bactéria *Brevibacillus brevis* não houve citotoxicidade nas linhagens celulares HT29 (adenocarcinoma de cólon) e HeLa (carcinoma cervical) (Majumdar *et al.*, 2014)

Figura 6-Viabilidade celular da enzima fibrinolítica produzida por *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) em células MDA-MB-231 e J774.A1



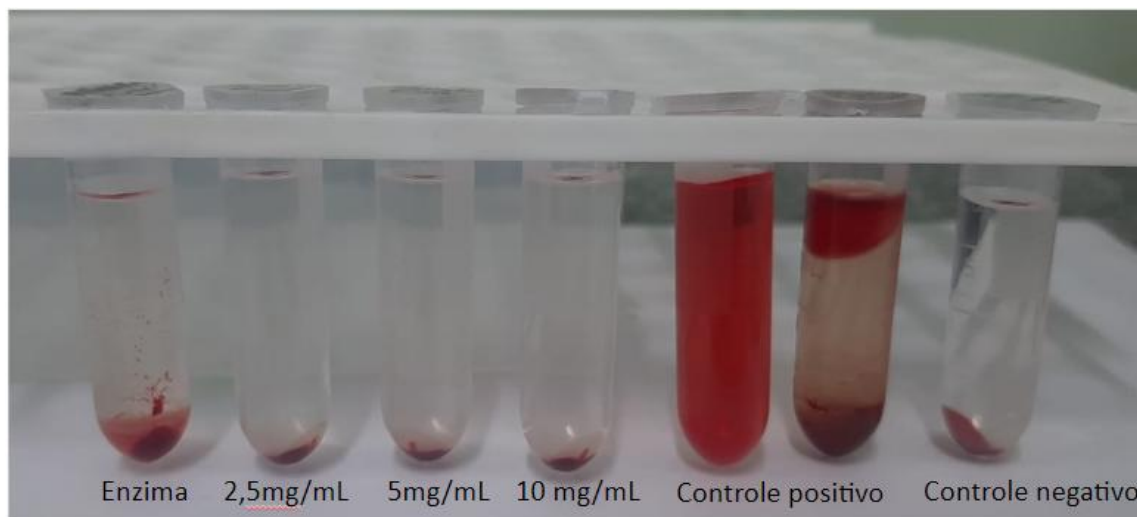
Viabilidade celular em células MDA-MB-231 (cinza escuro) e J774.A1 (cinza claro). As diferenças estatísticas com o controle foram determinadas por ANOVA seguida por Bonferroni, *P < 0,05 vs Controle.

3.8. Atividade hemolítica

Outro teste conduzido para avaliar a toxicidade da enzima fibrinolítica pré-purificada produzida pelo *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) foi a medição de sua atividade hemolítica. Observou-se que a protease é levemente hemolítica nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mg/mL onde apresentou 2,2%, 2,3% e 2,5% de hemólise, respectivamente. Esses valores sugerem que, quando diluída a enzima não teria ação hemolítica significativa. A aparência visual dos resultados pode ser observada na Figura 7. Resultados semelhantes foram obtidos com a enzima produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 que foi levemente hemolítica a 10 mg/mL onde apresentou 2,8% de hemólise (Silva *et al.*, 2019) e com a enzima produzida pelo *Bacillus*

amyloliquefaciens FCF-11 que também foi levemente hemolítica a 15 mg/mL onde apresentou 2,5% de hemólise (Kotb, E., 2014)

Figura 7- Aparência visual da atividade hemolítica frente a enzima obtida pelo *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) em diferentes concentrações.



3.9. Determinação dos tempos de coagulação

Foi analisado se a enzima exerce influência sobre as enzimas envolvidas na cascata de coagulação nas vias intrínseca, extrínseca e comum. Conforme apresentado na Tabela 8, houve um discreto prolongamento do Tempo de Protrombina (TP) com o aumento da concentração da enzima, comparado ao grupo controle. Para o Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPa) houve um prolongamento na maior concentração de 10 mg/mL (Tabela 9). No entanto, a enzima não influenciou o Tempo de Trombina (TT), pois os coágulos se formaram com menos de 1 minuto de contato. Esses resultados sugerem que a enzima pode ter um efeito modulador nas vias extrínseca, intrínseca e que não interfere na fase final da coagulação onde a trombina converte o fibrinogênio em fibrina. Corroborando com resultados obtidos da enzima fibrinolítica *Mucor subtitillissimus* UCP 1262 onde foi observado um prolongamento significativo no tempo de coagulação conforme aumenta a concentração da enzima utilizada (Miranda *et al.*, 2022).

