



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

ISABELE ALBUQUERQUE ALCOFORADO FERREIRA

**PRODUÇÃO DE COLAGENASE POR *Rhizopus microsporus* UCP 1296 E SUA
APLICAÇÃO NA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO**

RECIFE- PE

2022

ISABELE ALBUQUERQUE ALCOFORADO FERREIRA

**PRODUÇÃO DE COLAGENASE POR *Rhizopus microsporus* UCP 1296 E SUA
APLICAÇÃO NA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Carolina de A. Wanderley

RECIFE – PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383p

Ferreira, Isabele Albuquerque Alcoforado

Produção de colagenase por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 e sua aplicação na obtenção de peptídeos de colágeno / Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira. - 2022.

124 f. : il.

Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.

Coorientadora: Maria Carolina de Albuquerque Wanderley.

Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2022.

1. *Rhizopus microsporus*. 2. Enzima Colagenolítica. 3. Colágeno. 4. SDFa. 5. Peptídeos de Colágeno. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Wanderley, Maria Carolina de Albuquerque, coorient. III. Título

CDD 636.089

Parecer da comissão examinadora da qualificação, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, de:

ISABELE ALBUQUERQUE ALCOFORADO FERREIRA

PRODUÇÃO DE COLAGENASE POR *Rhizopus microsporus* UCP 1296 E SUA APLICAÇÃO NA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS DE COLÁGENO

Recife, 30 de agosto de 2022

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dra. Keila Moreira (Membro interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dra. Juanize Matias da Silva Batista (Membro interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Membro externo)
Universidade Estadual de Pernambuco (UPE)

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (Membro externo)
Universidade Federal (UFPI)

DEDICATÓRIA

**Dedico esse trabalho aos
meus amores Paulo, Catarina
e Paulinho!**

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso por permitir meus dias nesse plano...

À divina e amada espiritualidade por segurar em minhas mãos em todos os momentos, por iluminar o meu caminho e ser minha força, por me trazer paz e esperança na vida e por sempre me guiar. ASÈ!

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto pela confiança, apoio e orientação. Um ser humano maravilhoso e que ilumina a vida de todos que tem a oportunidade de conhecê-la, além da profissional extraordinária. Minha eterna gratidão.

À minha Coorientadora Dra. Maria Carolina Wanderley pela parceria, por me acompanhar nos experimentos, pela paciência, pelos ensinamentos além da compreensão que teve comigo, desde o a formulação do projeto.

À minha Família Paulo, Catarina e Paulinho por sempre acreditarem no meu potencial, pelos incentivos diários e por compreender minhas ausências. Agradeço principalmente pelas demonstrações de amor diárias e companherismo incondicional que tornaram esse caminhar mais doce e florido. Sem vocês não teria conseguido! Só gratidão a Deus pela família que somos! Amo vocês!

À minha sogra-mãe, D. Rose, por nunca me deixar cair! Sendo minha fortaleza em todas as horas. Agradeço pelo amor e dedicação a nós.

Agradeço a minha família em especial ao meu pai Cleto e a minha mãe Tereza por serem responsáveis desde sempre pela minha educação. Por cuidarem de mim acreditando nos meus sonhos e vibrando a cada conquista. Agradeço a minha irmã Christine e a minha tia Abigail pelos incentivos e por acreditarem em mim. Amo vocês incondicionalmente.

Agradeço a Têê, Lili e Sarinha por trazerem alegria e amor à minha jornada. Sou mais feliz ao lado de vocês.

À minha amiga Marisa Brandão por ter me incentivado tanto para que esse sonho fosse realizado! Obrigada pela amizade e presença na minha vida.

Agradeço também imensamente as minhas amigas Patrícia, Paula, Cibele e Rose pela amizade verdadeira, por serem fortaleza e colo amigo em todas as horas.

Meu muito obrigada a meu amigo Wellington por desde o primeiro dia desse sonho ter caminhado comigo, compartilhando momentos do nosso amado mundo espiritual,

de aprendizado e de amizade sincera. Só tenho a agradecer aos nossos amados Orixás por esse encontro!

Aos amigos verdadeiros que sonharam comigo a realização dessa etapa da minha vida, Edilson e Gardênia.

À minha amada e inesquecível amiga Marly Jarvoski por ter me ensinado tanto nessa vida – principalmente sobre o amor! Por ter sido meu exemplo e inspiração como pesquisadora e como docente. Amo você para sempre. Até breve!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e a Coordenação da Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo incentivo acadêmico.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Laboratório de Imuno Patologia Keizo Asami (LIKA) por permitir os experimentos e disponibilizar o espaço e equipamentos.

Agradeço aos pesquisadores do LIKA em especial a minha amiga Dra. Dannielly Brunaska, Dr. José Luiz de Lima Filho e ao Dr. Roberto.

Agradeço aos pesquisadores do LABTECBIO em especial ao Prof. Dr. Romero Brandão pela paciência e aconselhamentos, ao Dr. Thiago Pajeú pelos valiosos ensinamentos e a Kethylen Bárbara.

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

Enfim, finalizo mais uma etapa da minha vida com o coração cheio de gratidão e aprendizados que colecionei ao longo desses anos. Muito obrigada a todos!

RESUMO

A busca por novas enzimas é um desafio constante, principalmente devido à necessidade de desenvolvimento de condições de produção mais sustentáveis e financeiramente viáveis. Com o avanço da biotecnologia, pesquisas que objetivam a descoberta de enzimas microbianas têm sido desenvolvidas principalmente devido às condições favoráveis de produção em relação aos outros organismos. Enzimas que possuam alta especificidade e que possam ser usadas em pequenas quantidades são extremamente interessantes sob o ponto de vista biotecnológico. Os fungos filamentosos têm se destacado quanto à produção de enzimas de interesse industrial com destaque para as colagenases. Nesse contexto o fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* (UCP1296) isolado do solo da Caatinga, foi selecionado para produção de colagenase. Nesse trabalho o sistema de fermentação submersa (FS) foi escolhido para obtenção do extrato bruto e o sistema duas fases aquosas (SDFA) como estratégia de purificação. Foi utilizado o meio cultura de gelatina para fermentação e com 120h a atividade colagenolítica obtida foi 550 U/mL, biomassa de 0,42 g/L e atividade colagenolítica específica de 808,23 U/mg. Um planejamento fatorial foi aplicado e um aumento de 32% foi registrado na produção enzimática, sendo equivalente a 727,50 U/mL de atividade colagenolítica. A purificação parcial por SDFA foi eficaz sendo os maiores valores de rendimento e coeficiente de partição obtidos com PEG 8000 g/mol a 12,5% (m/m) de concentração, pH= 8 e concentração de fosfato a 10,0% (m/m). Os parâmetros, pH e temperatura ótimas e influência dos inibidores foram determinados para a caracterização da enzima purificada. Neste contexto, o pH e temperatura ótimos foram 8,0 e 37 °C. A enzima apresentou parcial inibição ao ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ao ácido iodo acético (IAA), desta forma, podendo ter porções de metalo e cisteíno proteases. Os resultados sugerem que a enzima produzida apresenta-se como um produto biotecnológico promissor com aplicabilidade em diversas áreas.

Palavras-chave: *Rhizopus microsporus*, Enzima Colagenolítica, Colágeno, SDFA

ABSTRACT

The search for new enzymes is a constant challenge, mainly due to the need to develop more sustainable and financially viable production conditions. With the advance of biotechnology, researches aiming the discovery of microbial enzymes have been developed mainly due to the favorable production conditions in relation to other organisms. Enzymes that have high specificity and can be used in small quantities are extremely interesting from a biotechnological point of view. Filamentous fungi have stood out in the production of enzymes of industrial interest, especially collagenases. In this context, the filamentous fungus *Rhizopus microsporus* (UCP1296) isolated from Caatinga soil was selected for collagenase production. In this work the submerged fermentation system (FS) was chosen to obtain the crude extract and the two aqueous phase system (SDFA) as a purification strategy. The gelatin culture medium was used for fermentation and with 120h the collagenolytic activity obtained was 550 U/mL, biomass of 0.42 g/L and specific collagenolytic activity of 808.23 U/mg. A factorial planning was applied and an increase of 32% was recorded in the enzymatic production, being equivalent to 727.50 U/mL of collagenolytic activity. The partial purification by SDFA was effective with the highest values of yield and partition coefficient obtained with PEG 8000 g/mol at 12.5% (w/w) concentration, pH= 8 and phosphate concentration at 10.0% (w/w). The parameters, optimum pH and temperature and influence of inhibitors were determined for the characterization of the purified enzyme. In this context, the optimum pH and temperature were 8.0 and 37 °C. The enzyme showed partial inhibition to ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iodoacetic acid (IAA), thus, it may have portions of metallo and cysteine proteases. The results suggest that the enzyme produced presents itself as a promising biotechnological product with applicability in several areas.

Keywords: *Rhizopus microsporus*, Collagenolytic Enzyme, Collagen, SDFA

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1.	Representação da atuação de endoproteases e exoproteases	22
Figura 2.	Classificação das proteases	23
Figura 3.	Aplicações das collagenases microbianas em diversos segmentos	27
Figura 4.	Microscopia eletrônica do fungo filamentoso <i>Rhizopus microsporus</i>	32
Figura 5.	Esquema do sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Sal.	36
Figura 6.	Estrutura molecular do colágeno	37
Figura 7.	Peptídeos bioativos de colágeno	43
Figura 8.	Paisagem do Bioma Caatinga.	46

CAPÍTULO I

Figura 1.	Curva de crescimento e biomassa produzida por <i>Rhizopus microsporus</i> UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina	56
Figura 2.	Atividades colagenolítica e específica da collagenase produzida por <i>Rhizopus microsporus</i> UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina	58
Figura 3.	Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações: pH, concentração de substrato, temperatura (° C) e agitação (rpm)	61

CAPÍTULO II

Figura 1.	Gráfico Pareto referente à atividade colagenolítica na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2 ⁴	77
------------------	---	----

- Figura 2.** Gráfico Pareto referente à variável rendimento da purificação na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 79
- Figura 3.** Gráfico Pareto em relação a variável fator de purificação na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 80
- Figura 4.** Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade de protease de *R. microsporus* UCP 1296 em ATPS composto por massa molar de PEG 8000 g/mol, pH 8, concentração de fosfato 10% e concentração de PEG 12,5%. 81

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Espectros de FTIR do colágeno extraído do pé de galinha 114
- Figura 2.** Gráfico da dosagem de Aminoácidos livres frente a diferentes concentrações do colágeno extraído do pé de galinha 116
- Figura 3.** Gráfico da dosagem de Proteínas Totais frente a diferentes concentrações do colágeno extraído do pé de galinha 116
- Figura 4.** Gráfico da dosagem de proteínas totais das 3 frações obtidas após hidrólise 117

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1.** Condições do planejamento fatorial 2^4 – Otimização das condições do cultivo 54
- Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial 2^4 para otimização de parâmetros fermentativos para produção de enzima colagenolítica por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga 59
- Tabela 3.** Interações e efeitos estatisticamente significativos das quatro variáveis estudadas 60