Tabela 8- Tempo de protrombina (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica do *Bacillus megaterium* (IPA-CC65)

TP/ Tempo	Controle	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL	10 mg/mL
15 min	12,8s	12,9s	12,7s	13,5s
30 min	12,6s	12,8s	13,0s	13,3s

Tabela 9- Tempo de tromboplastina parcial ativada (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica do *Bacillus megaterium* (IPA-CC65)

TPPa/ Tempo	Controle	2,5 mg/mL	5,0 mg/mL	10 mg/mL
15 min	29,0s	27,2s	20,6s	31,0s
30 min	30,2s	25,1s	23,1s	28,8s

4. CONCLUSÕES

O presente estudo revelou uma enzima fibrinolítica extraída do *Bacillus megaterium* (IPA-CC65) com potencial significativo para uso em terapias trombolíticas. Os resultados demonstraram que a enzima apresenta alta especificidade e baixa toxicidade, se destacando como uma candidata viável para a indústria farmacêutica. Considerando a necessidade de tratamentos mais eficazes e seguro para as doenças trombolíticas, esta enzima surge como uma alternativa inovadora e promissora. Por fim, faz-se necessário a realização de novos estudos em modelos *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS

AHAMED, N. Anis; ARIF, Ibrahim A.; AL-RASHED, Sarah; PANNEERSELVAM, A.; AMBIKAPATHY, V. In vitro thrombolytic potential of fibrinolytic enzyme from *Brevibacterium sp.* isolated from the root of the plant, Aloe castellorum. **Journal Of King Saud University - Science**, [S.L.], v. 34, n. 3, p. 101868-101879, abr. 2022.

Alencar, V. N. S.; Do Nascimento, M. C.; Dos Santos Ferreira, J. V.; Da Silva Batista, J. M.; Da Cunha, M. N. C.; Do Nascimento, J. M.; Da Silva Sobral, R. V.; Do Couto, M. T. T.; Nascimento, T. P.; Costa, R. M. P. B.; et al. Purification and Characterization of Fibrinolytic Protease from *Streptomyces Parvulus* by Polyethylene Glycol-Phosphate Aqueous Two-Phase System. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 2021, 93, 1–17.

ALI, Ali Muhammed Moula; BAVISETTY, Sri Charan Bindu. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 163, p. 1498-1517, nov. 2020.

ALI, Ali Muhammed Moula; BAVISETTY, Sri Charasolankin Bindu; GULLO, Maria; LERTSIRI, Sittiwat; MORRIS, John; MASSA, Salvatore. Production of fibrinolytic enzymes during food production. **Current Developments In Biotechnology And Bioengineering**, [S.L.], p. 157-187, 2022.

ASKER, Mohsen M.s.; MAHMOUD, Manal G.; SHEBWY, Khalid El; AZIZ, Mohamed S. Abd El. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 103-109, dez. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CHANG, A. K. et al. *Vibrio valnificus* secretes abroad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6909-6916, 2005.

CHENG, J.H., Cao, H.Y., Wang, P. BANK, R. P. D. **RCSB PDB - 7XR8: Structure of the S8 family protease A4095.** Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/7XR8>>. Acesso em: 31 jul. 2024.

COUTO, M. T. T. et al. Production, extraction and characterization of a serine protease with fibrinolytic, fibrinogenolytic and thrombolytic activity obtained by *Paenibacillus graminis*. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 118, p. 335-345, jul. 2022.

GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 522-526, 1979.

HAZARE, Chinmay; BHAGWAT, Prashant; SINGH, Suren; PILLAI, Santhosh. Diverse origins of fibrinolytic enzymes: a comprehensive review. **Heliyon**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 26668-26690, mar. 2024.

HU, Y., Yu, D., Wang, Z. et al. Purification and characterization of a novel highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 selected from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Sci Rep* 9 , 9235 (2019).

Kotb, E. Purification and partial characterization of a chymotrypsin-like serine fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* FCF-11 using corn husk as a novel substrate. **World J Microbiol Biotechnol** 30, 2071–2080 (2014).