CAPÍTULO II

- Tabela 1.** Combinações de níveis de fatores e resultados do planejamento fatorial 2^4 aplicado para investigar a purificação de enzima colagenolítica de *R. microsporus* por PEG / fosfato – SDFA 72
- Tabela 2.** Planejamento fatorial completo 2^4 usado para investigar a partição e purificação da enzima colagenolítica por SDFA 74
- Tabela 3.** Análises estatísticas referentes à atividade colagenolítica na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 76
- Tabela 4.** Análises estatísticas em relação a variável rendimento da purificação do SDFA na BP 78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
	2.1 GERAL	18
	2.2 ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
	3.1 PROTEASES.....	20
	3.2 CLASSIFICAÇÃO DAS PROTEASES	21
	3.3 FONTES DE PROTEASES	24
	3.4 COLAGENASES	26
	3.5 <i>RHIZOPUS MICROSPORUS</i>	31
	3.6 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES COM PROPRIEDADES COLAGENOLÍTICAS - SISTEMA DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	35
	3.7 COLÁGENO.....	37
	3.8 APLICAÇÕES DO COLÁGENO.....	39
	3.9 PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS DO COLÁGENO	40
	3.10 CAATINGA	44
4	REFERÊNCIAS	48
	CAPÍTULO I.....	65
	Primeiro relato de produção de colagenase por fungo isolado do solo da Caatinga - <i>Rhizopus microsporus</i> UCP 1296	
	CAPÍTULO II	86
	Recuperação, purificação e caracterização parcial de colagenase de <i>Rhizopus microsporus</i> UCP 1296 usando um sistema bifásico aquoso (PEG/Fosfato)	
	CAPÍTULO III	107
	Extração de colágeno proveniente de sub-produtos da indústria avícola e caracterização por espectroscopia ft-ir para obtenção de peptídeos bioativos	
5	CONCLUSÃO	121
6	APÊNDICE - A	124
	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	124
7	APÊNDICE - B	126
	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS	126

1 INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas altamente complexas que diferem entre si na especificidade do substrato, mecanismo catalítico e sítio ativo (SUMANTHA *et al.*, 2006). As proteases possuem uma série de funções e várias aplicações biotecnológicas importantes (LIMA *et al.*, 2009) e por estarem presentes em vários eventos biológicos, as proteases podem ser encontradas em inúmeros organismos (KERMASHA & ESKIN, 2021). Segundo Oliveira *et al.*, (2017) o colágeno é a mais abundante proteína de mamíferos, representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados, até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos sendo formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias.

Proteases que possuem capacidade de degradar o colágeno são conhecidas como colagenases. Enzimas com essa capacidade são difíceis de encontrar devido às características estruturais do colágeno que o tornam resistente à maioria das proteases comuns (WANDERLEY *et al.*, 2017). Proteases colagenolíticas apresentam a capacidade de hidrolisar tanto colágeno nativo quanto desnaturado, e estão tornando-se cada vez mais importantes comercialmente (LIMA *et al.*, 2009).

A clivagem do colágeno por colagenases leva a formação de peptídeos. “Peptídeos de colágeno” é o termo que designa os fragmentos formados a partir da hidrólise do colágeno (Lima *et al.*, 2013). Colagenases podem ser oriundas de diversas fontes, sejam elas animais, vegetais ou microbianas (RAO *et al.*, 1998).

Os fungos apresentam vantagens na produção dessa enzima, pois a mesma ocorre extracelularmente, o que torna particularmente mais fácil a sua recuperação após o processo da fermentação (SANDHYA *et al.*, 2005). Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias-primas pouco dispendiosas (ZIMMER *et al.*, 2009). A busca por novas colagenases microbianas assim como metodologias economicamente mais viáveis de produção vêm aumentando ao longo dos anos, alguns autores

relatam que essa perspectiva representa, atualmente, uma das maiores dentro da indústria de enzimas (ABIDI *et al.*, 2013; GRAMINHO *et al.*, 2013). Sendo necessário o desenvolvimento e investimento em estudos que comprovem a aplicação de novas colagenases produzidas por microrganismos, uma vez que possuem vasto espectro de aplicação com alto potencial biotecnológico e valor comercial agregados, e poucos trabalhos publicados relatam a produção da colagenase por fungos (WANDERLEY *et al.*, 2016).

A biotecnologia utiliza agentes biológicos para obter bens ou assegurar serviços por manipulação de microrganismos, plantas e animais para obtenção de processos e produtos de interesse como também melhorar a qualidade e minimizar os custos para obtenção de fontes alternativas de enzimas com propriedades colagenolíticas. Portanto, as enzimas colagenolíticas – que apresentam elevada atividade, especificidade e são estáveis, são as preferidas para a produção desses peptídeos visando aplicações industriais, com destaque para as áreas alimentícia e biomédica (TERUEL e SIMPSON, 1995; UESUGI *et al.*, 2008; WATANABE, 2004; HAZAN *et al.*, 2006).

O desenvolvimento industrial e tecnológico do país traz consigo um aumento de resíduos. O reaproveitamento tem sido incentivado, estando presente em várias políticas públicas. Produtos de inovação tecnológica são desejados à medida que possam contribuir para a redução e/ou reutilização de despejos, tornando o processo uma atividade eco sustentável, e que viabilize a diminuição de custos, como forma de agregar valor e alicerçar a produtividade. Resíduos sólidos agroindustriais representam fonte rica e potencial de biomoléculas proteicas ativas, as quais podem ser aplicadas em diversos processos (BEZERRA *et al.*, 2006; KIM e MENDS, 2006), tais como na extração de colágeno (MUYONGA *et al.*, 2004; VIDOTTI e GONÇALVES, 2006), produção de óleo para a indústria farmacêutica e alimentícia humana (FELTES *et al.*, 2010; LIMA, 2013), no processamento da carne, na produção de silagem (GODDARD e PERRET, 2005; FELTES *et al.*, 2010; GOOSEN *et al.*, 2014) e na produção de hidrolisado proteico (BEZERRA *et al.*, 2006).

Portanto, o presente trabalho teve como proposta produzir colagenase a partir do fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga, estudar os parâmetros fermentativos para favorecer a produção enzimática através do planejamento estatístico, purificar e caracterizar a

enzima. Além de aplicar a colagenase na produção de peptídeos bioativos a partir do colágeno obtido de resíduos agroindustriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver processos biotecnológicos para produzir e purificar colagenase do *Rhizopus microsporus* UCP 1296, avaliar os parâmetros relevantes para a otimização da produção através do planejamento fatorial.

2.2 Específicos

- ✓ Selecionar parâmetros fermentativos para a produção de colagenase pelo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga pelo planejamento fatorial completo 2^4 , avaliando a influência das variáveis: temperatura, pH inicial do meio de cultura, velocidade de agitação orbital e concentração do substrato;
- ✓ Analisar a influência das variáveis: massa molar do Polietilenoglicol (PEG), Concentração do PEG, concentração de fosfato e pH sobre a extração da colagenase através do SDFA, utilizando um planejamento fatorial completo 2^4 ;
- ✓ Estabelecer as melhores condições de purificação da colagenase utilizando o SDFA, após análise dos resultados do planejamento fatorial;
- ✓ Analisar as variáveis de resposta: coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y) e fator de purificação (FP) através do resultado do planejamento fatorial do Sistema Duas Fases Aquosas;
- ✓ Caracterizar parcialmente a colagenase quanto aos aspectos físico-químicos, tais como: temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade ao pH e a temperatura e ação dos inibidores;
- ✓ Isolar colágeno a partir dos resíduos agroindustriais e caracterizá-lo;

- ✓ Produzir peptídeos bioativos de colágeno a partir do colágeno isolado das fontes residuais, empregando collagenase produzida, avaliando as atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e anti-proliferativa dos peptídeos obtidos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Proteases

As proteases (peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteinases) são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas em proteínas e em seus fragmentos, a clivagem das ligações peptídicas leva à degradação dos substratos proteicos em seus aminoácidos constituintes, ou pode ser específica, levando à clivagem seletiva de proteínas para modificação e processamento pós-tradução. Essas enzimas são onipresentes na natureza e foram encontradas em todas as formas vivas, abrangendo os eucariotos, como plantas, animais, fungos, protistas, bem como os domínios procarióticos de bactérias. Até mesmo alguns vírus podem codificar suas próprias proteases.

Proteases participam de vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Muitos microrganismos secretam peptidases para o meio externo com o fim de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio no metabolismo celular (VERMELHO *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2015; Bernardo *et al.*, 2018).

Segundo Razzaq *et al.*, (2019), proteases controlam a ativação, síntese e renovação de proteínas para regular os processos fisiológicos, por isso são vitais na disseminação de doenças infecciosas e, devido ao seu papel significativo no ciclo de vida, são essenciais para a descoberta de medicamentos.

Por conta das características estruturais e funcionais, as proteases são capazes de realizar funções que podem variar entre a reciclagem de uma proteína intracelular para a digestão de um nutriente e a amplificação do sistema de cascata da resposta imunológica. A diversificação dos papéis biológicos é decorrente da evolução das inúmeras estruturas protéicas, que convergiram para locais ativos semelhantes e conseguem reconhecer substratos variados (Li *et al.*, 2013).

As proteases estão envolvidas em vários aspectos fisiológicos e no desenvolvimento dos seres vivos, tais como degradação de proteínas defeituosas, iniciação da morte celular, modificação pós-traducional de

proteínas, processo inflamatório e coagulação do sangue (SOUZA *et al.*, 2015). As proteases não apenas desempenham um papel importante no funcionamento normal do corpo e na manutenção da homeostase, mas também desempenham um papel significativo em infecções, imunidade, inflamação e desenvolvimento de doenças como o câncer, onde atividades relacionadas a proteases modificadas foram identificadas como estimulantes de processos como crescimento descontrolado, angiogênese, metástase, evasão imunológica como também atividades cruciais na supressão do tumor (PATEL *et al.*, 2018; DUDANI *et al.*, 2018).

O desenvolvimento de novos métodos adequados para a produção em larga escala de peptídeos biologicamente ativos tem sido buscado ativamente na última década devido à sua natureza bioativa, bem como ao melhor entendimento de suas funções e propriedades biológicas (KUMAR & BHALLA, 2005).

Biologicamente, as proteases podem ser inseridas em diversas aplicações, o que tem estimulado a procura por novas fontes. Essas enzimas correspondem em média a 60% do total de enzimas utilizadas nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia (KUMAR & BHALLA, 2005; SILVA *et al.*, 2009). A relevância desse grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismos de ação reflete-se na importância de suas aplicações nos processos industriais, como nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica, de couro e de detergentes (ZANPHORLIN *et al.*, 2011). A ampla utilidade comercial e industrial das enzimas, em especial as proteases, torna necessária a otimização da sua produção e condições de armazenagem para garantir a estabilidade da atividade enzimática (GIONGO, 2006).

3.2 Classificação das Proteases

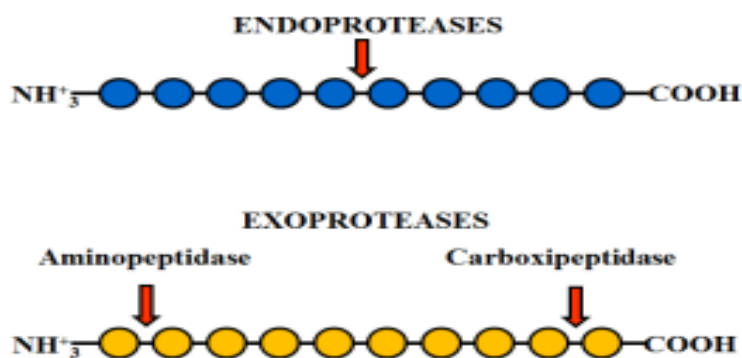
Enzimas são moléculas de caráter proteico, classificadas como biocatalisadoras com capacidade de acelerar e/ou retardar reações químicas específicas como também diminuir a energia de ativação para formação de um novo produto. A ação enzimática permite uma boa digestibilidade de diversos nutrientes, favorecendo assim o aproveitamento de substâncias como: fósforo, cálcio e aminoácidos, resultando numa melhor eficiência produtiva. Essas

reações que catalisam as enzimas podem ser divididas em seis classes distintas: oxidoredutases, transferases, hidrolases, lipases, isomerases e ligases (CAMPOS *et al.*, 2017).

Segundo Vermelho *et al.*, (2008), as proteases são classificadas de acordo com três critérios: tipo de reação catalisada; natureza química do sítio catalítico e, relação evolucionária em conformidade com a estrutura. De acordo com o Comitê Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) de classificação de enzimas, *Enzyme Commission* (EC), as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 4 com cada enzima proteolítica atribuída um número exclusivo como EC 3.4.xx (CONTESINI *et al.*, 2017), que ainda está dividida em dois grandes grupos: as exo e as endopeptidases (

Figura 2- Classificação das proteases). As exopeptidases clivam ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal das cadeias polipeptídicas e podem ser denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas, e as proximidades dos grupos N ou C terminais (NAVEED *et al.*, 2021).

Figura 1 - Representação da atuação de endopeptidases e exopeptidases

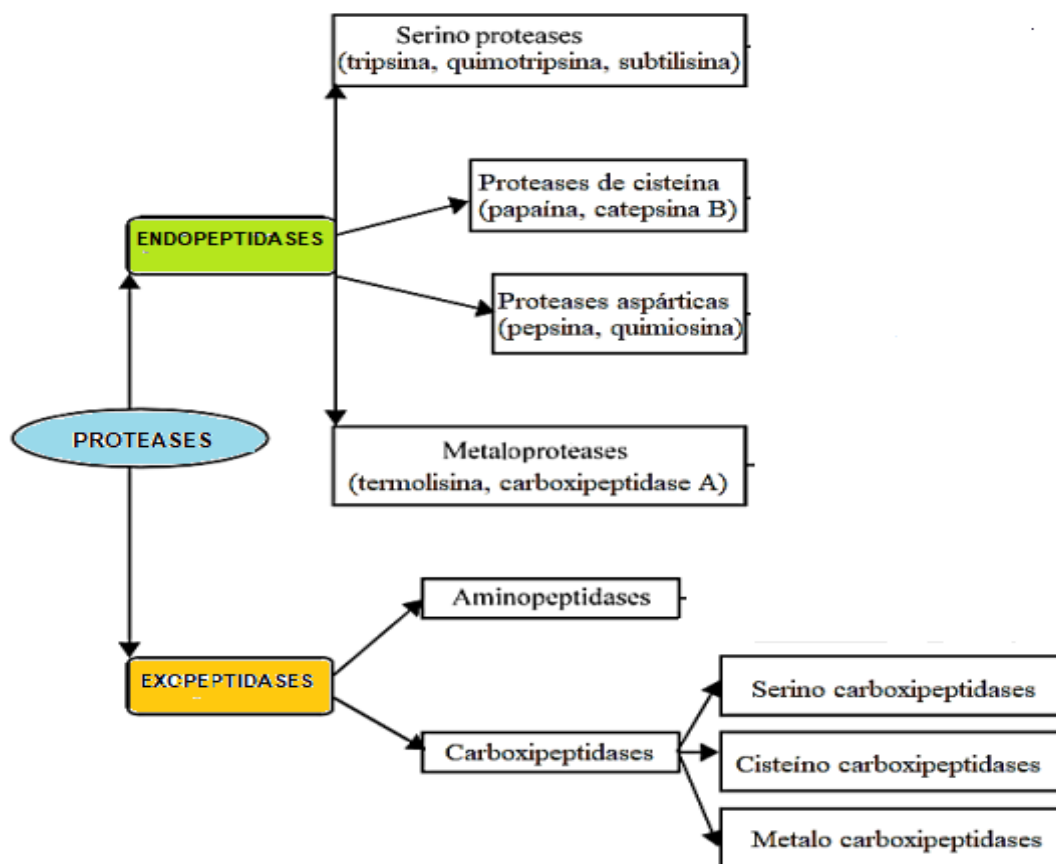


Fonte: Adaptado de Barrett, 1994.

As enzimas proteolíticas ainda podem ser identificadas conforme a massa molecular e propriedades elétricas (THYS, 2004). As proteases (EC 3.4) que pertencem à subclasse 3.4.21 (serinoproteases) possuem um resíduo de Ser no seu sítio ativo que é responsável pelo ataque nucleofílico das ligações peptídicas, são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima

do pH 7.0 a 11.0, enquanto nas que pertencem à 3.4.22 (cisteíno proteases) esse resíduo é Cys. As proteases que pertencem à 3.4.23 (asparticoproteases) dependem de um resíduo de Asp no seu sítio catalítico. Finalmente, as que pertencem à subclasse 3.4.24 (metaloproteases) dependem de um íon metálico (geralmente Zn^{2+}) para exercerem sua função catalítica (ANTÃO, 2005). Levando em consideração as substâncias presentes em seu sítio ativo (local onde ocorre a reação enzimática), o MEROPS um banco de dados exclusivo de proteases classifica as proteases entre as famílias: aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e desconhecido (U) (MEROPS, 2019; CONTESINI *et al.*, 2017) (Figura 2).

Figura 2- Classificação das proteases



Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.*, 2008.

MEROPS é um banco de dados que fornece informações detalhadas e atualizadas sobre os diferentes tipos de proteases (<https://www.ebi.ac.uk/merops/>). As enzimas são categorizadas principalmente

com base em suas relações filogenéticas e mecanismo de ação neste banco de dados (RAWLINGS *et al.*, 2018).

Essa variação de especificidade das proteases se deve ao fato de que os sítios ativos das mesmas contêm um arranjo característico de resíduos de aminoácidos que definem a interação enzima/substrato. Outra relevante classificação das proteases é em relação ao pH, o intervalo de pH classifica as proteases de acordo com o intervalo no qual tem atividade mais elevada. São chamadas de ácidas as proteases com maior atividade em pH 2.0 a 6.0 e incluem, principalmente, as aspárticos-proteases, proteases neutras em pH 6.0 a 8.0, sendo representadas, principalmente, pelas cisteíno-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases e proteases alcalinas apresentam alta atividade em pH 8.0 a 13.0 e são demonstradas pelas serino-proteases (RAO *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2015).

O conhecimento dessas especificidades fornece informações que podem auxiliar na escolha de qual protease será utilizada para a quebra de determinado substrato ou determinar quais os produtos que serão liberados a partir da hidrólise, pois uma mesma fonte de proteína pode produzir diferentes hidrolisados usando-se proteases diferentes (TAVANO, 2013).

3.3 Fontes de Proteases

O interesse e estudo de proteases são de fundamental importância, tanto pelas suas inúmeras aplicabilidades no mercado e movimentação econômica quanto pela sua relevância fisiológica (ROJAS *et al.*, 2009).

A enorme diversidade de proteases, somada à especificidade de suas ações, atraiu a atenção mundial em tentativas de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (POLDERMANS, 1990; FOX *et al.*, 1991). Proteases de interesse comercial podem ser obtidas de diversas fontes biológicas como animais, vegetais e microrganismos, onde proteases extraídas de fungos possuem vantagens em termos de produção, associadas ao cultivo contínuo e rápida taxa de crescimento e fácil disponibilidade desses microrganismos, o que industrialmente interessante (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 2016).

A capacidade de produção de proteases por vegetais e animais, não é capaz de suportar a demanda industrial, papaína e bromelina são exemplos de proteases originadas de plantas. Entretanto, a produção a partir de plantas é um processo que demanda bastante tempo, além de vários fatores estarem envolvidos, como espaço de terra para cultivo e condições climáticas favoráveis ao crescimento. Já as proteases mais comuns obtidas de animais são: tripsina, quimiotripsina, pepsina e reninas. Contudo, esta produção depende da disponibilidade de animais, que por sua vez é governada por políticas públicas e agrícolas, por isso, nos últimos anos, houve um aumento de interesse sobre a produção de proteases a partir de microrganismos, como fonte alternativa. A protease microbiana tem como vantagem uma diversidade bioquímica e susceptibilidade para manipulação genética (RAO *et al.*, 1998; PANDEY *et al.*, 2006; CHANALIA *et al.*, 2011 JISHA *et al.*, 2013;).

Biologicamente, as proteases microbianas possuem características mais desejadas em relação às outras fontes. Apresentam maior estabilidade e sua produção é mais fácil e segura, além de serem economicamente mais viáveis, com menor custo para a indústria. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias-primas pouco dispendiosas (ZIMMER *et al.*, 2009). Dessa maneira, essas proteases são preferidas às enzimas de origem vegetal e animal (WISEMAN, 1985; RAO *et al.*, 1998).

Proteases oriundas de microrganismos são produzidas por manipulação de condições ambientais devidamente controladas e influenciada por componentes, especialmente de carbono e nitrogênio, fatores físicos como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e densidade do inóculo (QURESHI *et al.*, 2011).

As proteases microbianas constituem um grupo muito grande e complexo de enzimas com propriedades diferentes de especificidade de substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, atividade de temperatura e perfis de estabilidade. Essa grande diversidade de proteases, em contraste com a especificidade da sua ação, tem atraído a atenção no mundo inteiro para exploração de suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO *et al.*, 1998). Dentre os microrganismos produtores de proteases destacam-se os fungos filamentosos por serem capazes de crescer em substratos de baixo

custo e de fácil remoção celular quando comparado com bactérias, por exemplo, o que torna o processo mais econômico (SOUZA *et al.*, 2015).

3.4 Colagenases

A utilização de enzimas nos diversos setores industriais é cada vez maior. Essa extensa utilização ocorre devido a fatores como elevada especificidade de sua ação como biocatalizadores, porém as enzimas com o mesmo perfil de atuação sob o mesmo substrato, podem apresentar um bom funcionamento no pH, na temperatura e em diferentes concentrações iônicas (FRANÇA, 2021).

Colagenases são proteases responsáveis pela manutenção de tecidos e órgãos, atuando especificamente na clivagem de colágeno nativo ou desnaturado (OLIVEIRA, 2017). A colagenase foi identificada pela primeira vez em 1962 e são as enzimas amplamente estudadas por serem capazes de degradar as quatro variedades de colágeno (I, II, III e IV) (ALIPOUR *et al.*, 2016).

A proteólise do colágeno é essencial para inúmeras funções fisiológicas, incluindo remodelação de tecidos, morfogênese e cicatrização de feridas (PAL & SURESH, 2016).