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

MAJUMDAR, S. et al. Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochimie**, v. 103, n. 103, p. 50–60, ago. 2014.

MANDER, P. et al. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1449–1455, 1 jul. 2011.

MINASOV, G. *et al.*, Centro de Genômica Estrutural de Doenças Infecciosas (CSGID). BANK, R. P. D. **RCSB PDB - 3T41: 1.95 Angstrom Resolution Crystal Structure of Epidermin Leader Peptide Processing Serine Protease (EpiP) S393A Mutant from Staphylococcus aureus**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/structure/3T41>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

MUKHERJEE, A. K. Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing a-fibrinogenase and tissue haemorrhagic activity from venom of Daboia russelli (Russell's viper): evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. **Toxicon**, v. 51, p. 923-933, 2008.

NASCIMENTO, Francisco X.; HERNÁNDEZ, Anabel G.; GLICK, Bernard R.; ROSSI, Márcio J.. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. **Biotechnology Reports**, [S.L.], v. 25, p. 406-415, mar. 2020.

NASCIMENTO, Thiago Pajeú; SALES, Amanda Emmanuelle; PORTO, Tatiana Souza; COSTA, Romero Marcos Pedrosa Brandão; BREYDO, Leonid; UVERSKY, Vladimir N.; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo; CONVERTI, Attilio. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, [S.L.], v. 40, n. 8, p. 1209-1219, 12 maio 2017.

PAN, Shihan; CHEN, Guiguang; WU, Rui; CAO, Xiaoyan; LIANG, Zhiqun. Non-sterile Submerged Fermentation of Fibrinolytic Enzyme by Marine *Bacillus subtilis* Harboring Antibacterial Activity With Starvation Strategy. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 1025-1038, 17 maio 2019.

PARK, J. W. *et al.* Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriformia tentaculate*. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 979-987, 2013.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, p. 115-122, 1996.

RAZZAQ, Abdul; SHAMSI, Sadia; ALI, Arfan; ALI, Qurban; SAJJAD, Muhammad; MALIK, Arif; ASHRAF, Muhammad. Microbial Proteases Applications. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 7, p. 110-130, 12 jun. 2019.

REKIK, Hatem; JAOUADI, Nadia Zaraî; GARGOURI, Fares; BEJAR, Wacim; FRIKHA, Fakher; JMAL, Najah; BEJAR, Samir; JAOUADI, Bassem. Production, purification and biochemical characterization of a novel detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus safensis strain* RH12. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 121, p. 1227-1239, jan. 2019.

SALUNKE, Asha S.; NILE, Shivraj Hariram; KHARAT, Arun S.. A comparative study on fibrinolytic enzymes extracted from six *Bacillus spp.* isolated from fruit-vegetable waste biomass. **Food Bioscience**, [S.L.], v. 50, p. 102149-102161, dez. 2022.

SHARMA, Chhavi; SALEM, Gad Elsayed Mohamed; SHARMA, Neha; GAUTAM, Prerna; SINGH, Rajni. Thrombolytic Potential of Novel Thiol-Dependent Fibrinolytic Protease from *Bacillus cereus* RSA1. **Biomolecules**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 3, 18 dez. 2019.

SILVA *et al.*, Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 27, p. 101669, ago. 2020.

SILVA, M. M. *et al.* Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 103, p. 282-291, 2019.

SILVA, Jônatas de Carvalho; FRANÇA, Pedro Renann Lopes de; PORTO, Tatiana Souza. Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate. **Journal Of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 263, p. 81-88, ago. 2018.

SOLANKI, P., Putatunda, C., Kumar, A. *et al.* Microbial proteases: ubiquitous enzymes with countless uses. 3 *Biotechnology* 11,428 (2021).

STEC-NIEMCZYK, J. *et al.* Structural and functional characterization of SplA, an exclusively specific protease of *Staphylococcus aureus*. **Biochemical Journal**, v. 419, n. 3, p. 555–564, 14 abr. 2009.

SUN, Z.; Liu, P.; Cheng, G.; Zhang, B.; Dong, W.; Su, X.; Huang, Y.; Cui, Z.; Kong, Y. A Fibrinolytic Protease AfeE from *Streptomyces Sp.* CC5, with Potent Thrombolytic Activity in a Mouse Model. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2016, 85, 346–354.