Segundo Zimmer *et al.*, (2009), colagenases ou proteases colagenolíticas são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas de diversos tipos de colágeno, que é a proteína mais abundante nos mamíferos. As colagenases podem ser classificadas em metaloproteinases de matriz (MMPs) e serino proteases. As metaloproteinases são endopeptidases dependentes da ligação com zinco para apresentarem suas atividades catalíticas.

Aproximadamente 200 tipos de enzimas microbianas são utilizadas comercialmente nas mais diversas aplicações. No entanto, apenas cerca de 20 enzimas são produzidas em uma escala industrial (LIU & KOKARE, 2017). De acordo com Oliveira *et al.*, (2017), colagenases de origem animal clivam o colágeno em sítios específicos, podem ser extraídas a partir de vários vertebrados, com destaque às vísceras de peixes. Para Velloorvalappil *et al.*, (2013), em vegetais a papaína é extraída do látex de *Carica papaya*, e a bromelina é extraída da haste e do suco de abacaxi.

Uma característica importante é que colagenases microbianas são capazes de clivar múltiplos sítios ao longo da hélice do colágeno diferentemente de colagenases produzidas por outros organismos como mamíferos, por exemplo, que clivam a hélice do colágeno em um único ponto e por este motivo vem sendo largamente aplicadas na obtenção de peptídeos bioativos do colágeno (VILLEGAS *et al.*, 2018). Como as proteases fúngicas são capazes de hidrolisar muitas outras proteínas além do próprio colágeno, a demanda de pesquisas por colagenases provenientes desses microrganismos tem se mostrado um ramo de alto interesse com alta aplicação e potencial biotecnológico (SHARKOVA *et al.*, 2015). Razzaq e colaboradores (2019) destacam espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus* entre outros, e espécies de *Cephalosporium* e *Chrysosporium* são conhecidas como fontes de proteases fúngica. Wanderley *et al.*, (2016) relatam a produção de colagenase por fungos entre os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* e *Alternaria*. Pereira e colaboradores (2020) identificaram o fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* como produtor de uma protease aspártica com atividade colagenolítica e Calim *et al.*, (2019) relataram que o fungo *Fusarium* sp. também produziu queratinase, possuindo atividade colagenolítica.

As aplicações das colagenases microbianas são amplas e incluem áreas como as indústrias de alimentos, curtumes, carnes, cosméticos e produção de compostos farmacêuticos (PAL & SURESH, 2016) (Figura 3). Existe um interesse gradativo em encontrar novas linhagens microbianas capazes de produzir colagenases com novas propriedades para formulações de novos medicamentos para a indústria farmacêutica (BLIEVA *et al.*, 2018). Conforme Wanderley e colaboradores (2016), com os avanços das pesquisas médicas, aumentaram o interesse em pesquisas por novas fontes de colagenases ao longo dos anos. Muitos microrganismos ainda não foram estudados e utilizados como potenciais produtores de colagenase.

Recentemente um artigo de revisão encontrou vinte e um trabalhos relacionados à produção de colagenases por fungos, destes quatro artigos foram publicados nos últimos cinco anos e apenas dois desses estudos relataram enzimas com alta especificidade ao colágeno. Entre os microrganismos estudados, *Penicillium aurantiogriseum* (231 U/mL) e

Rhizoctonia solani (212,3 U/mL) destacaram-se na atividade da colagenase produzindo enzima de forma extracelular em quantidades elevadas. O estudo enfatiza uma lacuna na literatura pela falta de pesquisa sobre a produção de colagenase por fungos e sua caracterização, o que impede um maior desenvolvimento na área e aumenta a necessidade de mais estudos (WANDERLEY *et al.*, 2017). A humanidade conseguiu explorar apenas uma pequena parcela da população microbiana disponível para o seu próprio benefício (SINGH *et al.*, 2018).

Fungos filamentosos são mais estudados quando comparados aos outros tipos de fungos em relação à produção de colagenase, porém ainda existem muitas espécies com propriedades desconhecidas. O *Rhizopus microsporus* UCP 1296, por exemplo, nunca foi relatado na literatura científica com potencial produtor de colagenase.

Figura 3. Aplicações das colagenases microbianas em diversos segmentos



Fonte: Kumar *et al.*, (2014) adaptado

Os fungos apresentam grande diversidade de espécies e possuem características em comum que os distinguem dos demais reinos suscitando problemas de importância diversa em variados setores das atividades humanas, por isso a Micologia desdobrou-se em múltiplas especialidades com reflexos em vários ramos da biotecnologia, envolvendo produtos químicos e farmacêuticos, comestíveis, laticínios, bebidas alcoólicas de todos os tipos, devido, em grande parte, às propriedades fermentativas e enzimáticas (OLIVEIRA, 2014).

A descoberta de novos metabólitos ativos de origem microbiana é um desafio que pode trazer inúmeros benefícios. Os fungos são essenciais para a saúde e desenvolvimento em equilíbrio de muitos ecossistemas, sendo essenciais para a sustentabilidade e biodiversidade. Nessa perspectiva se faz necessário destacar a importância da biotecnologia para a obtenção de substâncias por meio da manipulação de fungos a fim de descobrir novas tecnologias para benefícios da saúde humana e equilíbrio ambiental (ABREU; RODOVIDA; PAMPHILE, 2015).

Os microrganismos representam os principais motores de ciclagem elementar no planeta e, portanto, têm um profundo impacto em substratos orgânicos e minerais (JUNIER & JOSEPH, 2017). Os microrganismos ainda são considerados ótimos agentes produtores de enzimas e metabólitos secundários e a seleção correta desses agentes produtores é um fator chave para sua produção em larga escala (GAUTAM & AZMI, 2017). Segundo ainda Abreu, Rodovida e Pamphile (2015), a partir do metabolismo fúngico, pode-se dispor de diversos compostos naturais apresentando atividades biológicas. O metabolismo dos fungos pode ser dividido em metabólitos primários que são pequenas moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo e são usados em indústrias alimentícias e de ração, e metabólitos secundários que são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária. Estes são frequentemente bioativos e apresentam grande importância à humanidade. Dentre todos os metabólitos que podem ser sintetizados pelos fungos, destacamos a produção de enzimas colagenolíticas. A obtenção de enzimas, proveniente de microrganismos, pode ser por meio de dois processos fermentativos. O primeiro tem a presença de água livre, e é denominado de fermentação submersa (FS), e o segundo é a fermentação em estado sólido

(FES) é definida como o crescimento de microrganismos em substratos sólidos, na ausência de água livre (ZUNIGA, *et al.*, 2011).

Aproximadamente cerca de 90% dos processos fermentativos industriais são comumente concretizados por processos de fermentação submersa, produzindo em larga escala onde os fungos são crescidos num sistema líquido. Deste modo, pode-se controlar fatores como pH, temperatura e aeração, além de recuperar facilmente a enzima produzida extracelularmente (RODRIGUES; AMARAL *et al.*, 2017). A Fermentação submersa é caracterizada como um processo fermentativo que ocorre na presença de grande volume de água, onde os nutrientes disponíveis apresentam-se dissolvidos no meio de produção (SINGHANIA *et al.*, 2010). Os nutrientes neste tipo de bioprocessos como peptonas, açúcares e substâncias complexas (vitaminas e íons) são dissolvidos em água ou em soluções tampões. Essas fermentações devem ser mantidas em agitação constante para ideal aeração e disponibilidade de nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A fermentação submersa (FS) conta com equipamentos bem estruturados para sua realização além da vasta gama de pesquisa para o seu controle, a facilidade de controlar os parâmetros físico-químicos (pH, temperatura, porcentagem de oxigênio dissolvido no meio, concentração do produto e substrato) é o que tem levado a FS a se destacar em relação à produção em larga escala. Além disso, a FS possui melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas de baixa termoestabilidade (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

Bazarzhapov *et al.*, (2006) alertam que fatores como temperatura, fonte de carbono e nitrogênio são essenciais para um melhor desenvolvimento de proteases a partir de fungos filamentosos, uma vez que muitas proteases só são produzidas com esses fatores presentes em meio de cultura. Fungos filamentosos podem se desenvolver em meio de cultura de baixo custo e mesmo assim produzir grandes quantidades de enzimas proteolíticas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Pode-se destacar também que amostras da FS são utilizadas para determinação das células viáveis e totais, e o sobrenadante é utilizado para a identificação da atividade enzimática. A determinação de biomassa e

consequente cinética de crescimento do microorganismo também é facilitada. Entretanto há uma maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e consequente possibilidade de desenvolvimento de microorganismos indesejáveis como bactérias e leveduras (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Os fungos filamentosos se destacam na produção de enzimas por fermentação submersa, devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação, facilitando desta forma também processos de purificação diminuindo as etapas no processo de obtenção dessas biomoléculas. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (NASCIMENTO *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2020). Muitos estudos da produção de protease por fungos filamentosos tem obtido sucesso com o uso de resíduos agroindustriais (SOUZA *et al.*, 2015).

Pernambuco é um dos maiores produtores de aves e um dos mais expressivos no consumo da Região Nordeste. Concomitante a produção está a geração de resíduos, muitas vezes rejeitados inadequadamente e acarretando agravos ambiental. O reaproveitamento desses resíduos tem sido motivo de preocupação constante e está presente em várias políticas públicas, além de ser de interesse eminente do empresariado localizado nas mesorregiões do estado.

Produtos de inovação tecnológica são desejados à medida que possam contribuir para a redução e/ou reutilização desses despejos, tornando o processo uma atividade eco-sustentável, e que viabilize a diminuição de custos, como forma de agregar valor e alicerçar a produtividade.

3.5 *Rhizopus microsporus*

Pesquisas relacionadas à descoberta e propriedades de enzimas de interesse industrial têm avançado constantemente, acerca de microorganismos não patogênicos, visto que eles são capazes de produzir diversos tipos de enzimas, como por exemplo, os fungos que são organismos unicelulares ou pluricelulares, eucariontes, heterotróficos, obtendo sua alimentação a partir de

matéria orgânica inanimada ou nutrindo – se como parasitas de hospedeiros vivos como em relação ao tamanho serem microscópicos ou macroscópicos. Podem se reproduzir de forma sexuada com gametas femininos e masculinos, ou por meio de esporos, flagelos ou não, sendo esses de forma assexuada.

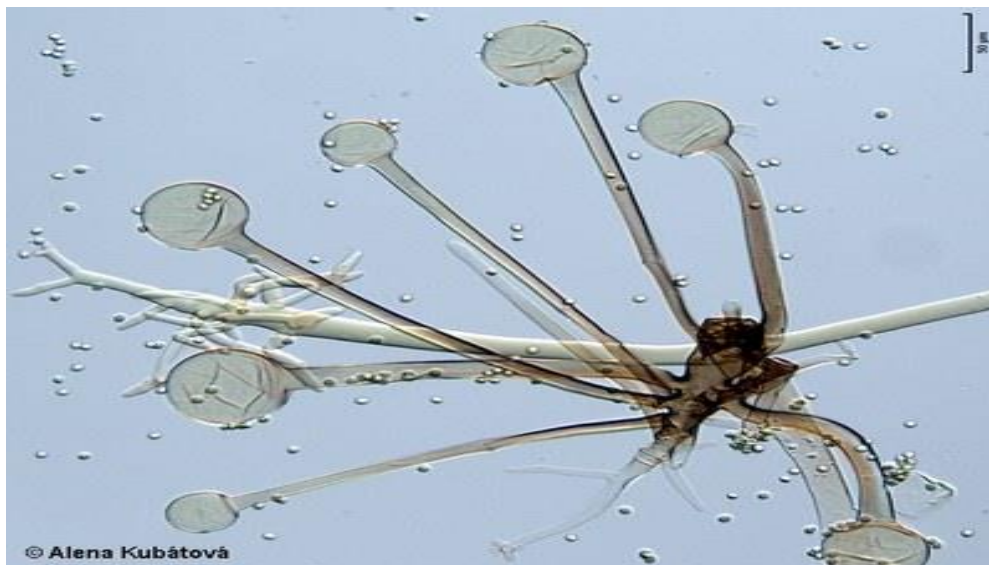
Os fungos podem ainda classificarem-se em bolores (ou mofos), leveduras e cogumelos. Os bolores são filamentosos e pluricelulares e as leveduras se apresentam sob a forma unicelular. Estes microrganismos influenciam a vida do homem participando de processos desejáveis ou prejudiciais (TORTORA *et al.*, 2017).

Segundo Oliveira (2010), cerca de setenta mil espécies de fungos já foram descritas, estando dentre elas as causadoras de micoses em humanos, de doenças em plantas cultivadas e as de importância biotecnológica. Os fungos filamentosos são microrganismos que se destacam devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação. Adicionalmente, apresentam elevados níveis de produção enzimática, com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

As enzimas produzidas pelos fungos possuem vantagens para a produção em larga escala, via fermentação, com potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais e de interesse industrial (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Entre os fungos filamentosos empregados na produção de enzimas estão os representantes do gênero *Rhizopus*. As espécies desse gênero são encontradas nos mais variados ambientes, como florestas, solos, frutas e vegetais deteriorados (ALEXOPOULOS, 1996).

Figura 4– Microscopia eletrônica do fungo filamentosso *Rhizopus microsporus*



Fonte: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/veda-a-vyzkum/atlas-gomycetu/seznam/rhizopus-microsporus-tiegh.-var/view>. Acesso em: 20 de Dezembro, 2021

Fungos filamentosos morfologicamente são identificados como, não septados, com micélios cotonosos formando esporângióforos nos nódulos, onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são, usualmente, grandes e negros e suas columelas são esféricas. A base dos esporângios tem a forma de taça. A reprodução sexuada requer dois talos de tipos diferentes que são designados com os sinais positivo (+) e negativo (-), substituindo os adjetivos macho e fêmea (CHEN *et al.*, 2009).

O gênero *Rhizopus* compreende várias espécies, entre elas: *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus azygosporus*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus schipperae* e *Rhizopus stolonifer* em que apresentam algumas características morfológicas, como o comprimento dos rizóides e esporangioforos, o diâmetro dos esporângios, a forma da columela, o tamanho, a forma e a textura dos esporangiosporos que auxiliam na diferenciação das espécies do gênero (ALEXOPOULOS, 1996).

Rhizopus microsporus é um fungo de solo amplamente distribuído que pode causar mucormicose ou zigomicose em humanos imunocomprometidos e determinadas espécies são consideradas fitopatogênicas. É um dos poucos fungos que abrigam endossimbiontes bacterianas, possui quitina em sua

parede celular e apresenta amplo crescimento quando em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (TRUFEM, 2000; PELE *et al.*, 2018).

O *Rhizopus microsporus* é um fungo que pertence ao filo *Glomeromycota* que atualmente substitui o filo *Zygomycota*, à ordem *Mucorales*, família *Mucoraceae*, gênero, *Rhizopus* e espécie *microsporus*. Os *Mucorales* fazem parte de um grupo de fungos filamentosos que, apresentam parede celular constituída por quitina e quitosana, e micélio geralmente cenocítico, com septos apenas na delimitação dos órgãos de reprodução (PELE *et al.*, 2018).

A ordem *Mucorales* possui aproximadamente trezentas espécies, são fungos que colonizam rapidamente um substrato, crescem de forma exuberante, com micélio denso e conspícuo, podem atingir até três centímetros de altura (FAI *et al.*, 2011). A família *Mucoraceae* é a mais numerosa das famílias da ordem *Mucorales*, estando representada por vinte gêneros e cerca de cento e trinta espécies, que são caracterizadas pela formação de esporângios multi esporulados, com columela bem desenvolvida, podendo apresentar espinhos e outros tipos de projeções. Os representantes mais comuns pertencem aos gêneros *Rhizopus*, *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Zygorhynchus* (PELE *et al.*, 2018).

Segundo Domsch *et al.*, (2007) e Lima *et al.*, (2016) a grande maioria dos táxons de mucorales degradam apenas fontes de carbonos de moléculas simples, como glicose, e a minoria são capazes de gradar substratos mais complexos como hemiceluloses, lipídeos e proteínas. Espécies desse grupo são caracterizadas como potencialmente ricas em biomassa em quantidades significativas de proteínas, lipídeos, aminoácidos, quitosana e quitina. Outra característica importante é a tolerância térmica que apresentam e à produção de enzimas como amilases e proteases, desta forma, são considerados como promissores nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de biocombustíveis (LIMA *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2013). Além de apresentarem grande importância ecológica, pois são decompositores de matéria orgânica no solo e outros substratos, que contribui para o ciclo de nutrientes e conservação de diversos ecossistemas (LIMA *et al.*, 2018).

Dolatabadi *et al.*, (2013) descreveram que o *R. microsporus* possui colônias inicialmente brancas que vão escurecendo tornando-se cinza escuro,

com reverso creme. Não exalam odor, exibem esporangióforos com cerca de 600 µm de comprimento, lisos e com coloração marrom claro, crescendo em estolões sempre em oposição aos rizóides, solitários ou em grupos de 2 a 3, nunca septados. Possuem ainda rizóides simples pouco ramificados, com coloração amarronzada, esporângios globosos em média com 40–80 µm diâmetro, multiesporados com parede lisa, coloração preto ou marrom escuro, raramente apresentando colar, columelas em maioria globosas, com algumas subglobosas a cônicas de 25–65 µm de diâmetro, lisas, coloração marrom claro. Esporangiosporos 4–7 × 3–4.5 µm, levemente estriados, regular em forma e tamanho, ovoides a elipsoidal. Clamidosporos raramente observado. Espécie heterotática porém o zigosporo não foi observado. Espécie termofílica, com ótimo crescimento de 30 a 36 °C, com máximo crescimento a temperatura de 52 °C.

Pesquisas com fungos *Rhizopus sp.* demonstraram que espécies deste gênero são capazes de produzir diferentes tipos de compostos de enorme importância industrial, como enzimas (FREITAS *et al.*, 2014).

3.6 Extração e purificação parcial de proteases com propriedades colagenolíticas - Sistema Duas Fases Aquosas (SDFA)

A recuperação de biomoléculas faz parte da fase crítica do processo de produção. A purificação de um bioproduto voltado para o mercado industrial deve conter algumas características tais como: robustez, confiabilidade, facilidade no escalonamento do processo e na remoção de impurezas, velocidade de processo e alto rendimento de recuperação. (ROSA *et al.*, 2011).

A extração líquido-líquido utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) é um dos processos mais promissores de biosseparação, que pode ser utilizada nas etapas iniciais do processo de purificação, em substituição às difíceis separações sólido-líquido, ou até mesmo em etapas de purificação subsequentes (ROSSO *et al.*, 2012). Os SDFAs foram uma das alternativas em potencial para o emprego na indústria (PANDEY *et al.*, 2006).

O SDFA apresenta-se como um método eficiente e de baixo custo, constituído por duas fases polares imiscíveis que promovem a separação dos bioprodutos preservando suas principais características. Possui composição

próxima de 70 a 90% de água, por isso são apropriados para purificação de materiais biológicos, minimizando os riscos de desnaturação das biomoléculas (SILVA; LOH, 2006; MOURA *et al.*, 2010).

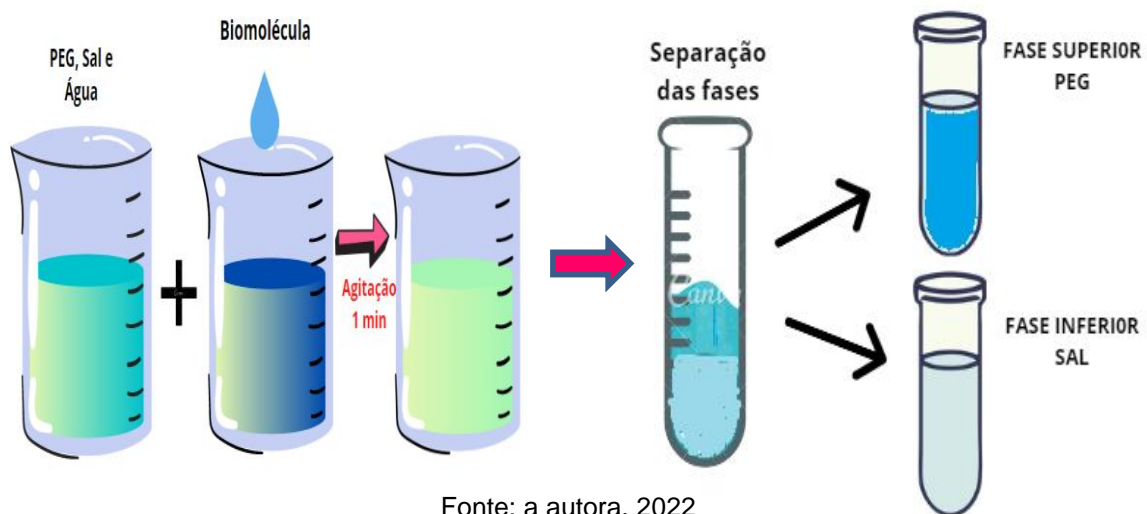
Diversos fatores como: constituição, tamanho e estrutura molecular do polímero; temperatura; natureza e tamanho da partícula alvo assim como, pH e natureza do eletrólito do sistema bifásico influenciam na separação de fases em S DFA e, conseqüentemente, o processo extrativo de um determinado biocomposto (ALBERTSSON, 1986; MONTERIO FILHO, 2010).

Entre os S DFA, os mais estudados são o sistema polímero-polímero (polipropileno glicol X maltodextrina) e os de polímero-sais (polietilenoglicol x sulfato de potássio) sempre dissolvidos em matriz aquosa. A utilização do polietilenoglicol (PEG) apresenta-se vantajosa devido ao baixo custo deste polímero (SILVA; LOH, 2006; MOURA *et al.*, 2010). Na maioria dos S DFA constituídos por Polietilenoglicol/sal o produto de interesse é comumente particionado para a fase superior rica em PEG, enquanto que, os subprodutos são dispensados na fase inferior rica em sal (BARROS *et al.*, 2009).