VIJAYARAGHAVAN, Ponnuswamy; ARASU, Mariadhas Valan; RAJAN, R. Anantha; AL-DHABI, N.A.. Enhanced production of fibrinolytic enzyme by a new *Xanthomonas oryzae* IND3 using low-cost culture medium by response surface methodology. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 2, p. 217-224, fev. 2019.

WU, Rui; CHEN, Guiguang; PAN, Shihan; ZENG, Jingjing; LIANG, Zhiqun. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 6824-6824, 2 maio 2019.

YAO, Z.; KIM, J. A.; JEONG HWAN KIM. Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Secreted by *Bacillus velezensis* BS2 Isolated from Sea Squirt Jeotgal. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 347–356, 28 mar. 2019.

Kim, S.; Choi, N.; Lee, W.; Edgell, M. H.; Pielak, G. J. Fibrin Zymography: **A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels**. 1998, 116, 115–116.

Kim, W.; Choi, K.; Kim, Y.; Park, H.; Choi, J.; Lee, Y.; Oh, H.; Kwon, I.; Lee, S. Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus Sp.* Strain CK 11-4 Screened from Chungkook- Jang. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62 (7), 2482–2488.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. 65(1-2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

Wang, S. L.; Wu, Y. Y.; Liang, T. W. Purification and Biochemical Characterization of a Nattokinase by Conversion of Shrimp Shell with *Bacillus Subtilis* TKU007. **N. Biotechnol.**, 2011, 28 (2), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.09.003>

Rajendran, K.; Sen, S.; Suja, G.; Senthil, S. L.; Kumar, T. V. Evaluation of Cytotoxicity of Hematite Nanoparticles in Bacteria and Human Cell Lines. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, 2017, 157, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.05>

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este estudo demonstra a produção, purificação e caracterização de uma promissora protease fibrinolítica derivada de *Bacillus megaterium* (IPA-CC65). A otimização da produção da enzima em um meio de cultura específico com tempo de fermentação de 72 com atividade de 21,82 U/mL e o uso do sistema de duas fases aquosas (SDFA) com o coeficiente de partição $K > 1$, onde a enzima foi direcionada para a fase rica em PEG, onde resultou em uma enzima pré-purificada com atividade específica e capacidade de degradar fibrinogênio e trombos *in vitro*. A caracterização bioquímica da enzima revelou suas propriedades ótimas de temperatura a 50°C e pH 10, bem como sua sensibilidade a íons metálicos especialmente o manganês e inibida pelo fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), sugerindo que pertence à classe das serino proteases, fornecendo informações avançadas sobre seu mecanismo de ação e potencial aplicação terapêutica.

Os resultados deste estudo representam um avanço significativo na área de pesquisa de agentes trombolíticos, oferecendo uma nova alternativa potencial para o tratamento de doenças cardiovasculares. A protease fibrinolítica de *Bacillus megaterium* (IPA-CC65), pode ser uma ferramenta promissora no desenvolvimento de terapias trombolíticas mais eficazes e seguras. Estudos futuros com modelos animais e ensaios clínicos são necessários para confirmar a eficácia e segurança da enzima em aplicações terapêuticas, abrindo caminho para novas opções de tratamento para pacientes com doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

AIELLO, C.; FERRER, A.; LEDESMA, A. Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulase and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 13-18, 1996.

AL FARRAJ, D. A. *et al.* Enhanced production, purification and biochemical characterization of therapeutic potential fibrinolytic enzyme from a new *Bacillus flexus* from marine environment. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 7, p. 3174-3180, 2020.

AL-DHABI, N. A. *et al.* Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 1258-1264, 2020.

ALENCAR, V. N. *et al.* Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **An Acad. Bras Ciências**, v. 93, 2021.

AL-KOUSSA, H.; ALZAIM, I.; EL-SABBAN, M.E., Pathophysiology of coagulation and emerging roles for extracellular vesicles in coagulation cascades and disorders. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 16, 2022.

AZEVEDO, B. R. M.; PINHEIRO, D. N.; JOAQUIM, M. J. M. Doenças cardiovasculares: fatores de risco e cognição. **Sociedade Brasileira da Psicologia Hospitalar**, v. 20, n. 2, 2017.