O sistema formado por polietilenoglicol (PEG) e fosfato foi relatado para extração de collagenase, uma vez que o PEG possui propriedades físicas favoráveis, como viscosidade e densidade entre as diferentes fases (LIMA *et al.*, 2013; ROSSO *et al.*, 2012). O processo S DFA proporciona facilidade como: aumento de escala, rápida transferência de massa, utiliza temperatura ambiente, baixo custo de material, alta seletividade, reciclagem dos reagentes, as enzimas permanecerem estáveis no sistema devido à alta concentração de água e reagente não desnaturante (CAVALCANTI *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2010). As vantagens desses sistemas incluem também, o tempo de processamento e baixa energia de consumo (YAVARI *et al.*, 2013).

Asenjo e Andrews (2011) descrevem que o sistema bifásico tem sido utilizado com eficácia no desenvolvimento de bioprocessos para a recuperação e purificação de vários produtos biológicos como proteínas, material genético, bionanopartículas, células e organelas.

Figura 5. Esquema do sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Sal.

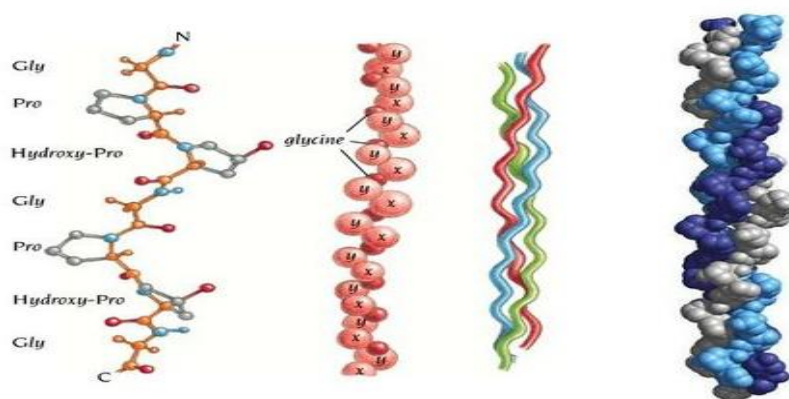


Fonte: a autora, 2022

3.7 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo humano, ocupa cerca de 30% do peso corporal. Existem mais 20 tipos diferentes e cada um desses colágenos formam fibras: ou colágena ou reticular (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). O colágeno aparece em diversas formas, principalmente no tecido conjuntivo. A combinação de aminoácidos é pouco comum: um terço dos aminoácidos é representado pela glicina (Gly), cerca de 10% prolina (Pro), hidroxiprolina (Hyp) e hidroxilisina (Hyl) (KOOLMAN; RÖHM, 2005). O colágeno ainda pode ser definido como uma glicoproteína da matriz extracelular, composta de três cadeias polipeptídicas (denominadas cadeias ∞) enroladas em uma configuração helicoidal (ROSS & PAWLINA, 2017).

Figura 6. Estrutura molecular do colágeno



Fonte: Adaptado SIONKOWSKA, 2004.

Foram relatados pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno, que são classificados de acordo com sua estrutura em: estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas (DAMODARAN *et al.*, 2010). De acordo com Goldberg e Rabinovitch (1981), a molécula de colágeno mede cerca de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, e ela se associa lateralmente a outra molécula com um deslocamento de 67nm, quase $\frac{1}{4}$ da molécula. Entre moléculas sucessivas, o intervalo é de 40nm. A associação das moléculas de colágeno em fibrilas é estabilizada por ligações covalentes entre os resíduos de lisina e hidroxilisina, após a desaminação oxidativa pela lisiloxidase.

Uma típica molécula de colágeno é longa, com estrutura rígida, em que três cadeias polipeptídicas (referidas como "cadeias α ") estão torcidas, uma em volta da outra, de forma semelhante a uma corda de tripla hélice. Apesar de serem encontradas em todo o corpo, seus tipos e sua organização são determinados pelo papel estrutural que o colágeno desempenha em cada órgão específico (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2009), onde cada cadeia polipeptídica possui aproximadamente 1038 resíduos de aminoácidos (SENA, 2004).

As fibras colágenas foram assim denominadas porque da sua cocção foi obtida uma gelatina usada como cola (do grego *kolla*, cola; *gennaein*, gerar), são constituídas pelo primeiro colágeno identificado: o colágeno do tipo I (GENESER *et al.*, 2015). Segundo Franzen e colaboradores, (2013) o colágeno do tipo I é o mais abundante constituindo cerca de 80% do colágeno do organismo. É o tipo de colágeno mais desejado pelas indústrias devido às suas propriedades físico-químicas e mecânicas, tornando-se alvo para a produção de biomateriais para uso na engenharia de tecidos e de alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Algumas estruturas como tendões e pele de animais, principalmente suínos e bovinos, tem sido as principais fontes de colágeno utilizadas para as aplicações industriais. Porém, devido aos riscos de envolvidos na transmissão de doenças como: encefalopatia espongiforme bovina, encefalopatia espongiforme transmissível e febre aftosa e a existência de barreiras religiosas envolvidas no consumo de produtos de origem bovina ou suína, a busca por

novas fontes de colágeno é constante e necessária com o intuito de suprir a decorrente valorização dos subprodutos industriais do colágeno (VEERURAJ; ARUMUGAM; BALASUBRAMANIAN, 2013).

3.8 Aplicações do Colágeno

A utilização do colágeno e seus peptídeos como biomateriais, bem como suas aplicações comerciais, têm aumentado cada vez mais. Produtos naturais com múltiplas funções, como o colágeno e seus peptídeos, atraem interesse e necessidade de estudos voltados a seus desenvolvimentos (WATANABE, 2004). A capacidade de automontagem é propriedade intrínseca do colágeno tipo I em formar espontaneamente fibrilas *in vitro*, semelhantes às observadas em experimentos *in vivo*, facilita a aplicação em diferentes setores da indústria justificando assim o alto interesse na sua comercialização (ZOU *et al.*, 2016)

O colágeno apresenta inúmeras aplicações na indústria farmacêutica, cosmética, e fotográfica e na área de alimentos, recentemente, aumentaram as aplicações de colágeno como emulsificante, agente de liga, estabilizante, encapsulamento de microrganismos e formação de biofilmes (KIM & MENDIS, 2006; GOMÉZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Na indústria de alimentos o uso da gelatina é baseado, principalmente, em suas propriedades de formação visco-elásticas e de gel. Recentemente, novas aplicações têm sido encontradas em produtos emulsionados, como agente espumante, material para embalagens biodegradáveis e como agente de encapsulamento, nestes últimos, visando à substituição de materiais sintéticos por materiais naturais (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). A participação do colágeno nas formulações de produtos cárneos, além de melhorar a elasticidade, a consistência e a estabilidade, mostra-se como uma alternativa para o aumento do consumo de colágeno pelo consumidor, estimulando a indústria a desenvolver e ofertar produtos funcionais (PRESTES, 2013).

A hidrólise enzimática do colágeno e seus subprodutos indicam a capacidade de obter atividades bioativas, tais como, agentes antimicrobianos, antioxidantes e anti-hipertensivos (MONTERO *et al.*, 2011).

O colágeno contribui ainda na consistência, estabilidade e a qualidade dos alimentos e bebidas, aumentando o seu valor nutricional e monetário,

como por exemplo, a produção de peptídeos bioativos de colágeno de peixes para elaboração de bebidas probióticas (HASHIM *et al.*, 2015). A ingestão de colágeno pode evitar doenças cardiovasculares, melhorar a firmeza da pele, proteger contra danos nas articulações, ajudar no tratamento contra osteoporose, prevenir o envelhecimento e ser anti-hipertensivo (PORFÍRIO, 2016).

Outras características que tornam o colágeno um substrato de interesse para o uso nas indústrias médica, cosmética e alimentícia, são: biodegradabilidade, baixa resposta imunológica e toxicidade e a facilidade de produção em larga escala (GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003). Estudos também relatam que a utilização dos peptídeos de colágeno com propriedades biológicas é uma das aplicações promissoras deste substrato (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). Lima *et al.*, (2014) obtiveram peptídeos bioativos do colágeno, com propriedades anti-oxidante e antimicrobianas, e sugeriram a utilização dos hidrolisados de colágeno na indústria alimentícia, com o objetivo de aumentar a vida dos produtos, além do desenvolvimento de alimentos funcionais.

3.9 Produção de peptídeos bioativos do colágeno

A hidrólise enzimática do colágeno é um importante bioprocessamento para melhorar as propriedades físicas, químicas, funcionais e nutricionais de proteínas nativas. É também um método eficaz para produzir peptídeos biologicamente ativos, que possuem muitas propriedades benéficas para a saúde, incluindo ligação mineral, atividade opióide, promotor de crescimento para bifidobactérias, regulação da pressão sanguínea ou do sistema imunológico (BHAT, KUMAR e BHAT, 2017; SARBON, BADI e HOWELL, 2018). A enzima comumente utilizada para essa clivagem é classificada como uma metaloprotease, a colagenase, por ser capaz de clivar a tripla hélice que forma a proteína (LIN *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Os peptídeos podem ser ainda fracionados com técnicas baseadas em diferentes propriedades físico-químicas, tais como massa molecular, hidrofobicidade ou carga; tendo sido avaliados quanto ao seu potencial biológico usando uma ampla gama de bioensaios *in vitro* envolvendo células

cultivadas em cultura juntamente com reações químicas ou enzimáticas específicas. Quando uma fração com potencial bioativa é obtida, esta pode ainda ser caracterizada por identificação das sequências peptídicas nela contidas. Isso geralmente envolve a utilização de técnicas de separação por cromatografia ou eletroforese capilar (CE) acoplada à espectrometria de massa (MS). Esses bioensaios baseiam-se essencialmente nos mesmos protocolos usados rotineiramente na descoberta de medicamentos (NONGONIERMA e FITZGERALD, 2017).

Os fragmentos peptídicos podem apresentar funções biológicas de interesse médico veterinário, podendo funcionar como hormônios e agentes imunomoduladores, através de interações com citocinas, receptores e proteínas sinalizadoras. Ainda, tem atraído atenção significativa com a recente descoberta de sua atividade inibidora ou antagonista de sistemas de interação proteica. Dentre as mais variadas aplicabilidades biológicas dos peptídeos produzidos, destacam-se: atividade antioxidante, proteção da pele, efeitos neuroprotetores, anti-hipertensiva, antimicrobiana, antitumoral e a promotora da cicatrização tecidual (JEEVITHAN *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2017, 2019).

A oxidação de biomoléculas tem sido identificada como um processo mediado por radicais livres, o que resulta em numerosos impactos desfavoráveis nos sistemas alimentares e biológicos. Em organismos aeróbicos, espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo radical ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, singlete oxigênio, e ácido hipocloroso, são produzidos dentro da célula sob condições fisiológicas e patológicas (BHAT, KUMAR e BHAT, 2017; LI *et al.*, 2013; SARBON, BADII e HOWELL, 2018; WANG *et al.*, 2013). Eles estão associados à etiologia de várias doenças degenerativas, como distúrbios cardiovasculares, diabetes, neurodegenerações, câncer e envelhecimento em geral. Assim, os esforços de pesquisa têm se concentrado no uso de antioxidantes para a prevenção e tratamento de tais condições (FONTOURA *et al.*, 2018).