CALVILLO, Á. *et al.* Bioprocess strategies for vitamin B12 production by microbial fermentation and its market applications. **Bioengineering**, v. 9, n. 8, 2022.

CHEN, P. *et al.* Exploring fermentation strategies for enhanced lactic acid production with polyvinyl alcohol-immobilized *Lactobacillus plantarum* 23 using microalgae as feedstock. **Bioresource technology**, v. 308, p. 123266, 2020.

COUTO, M. T. T. *et al.* Production, extration and characterization of serine protease with fibrinolytic, fibrinogenolytic and thrombolytic activity obtained by *Paenibacillus graminis*. **Process Biochemistry**, v. 118, p. 335-345, 2022.

DA COSTAA, Antonio Félix *et al.* Grãos, Hortaliças, Raízes e Tubérculos em Conservação pelo Instituto Agrônômico de Pernambuco. **Revista de Recursos Genéticos-RG News**, v. 6, p. 2, 2020.

DAVIE, E. W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 363, p. 1310-1312, 1964.

DE ARAÚJO, D. F. C.; SOBRINHO, F. L. A.. A cultura agrícola da cana-de-açúcar no Brasil: contribuição ao estudo dos territórios rurais e suas contradições e conflitos. **Geopauta**, v. 4, n. 1, p. 162-183, 2020.

DE BARY, A. Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozen und Bakterien. **Wilhelm Engelmann, Leipzig, Germany**, 1884.

DE MELO, L. H. V. *et al.* Diversity and biotechnological potential of endophytic *Bacillus species* originating from the stem apoplast fluid of sugarcane plants. **Applied Soil Ecology**, v. 166, p. 103985, 2021.

DE SIMONE, G.; DI MASI, A.; ASCENZI, P. Serum albumin: a multifaced enzyme. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10086, 2021.

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

ENGLISH, J. D.; VARY, P. S. Isolation of recombination-defective and UV-sensitive mutants of *Bacillus megaterium*. **J Bacteriol.**, v. 165, p. 155-160, 1986.

ERIKSSON, B. I.; QUINLAN, D. J.; WEITZ, J. I. Comparative pharmacodynamics and pharmacokinetics of oral direct thrombin and factor Xa inhibitors in development. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 48, n. 1, p. 1-22, 2009.

ESMON, C. T. The protein C pathway. **Chest**, v. 124, n. 265, 2003.

FERNANDES, L. M. G. *et al.* Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 317, p. 113957, 2020.

FERREIRA, C. N. *et al.* **O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações.** v. 32, n. 5, 2010.

GAO, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel serine protease from *Bacillus cereus* with potential application in leather processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 143, p. 109721, 2021.

GLEESON, E. M.; O'DONNELL, J. S.; PRESTON, R. J. The endothelial cell protein C receptor: cell surface conductor of cytoprotective coagulation factor signaling. **Cell Mol Life Sci.**, 2011.

GOMES, J. A. *et al.* Hospitalizations for pulmonary embolism in Brazil (2008-2019): na ecological and time series study. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 48, 2022.

GULLÓN, P. *et al.* Social inequities in cardiovascular risk factors in women and men by autonomous regions in Spain. **Gaceta sanitaria**, v. 35, p. 326-332, 2022.

HAZARE, C. *et al.* Diverse origins of fibrinolytic enzymes: a comprehensive review. **Heliyon**, v. 10, n. 5, 2024.

HRAFNSDOTTIR, S.; NICHOLS, J. W.; MENON, A. K. Transbilayer movement of fluorescent phospholipids in *Bacillus megaterium* membrane vesicles. **Biochemistry**, v. 36, p. 4969-4978, 1997.

IRIGOÍN, V. *et al.* Venous Thromboembolic Disease in the puerperal gravid period. Diagnosis, treatment and prophylaxis. **Revista Uruguaya de Medicina Interna**, v. 6, n. 2, p. 7-21, 2021.

JAIN, A. *et al.* Heterologous expression of nattokinase in *E. coli*: Biochemical characterization and functional analysis of fibrin binding residues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 757, p. 110026, 2024.

JALALI, Z. *et al.* Smoking, alcohol and opioids effect on coronary microcirculation: an update overview. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 21, p. 1-17, 2021.

JAZBEC, V. *et al.* Protein Gas Vesicles of *Bacillus megaterium* as Enhancers of Ultrasound-Induced Transcriptional Regulation. **ACS Nano**, 2024.

JEFFRIES, L.; BUCKLEY, D. The detection and differentiation of fibrinolytic enzymes in bacteria. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 49, n. 3, p. 479-492, 1980.

JIANG, B. *et al.* Effective separation of prolyl endopeptidase from *Aspergillus Niger* by aqueous two phase system and its characterization and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 384-395, 2021.

JIANG, L. *et al.* Isolation and characterization of a thermostable metalloprotease from *Thermus thermophilus* with high collagenolytic activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, p. 374-383, 2022.

KASHI, M. *et al.* Severe arterial thrombosis associated with Covid-19 infection. **Thrombosis research**, v. 192, p. 75-77, 2020.

KHIALANI, D.; ROSENDAAL, F.; VAN HYLCKAMA VLIEG, A. Hormonal contraceptives and the risk of venous thrombosis. In **Seminars in thrombosis and hemostasis**, Thieme Medical Publishers. v. 46, N. 08, p. 865-871, 2021.

KIETSIRIROJE, N.; ARIËNS, R. A.; AJJAN, R. A. Fibrinolysis in acute and chronic cardiovascular disease. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. **Thieme Medical Publishers, Inc.**, v. 47, n. 05, 2021.

KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p. 284, 2016.

KLOK, F. A. *et al.* Diagnosis of chronic thromboembolic pulmonary hypertension after acute pulmonary embolism. **European Respiratory Journal**, v. 55, n. 6, 2020.

KONSTANTIN, S.; MASSBERG, S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 9, p. 666-682, 2021.

KRISHNAMURTHY, A.; BELUR, P. D. A novel fibrinolytic serine metalloprotease from the marine *Serratia marcescens subsp. sakuensis*: Purification and characterization. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 110-118, 2018.

KRISTOFFERSEN, E. S. et al. Incidence and mortality of cerebral venous thrombosis in a Norwegian population. **Stroke**, v. 51, n. 10, p. 3023-3029, 2020.

KUMAR, S. S.; HARIDAS, M.; SABU, A. Process optimization for production of a fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KU1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 33-39, 2018.

LABXCHANGE. **How to interpret polyacrylamide gels: the basics**. 2021. Disponível em: <www.labxchange.org>. Acesso em: 20 de Jun de 2024.

LEITE, A. H. P. et al. Purification, biochemical characterization and fibrinolytic potential of proteases produced by bacteria of the genus *Bacillus*: a systematic literature review. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, p. 503, 2022.

LESTARI, K.; POERNOMO, A. T.; PRAWITA, A. Media with the Carbon Agro Residues Source Improve Fibrinolytic Enzyme Activity of *Bacillus megaterium* BM 9.1. **Journal of Computational and Theoretical Nanoscience**, v. 18, n. 1-2, p. 49-55, 2021.

LEUNG, L. L. K. Hemostasis and its Regulation. **ACP Medicine**, 2012.

LI, L. et al. The application of fermentation technology in traditional Chinese medicine: A review. **The American journal of Chinese medicine**, v. 48, n. 04, p. 899-921, 2020.

LI, Q. et al. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

LONGSTAFF, C.; KOLEV, K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, p. S98-S105, 2015.

LOPES, W. et al. Optimization of a medium composition for the heterologous production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus megaterium*. **Protein Expression and Purification**, v. 210, p. 106327, 2023.

LU, Y. et al. Genetic liability to depression and risk of coronary artery disease, myocardial infarction, and other cardiovascular outcomes. **Journal of the American Heart Association**, v. 10, n. 1, 2021.

LWOFF, A.; GUTMANN, A. Reserches sur *Bacillus megatherium* lysogene. **Ann Inst Pasteur**, v. 78, p. 711-713, 1950.

MALTA, D. C. *et al.* Mortalidade por Doenças Cardiovasculares Segundo o Sistema de Informação sobre Mortalidade e as Estimativas do Estudo Carga Global de Doenças no Brasil, 2000-2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 2, n. 115, p. 152-160, 2020.

MANOLIS, A. A. *et al.* Low serum albumin: a neglected predictor in patients with cardiovascular disease. **European Journal of Internal Medicine**, v. 102, p. 24-39, 2022.