Os peptídeos derivados do colágeno provenientes dos subprodutos do processamento de aves servem como antioxidantes eficazes. A atividade de eliminação de radicais é devida principalmente à alta presença de prolina (Pro) e glicina (Gly) dentro de sua sequência de aminoácidos que desempenham um

importante papel na doação de prótons a radicais deficientes em elétrons (FONTOURA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2016).

Estudos em humanos e animais demonstraram que a ingestão de peptídeos de colágeno de baixo peso molecular (geralmente, entre 2 kDa e 6 kDa) pode melhorar as condições subjetivas e objetivas da pele e atenuar os danos induzidos pela radiação UV na pele. A eficácia dos peptídeos de colágeno depende do histórico dos sujeitos e das condições ambientais. Vários estudos *in vitro* demonstraram que o peptídeo Pro-Hyp exerce atividades biológicas significativas em fibroblastos e queratinócitos. Estes efeitos podem estar associados aos benefícios causados pela ingestão de peptídeos de colágeno. Os efeitos do Pro-Hyp nos fibroblastos que migram da pele são diferentes daqueles sobre os fibroblastos em linhas celulares (BENAYAHU *et al.*, 2018; SATO, 2018).

Peptídeos bioativos derivados de subprodutos alimentícios são componentes promissores para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão (GALLEGO, MORA e TOLDRÁ, 2018). A hipertensão é um distúrbio resultante de uma interação de fatores genéticos e ambientais e é reconhecido como um alvo-chave para controlar a mortalidade relacionada à doença cardiovascular. Nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na busca de peptídeos bioativos com atividade anti-hipertensiva a partir de microalgas. Os efeitos desses peptídeos bioativos são devidos principalmente à inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA I) no sistema renina-angiotensina aldosterona.

A ECA é uma metaloprotease de zinco ligada à membrana que catalisa a clivagem proteolítica de um dipeptídeo do terminal carboxila em Angiotensina-I para formar angiotensina-II (GIORDANO *et al.*, 2018). Os medicamentos inibidores da ECA, como o captopril, o lisinopril e o enalapril, comprovadamente bem sucedido no tratamento da hipertensão. Entretanto, o uso de drogas anti-hipertensivas sintéticas está associado a vários efeitos colaterais, como secura, tosse, irritação da pele, angioedema e dor de cabeça. Os peptídeos inibidores da ECA mais potentes contêm Hyp-GlyPro, já tendo sido obtidos da hidrólise de colágeno proveniente de organismos aquáticos, representando uma alternativa aos anti-hipertensivos (FELICIAN *et al.*, 2018).

Os problemas crescentes da resistência múltipla a drogas e os riscos potenciais para a saúde de antimicrobianos e conservantes químicos para alimentos levou a uma busca por fontes baseadas na natureza de peptídeos antimicrobianos. Sendo os organismos aquáticos uma das fontes alternativas, os peptídeos antibacterianos foram isolados e caracterizados a partir de peixes e vários taxa de invertebrados marinhos, incluindo esponjas, cnidários, artrópodes e moluscos. Peptídeos com função antimicrobiana oriundos de organismos aquáticos constituem uma nova geração de antibióticos, tendo sido relatado ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Esses peptídeos possuem porções catiônicas, que facilitam sua interação com membranas de patógenos microbianos (FELICIAN *et al.*, 2018).

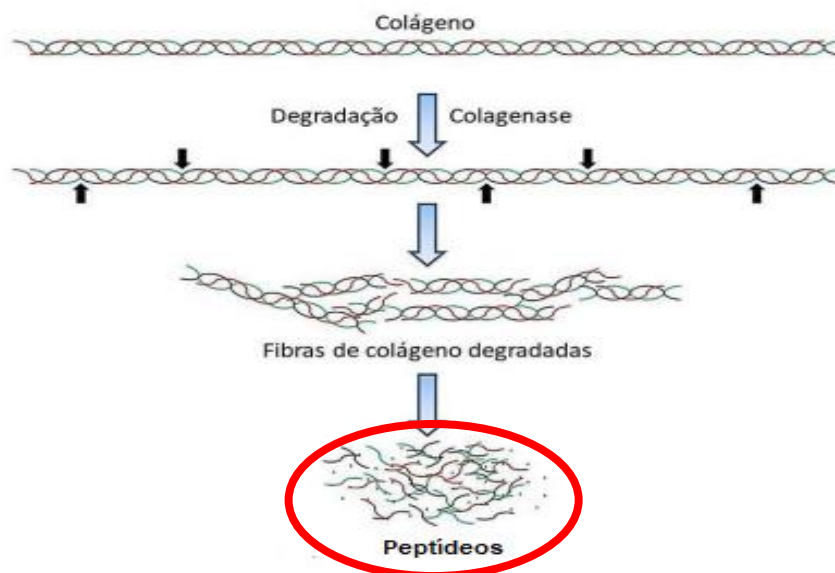
A capacidade dos peptídeos para resistir em várias condições gastrointestinais e térmicas pode ser útil para a sua aplicação como ingredientes para o desenvolvimento de alimentos funcionais e aplicações nutracêuticas (SINGH e VIJ, 2018). O tempo e a temperatura afetam grandemente a extensão da desnaturação da proteína que ocorre e a acessibilidade das enzimas gastrointestinais para decompor a biomolécula em peptídeos bioativos variados (SANGSAWAD; ROYTRAKUL; YONGSAWATDIGUL, 2017). Alguns peptídeos podem influenciar funções cerebrais superiores, como aprendizado e memória, em humanos e animais. Dipeptídeos e tripeptídeos podem atravessar a parede intestinal e entrar diretamente na corrente sanguínea, podendo atingir os órgãos-alvo para exercer os seus efeitos neuroprotetores (XU *et al.*, 2015).

O uso de peptídeos bioativos em nanocápsulas deve ser desenvolvido de acordo com a necessidade da liberação da droga necessária para cada patologia. Existem diferentes tipos de nanopartículas (NPs) sintetizadas de várias formas, como lipossomas, nanoesferas, dendrímeros, hidrogéis e nanoemulsões. Tais formas podem tratar retinopatias, degenerações da retina e doenças inflamatórias. Além de penetrar, as NPs devem manter a bioavaliabilidade e biodistribuição que as drogas já possuem. Dessa forma, as NPs vão promover e aumentar a penetração, o alcance do alvo e a liberação controlada das drogas (ADIJANTO; NAASH, 2015; CHENG *et al.*, 2016; GAO *et al.*, 2016; JEONG *et al.*, 2016; MAJZOUB; EWERT; SAFINYA, 2016; MANDAL *et al.*, 2014; MITRA *et al.*, 2016).

Embora o invólucro de polímero esteja sendo usado para envolver uma droga dentro da nanocápsula, uma droga é uniformemente distribuída dentro do polímero na nanoesfera, na qual, em comparação com a nanocápsula, causa menos danos e irritação ao tecido (KAMALEDDIN, 2017). Um dos materiais mais utilizados em distribuição de drogas utilizando NPs é a quitosana, devido às seguintes propriedades: biocompatibilidade, biodegradabilidade e habilidade de ligação com compostos orgânicos, além de susceptibilidade à hidrólise enzimática e atividade fisiológica intrínseca. O método de gelificação iônica pode ser utilizado para síntese das NPs de quitosana por ser de baixo custo, utilizar água como base de solução, apresentar alta estabilidade das partículas sintetizadas e utilizar condições brandas de reação (ANANDHAKUMAR *et al.*, 2017).

Nessa pesquisa produzimos peptídeos bioativos do colágeno isolados a partir de resíduos sólidos de aves, que sofreu hidrólise enzimática pela colagenase. Posteriormente houve a investigação das bioatividades desses peptídeos *in vitro*.

Figura 7. Peptídeos bioativos de colágeno



Fonte: Adaptado de Bhagwat e Dandge, 2018.

3.10 Caatinga

A Caatinga é um bioma com características peculiares, fazendo-se presente apenas no território brasileiro, com uma área de cerca de 844.453

km², o que equivale a cerca de 11% do território nacional. É considerada uma das maiores regiões de floresta seca do mundo, onde seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em qualquer outro lugar do planeta, com muitas espécies de microrganismos, plantas e animais adaptados exclusivamente para a vida nesta região semiárida (SILVA *et al.*, 2020; DA ROCHA *et al.*, 2019; IBGE, 2015; DRECHSLER-SANTOS *et al.*, 2010).

De acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente, o bioma Caatinga contempla os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí, Sergipe e o norte de Minas Gerais, obtendo assim a maior parte da riqueza biológica exclusiva da região Nordeste (BRASIL, 2016).

Sampaio (1995) descreve que a Caatinga corre em uma região semiárida definida por uma baixa pluviosidade (300 – 1000 mm.ano) e uma alta sazonalidade, estando as chuvas concentradas em poucos meses e de maneira pouco previsível. O clima da Caatinga é caracterizado por apresentar dois períodos bem distintos: um período chuvoso, denominado de “inverno”, que geralmente dura de três a cinco meses, dependendo da região e, um período de estiagem, “verão”, com duração de sete a nove meses (BARBOSA, 2003).

Os microrganismos endêmicos deste ecossistema se apresentam uma fonte valiosa de biomoléculas com atividades biológicas potencialmente inovadoras; variações extremas em temperatura, umidade e alta salinidade do solo, acompanhado por baixos níveis de nutrientes e altas irradiações UV, fazem com que os microrganismos desenvolvam a capacidade genética de se adaptar metabolicamente para sobreviver. Cepas microbianas descendentes das características acima relatadas têm uma influência importante na produção industrial biotecnológica, incluindo fatores como tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação, maior rendimento e viabilidade econômica (DA ROCHA *et al.*, 2019).

Para Silva e colaboradores (1993) e Duque (1980), os solos da região da Caatinga têm a maior variabilidade do país, estes são originários de duas formações geológicas principais, a formação sedimentar que predomina na porção oeste e a cristalina, na porção leste e que ainda os solos deste bioma são geralmente pouco profundos, de baixa permeabilidade, baixo teor de

matéria orgânica, mas relativamente ricos em bases trocáveis e que por receberem naturalmente na maioria dos meses do ano excesso de calor e luz, desencadeiam uma rápida mineralização da matéria orgânica. A fertilidade baseia-se na sua alcalinidade e riqueza em bases. Portanto, os métodos de exploração destes solos deveriam estar fundamentados no menor distúrbio possível do meio biológico.

Plante *et al.*, (2014) indicam que existam cerca de 250.000 espécies de plantas, mais de 300 milhões de espécies de insetos, 1,5 milhão microrganismos, entre estes os fungos. Estas espécies coexistem interagindo entre si e com o ambiente e que inúmeros compostos naturais inexplorados presentes em plantas e microrganismos ainda não foram catalogados nem conhecidos em suas propriedades. Por outro lado, várias linhagens de microrganismos presentes no solo da Caatinga já foram identificadas, entre elas o *R. microsporus*.