MASSIMILIANO, C. *et al.* Platelets: the point of interconnection among cancer, inflammation and cardiovascular diseases. **Expert review of hematology**, v. 14, n. 6, p. 537-546, 2021.

MEDCALF, R. L.; KERAGALA, C. B. The fibrinolytic system: mysteries and opportunities. **Hemasphere**, v. 5, n. 6, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Trombose**. 2024. Disponível em: <www.gov.br>. Acesso em: 13 jun. 2024.

MUTCH, N. J.; MEDCALF, R. L. The fibrinolysis Renaissance. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 21, n. 12, p. 3304-3316, 2023.

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

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

OBEAGU, E.; NWOSU, D.; OBEAGU III, G. Antithrombin III: A Review. **International Journal of Current Research in Biology and Medicine**, v. 7, n. 2, p. 20-27, 2022.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Dia Mundial da Hipertensão de 2023. **Doenças cardiovasculares**. 2023. Disponível em: <www.paho.org>. Acesso em: 08 maio 2024.

OSBORNE, M. T., *et al.* Disentangling the links between psychosocial stress and cardiovascular disease. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, v.13, n.8, 2020.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PARIKH, N. I. *et al.* Adverse pregnancy outcomes and cardiovascular disease risk: unique opportunities for cardiovascular disease prevention in women: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, v. 143, n. 18, 2021.

PARK, J. H. *et al.* Sedentary lifestyle: overview of updated evidence of potential health risks. *Korean journal of family medicine*, v. 41, n. 6, p. 365, 2020.

PEREIRA, G. J. M. *et al.* Increased prevalence of deep vein thrombosis and mortality in patients with Covid-19 at a referral center in Brazil. *Phlebology*, v. 37, n. 1, p. 21-25, 2022.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; SAAD, A. Z. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, v. 11, n. 4, 2017.

PINTO, A. F. M. *et al.* Lonofibrase, a novel α -fibrinogenase from *Lonomia obliqua* caterpillars. *Thromb. Res.*, v. 113, p. 147-154, 2004.

PORTO, T. S. *et al.* Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, v. 47, n. 4, p. 716-721, 2008.

RAI, M. *et al.* Contribution of proteases to the hallmarks of aging and to age-related neurodegeneration. *Aging Cell*, v. 21, n. 5, 2022.

RAJ, T. S.; ATHIMOOLAM, S.; VIJAYARAGHAVAN, P. Biosynthesis and characterization of a novel fibrinolytic alkaline serine protease from newly isolated *Bacillus flexus* BF12 for biomedical applications. *Curr. Pharmaceut. Biotechnol.*, v. 22, n. 5, p. 706-717, 2021.

RAMESH, Chatragadda *et al.* Natural substrates and culture conditions to produce pigments from potential microbes in submerged fermentation. *Fermentation*, v. 8, n. 9, p. 460, 2022.

REYNA-VILLASMIL, E.; TORRES-CEPEDA, D.; RONDON-TAPIA, M. Trombosis de la vena ovárica posparto. **Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia**, v. 67, n. 2, 2021.

REZAIE, A. R.; GIRI, H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 12, p. 3142-3153, 2020.

ROSOFF, D. B. *et al.* Evaluating the relationship between alcohol consumption, tobacco use, and cardiovascular disease: A multivariable Mendelian randomization study. **PLoS medicine**, v. 17, n. 12, 2020.

ROSSO, B. U. *et al.* Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 20-25, 2012.

SALEH, A. E. *et al.* Biocontrol activity of *Bacillus megaterium* BM344-1 against toxigenic fungi. **ACS omega**, v. 6, n. 16, p. 10984-10990, 2021.

SANTANA, M. F. *et al.* Hemorrhagic and thrombotic manifestations in the central nervous system in COVID-19: a large observational study in the Brazilian Amazon with a complete autopsy series. **PLoS One**, v. 16, n. 9, 2021.

SHARMA, S. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote fibrous vascular occlusions in chronic thrombosis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 137, n. 8, p. 1104-1116, 2021.

SHEN, P. *et al.* Microbial transformation of glycyrrhetic acid derivatives by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Bacillus megaterium* CGMCC 1.1741. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 115465, 2020.

SHOFIYAH, S. S. *et al.* Isolation, expression, and characterization of raw starch degrading α -amylase from a marine lake *Bacillus megaterium* NL3. **Heliyon**, v. 6, n. 12, 2020.

SILVA, A. V. *et al.* Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101669, 2020.

SILVA, M. M. *et al.* Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 103, p. 282-291, 2019.

SILVA, N.; TANIWAKI, M. H.; SÁ, P. B. Z. Rodrigues de. Fermentação e processos fermentativos. São Paulo: Tiki Books: **The Good Food Institute Brasil**, 2022. (Série Tecnológica das Proteínas Alternativas).

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

SIMÕES, G.; PEREIRA, T.; CASEIRO, A. Matrix metaloproteinases in vascular pathology. **Microvascular Research**, v. 143, p. 104398, 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). **Cardiômetro – Mortes por doenças cardiovasculares no Brasil**. Disponível em: <www.cardiometro.com.br>. Acesso em: 06 de novembro de 2024.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (SBC). **Em 30 anos, taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares cai no Brasil e no RS**. 2023. Disponível em: <www.portal.cardio.br>. Acesso em: 08 de maio 2024.

SOUZA, P. M. *et al.* Purification and characterization of a novel protease from *Aspergillus foetidus* with potential application in the food industry. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125688, 2020.

STALLONE, G. *et al.* Coagulation and fibrinolysis in kidney graft rejection. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1807, 2020.

STASYSHENA, O. *et al.* Assessment of the risk of trombosis in patients with atrial fibrillation and concomitant arterial hypertension after experiencing the coronavirus disease (COVID-19). **Journal of Hypertension**, v. 42, 2024.

TADA, H. *et al.* Human genetics and its impact on cardiovascular disease. **Journal of cardiology**, v. 79, n. 2, p. 233-239, 2022.

TADI, S. R. R. *et al.* Engineering precursor and co-factor supply to enhance D-pantothenic acid production in *Bacillus megaterium*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 5, p. 843-854, 2022.

TAIWO, Abiola Ezekiel *et al.* Techno-economic analysis of cellulase production by *Trichoderma reesei* in submerged fermentation processes using a process simulator. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 42, p. 98-105, 2022.

TAN, J. *et al.* Genetically predicted obesity and risk of deep vein thrombosis. **Thrombosis research**, v. 207, p. 16-24, 2021.

TAVARES, L. S.; ORTIZ, J. V. Desenvolvimento da trombose em pacientes com e sem infecção pelo SARS-Cov-2 - revisão de literatura. Research, **Society and Development**, v. 10, n. 15, 2021.

TOWNSEND, N. *et al.* Epidemiology of cardiovascular disease in Europe. **Nature Reviews Cardiology**, v. 19, n. 2, p. 133-143, 2022.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-799, 2006.

VARY, P. *et al.* *Bacillus megaterium*—from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Appl Microbiol Biotechnology**, v. 76, p. 957-967, 2007.

VEDANA, R. *et al.* Distribuição espacial da produtividade de cana-de-açúcar no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 28, n. 4, p. 121, 2020.

VELLOSO, C. C. V. *et al.* High yield of heat-resistant spores of *Bacillus megaterium* in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 198, p. 109030, 2023.

WANG, J. *et al.* Bacterial diversity and lactic acid bacteria with high alcohol tolerance in the fermented grains of soy sauce aroma type baijiu in North China. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1794, 2022.

WEITZ, J. I.; EIKELBOOM, J. W.; SAMAMA, M. M. New antithrombotic drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v. 141, n. 2_suppl, p. e120S-e151S, 2012.

WILLIAMS, J. C.; MACKMAN, N. Tissue factor in health and disease. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, n. 1, p. 358-372, 2012.

WU, R. et al. Cost-effective fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* WR350 using medium supplemented with corn steep powder and sucrose. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.

ZĄBCZYK, M.; ARIËNS, R. A.; UNDAS, A. Fibrin clot properties in cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical practice. **Cardiovascular research**, v. 119, n. 1, p. 94-111, 2023.

ZHAO, D. Epidemiological features of cardiovascular disease in Asia. **JACC: Asia**, v. 1, n. 1, p. 1-13, 2021.

ZIMMER, K. R. et al. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-138, 2009.