Por ser um bioma que ainda tem muito a ser estudado, sabe-se pouco sobre esses microrganismos adaptados às condições extremas por serem submetidos a variações de fatores de origem química e física. Essas condições permitem que os microrganismos isolados do solo tenham características atípicas valiosas para pesquisas que permitam descobrir características bioquímicas e biológicas. Os fungos da caatinga que já foram estudados têm papel reconhecido na produção de medicamentos, bebidas e alimentos, como a penicilina, cerveja e queijo (SILVA *et al.*, 2020; SIMÕES *et al.*, 2019).

Devido a sua característica heterotrófica os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir extracelularmente diferentes tipos de enzimas. Ganham destaque como microrganismos de uso industrial por serem capazes de crescer em substratos de baixo custo e de fácil remoção celular quando comparado com bactérias. Das enzimas produzidas por fungos podemos destacar glucoamilase, celulase, lipase, lacase, catalase e protease. Entretanto, da diversidade de fungos filamentosos encontrados na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente como fonte produtora de enzima. O gênero *Aspergillus* domina o mercado mundial com representantes das espécies *A. niger* e *A. oryzae* (ZAFERANLOO *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2015; KOVAČEC *et al.*, 2016; MANDUJANO-GONZÁLEZ *et al.*, 2016).

Na última década, muitos avanços aconteceram em relação ao conhecimento da Caatinga por meio de pesquisas em diversas áreas, porém, ainda existe muito a ser pesquisado para o desenvolvimento e bioconservação do Bioma como também para aproveitamento de recursos biológicos como produção de enzimas comercialmente viáveis, aplicáveis a diversos segmentos industriais que promovam o desenvolvimento das cidades e conseqüentemente traga melhoria da qualidade de vida da população.

Figura 8- Paisagem do Bioma Caatinga



Fonte: <http://www.comunidadebancodoplaneta.com.br/profiles/blogs/fundo-financiaprojetos-de>.

4 REFERÊNCIAS

ABIDI, F.; AISSAOUI, N.; GAUDIN, J. C.; CHOBERT, J. M.; HAERTLÉ, T.; MARZOUKI, M. N. Analysis and Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. **Appl Biochem Biotechnol**. 2013.

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas. Universidade Estadual de Maringá – UEM. **Revista UNINGÁ Review** - Vol. 21, nº 1, p.55-59. 2015.

ADIJANTO, J.; NAASH, M. I. Nanoparticle-based technologies for retinal gene therapy. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 95, p. 353–67, 2015.

AGRAWAL, *et al.*, Production of alkaline protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochem**.39, 977-98.1, 2004.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of Cell and Macromolecules**. 3rd ed. New York: John Wiley, 1986.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. John Wiley & Sons, INC, New York. 4th ed, 869p, 1996.

ALIPOUR, H.; RAZ, A.; ZAKERI, S.; DINPARAST, D. N. Therapeutic applications of collagenase (metalloproteases): A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 6(11), 975–981, 2016.

ANANDHAKUMAR, S. *et al.*, Preparation of collagen peptide functionalized chitosan nanoparticles by ionic gelation method: An effective carrier system for encapsulation and release of doxorubicin for cancer drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 70, p. 378–385, 2017.

ANTÃO, C. M.; MALCATA, F. X. Plant serine proteases: Biochemical, physiological and molecular features. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 637–650, 2005.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.

AZEVEDO, T. O. M.; SILVA, B.; LIMA, E. S. e SOUZA, J. V. B. de. Fungos isolados de amostras de solo da região amazônica, *Aspergillus* INPA 154 e *Fusarium* INPA 6, produzem proteases com potencial para utilização em formulações cosméticas. **Dissertação de mestrado**, 2018.

BAEHAKI A, SUKAMO, SYAH D, SETYAHADI S, & SUHARTONO MT. Production and characterization of collagenolytic protease from *Bacillus*

licheniformis F11.4 originated from Indonesia. **Asian J. Chem.**, 26, 2861–2864. 2014.

BARROS, M. C. A. D.; SILVA, C. S.; PASOTTO, M. B. Estudo da hidrólise do ácido clavulânico na presença do Polietilenoglicol. *In*: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEQ-IC), Uberlândia, Minas Gerais, **Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica (COBEQ-IC)**, 2009.

BATISTA, J. M. S. *et al.*, Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

BARBOSA, D. C. A.; BARBOSA, M. C. A.; LIMA, L. C. M. Fenologia de Espécies Lenhosas da Caatinga. *In*: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Org.). **Ecologia e conservação da caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 657- 694. 2003.

BARRETT, A. Classification of peptidases: Proteolytic enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. *In*: **Methods in Enzymology**. (ed. Barrett AJ). Academic Press, San Diego. 244: p.1-15, 1994.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. Ed. UNICAMP: Campinas, 1995.

BAZARZHAPOV *et al.*, Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of the barguzin valley (northern baikal region). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, p.186-189, 2006.

BENABDA, O.; M'HIR, S.; KASMI, M.; MNIF, W. and HAMDÍ, M. Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. **Hindawi Journal of Chemistry**, 2019.

BENAYAHU, D. *et al.*, Unique collagen fibers for biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 1–11, 2018.

BERNARDO, R.; HONGYING, S.; FABIO, P.; ANTONIO, G. J. Proteases virais de plantas: além do papel dos cortadores de peptídeos. **Front Plant Sci**. 2018.

BEZERRA, R.S.; BUARQUE, D.S.; AMARAL, I.P.G.; CASTRO, P.F.; ESPÓSITO, T.S.; CARVALHO JR, L.B. **Propriedades e aplicações biotecnológicas das proteases de vísceras de peixes**. *In*: José Eurico Possebon Cyrino; Elisabeth Criscuolo Urbinati. (Org.). AquaCiência 2004 Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aqüicultura (pp. 2061 –275). Campinas, SP: Artpoint Produção Gráfica, 2006.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43–55, 2018.

- BHAT, Z. F.; KUMAR, S.; BHAT, H. F. Antihypertensive peptides of animal origin: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 566–578, 2017.
- BLIEVA, R.; ZHAKIPBEKOVA, A.; AKHMETSADYKOV, N.; KALIEVA, A.; SADUYEVA, Z. H. Optimization of physiochemical requirements on collagenase production from *Aspergillus fungi*. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, p. 27–29, 2018.
- BRASIL - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Áreas prioritárias para conservação, uso sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade brasileira – **Caatinga**. Brasília, 2016.
- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. AND BARROS NETO, B. de. **Statistical Design - Chemometrics**. pp. 1-412. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2006.
- CALIN, M.; RAUT, I.; DONI, M.; ALEXANDRESCU, E.; MACOVESCU, G.; ARSENE, M. L.; GURBAN, A. M.; VASILESCU, G.; JECU, L. The potential of keratinolytic fungi for biotechnological applications in leather manufacture. **Revista de Chimie**, v. 70, n. 9, p. 3152–3157, 2019.
- CAMPOS, C. F. A.; RODRIGUÊS, K. F.; VAZ, R. G. M. V. *et al.*, Fungal enzymes in diets with alternative foods for slow-growing chicken. **Revista Desafios** – v. 04, n. 02, 2017.
- CASTRO, H. F.; CLASSEN, A. T.; AUSTIN, E. E.; NORBY, R. J.; SCHADT, C. W. Soil microbial community responses to multiple experimental climate change drivers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 4, p. 999–1007. 2010.
- CAVALCANTI, M. T. H. C.; PORTO, T. S.; BARROS NETO, B.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; PESSOA-JR, A. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. **Journal of Chromatography B**, v. 833, p. 135–140, 2006.
- CHAMPE, P.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.
- CHANALIA, P.; GANDHI, D.; JODHA, D.; SINGH, J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. **Reviews in Medical Microbiology**. v. 22, n.4, p. 96-101. 2011.
- CHAVIRA, R.J.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN J.H. Assaying proteinases with azocoll. **Anal. Biochem**, v.136, p.4446–4450, 1984.
- CHEN, CHUN-CHANG., YEN-CHING CHO, CHIEN-CHEN LAI, AND WEN-HWEI HSU. Purification and characterization of a new Rhizopuspepsin from *Rhizopus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Ásia. Vol. 57, p. 6742–6747, 2009.

CHENG, B. *et al.*, Gold nanosphere gated mesoporous silica nanoparticle responsive to near-infrared light and redox potential as a theranostic platform for cancer therapy. **J Biomed Nanotechnol**, v. 12, n. 3, p. 435–49, 2016.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15**. Wayne, PA: [s.n.].

CONTESINI, F. J.; RODRIGUES DE MELO, R.; SATO, H. H. Uma visão geral das proteases de *Bacillus* : da produção à aplicação. **Crit Rev Biotechnol**. 2017.

CUI, Y.; VAN DER LANS, R.; LUYBEN, K. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 409-419, 1998.

DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S.; DAVE, D.. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, n.4, p.239-263, 2010.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. AND FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. p. 726-730. 4ª ed. São Paulo: Artmed. 2010.

DA ROCHA, W. R. V. *et al.*, Screening and optimizing fermentation production of lasparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426–1437, 2019.

DOLATABADI, S.; WALTHER, G.; GERRITS, A. H. G.; ENDE, VAN DEN.; DE HOOG, G. S. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. **Fungal Diversity**, 2013.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**–IHW– Verlag. Eching, Germany, 2007.

DRECHSLER-SANTOS, E. R.; SANTOS, P. J. P.; GIBERTONI, T. B. *et al.*, Aspectos ecológicos de Hymenochaetaceae em uma área de Caatinga (semi-árido) no Nordeste do Brasil. **Diversidade fúngica**, 42, 71–78, 2010.

DUARTE NETO, J. M. W., WANDERLEY, M. C. DE A., LIMA, C. DE A., & PORTO, A. L. F. Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*. **Protein Expression and Purification**, 147, 22–28, 2018.

DUDANI, J.S.; WARREN, A.D.; BHATIA, S. N. Aproveitando a atividade da protease para melhorar o tratamento do câncer. **Annu Rev Cancer Biol**. 2018.

DUQUE, G. **Solo e água no polígono das secas**. 5. ed. Mossoró: ESAM, 273p. 1980.

EL-ENSHASY, H.; KLEINE, J.; RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2103-2112, 2006.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T C. M.; STAMFORD-ARNAUD, T. M. *et al.*, Physico Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitin and Chitosan Produced by *Mucor circinelloides* Using Yam Bean as Substrate. **Molecules**, v. 16, p. 7143-7154, 2011.

FELICIAN, F. F. *et al.*, Collagen from Marine Biological Sources and Medical. **Chemistry & Biodiversity**, 2018.

FELTES, M. M. C.; CORREIA, J. F. G.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternatives for adding value for the fish processing wastes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FERREIRA, J. A. *et al.*; *Zygomycetes*-based biorefinery: Present status and future prospects. **Bioresource technology**, v. 135, p. 523-532, 2013.

FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. da S.; TAMBOURGI, E. B. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/ fosfatos. **Exacta**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2009

FONTOURA, R. *et al.*, Characterization of a novel antioxidant peptide from feather keratin hydrolysates. **New Biotechnology**, n. March, p. 0–1, 2018.

FOX, J. W.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B. Proteinases and their inhibitors in biotechnology. Enzymes in biomass conversion. **ACS Symp Ser**, 460:62–79. 1991.

FRANÇA, I.B.; DA SILVA, C. A. A. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de amilase por *Aspergillus niger* UCP 1095 através de fermentação submersa. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 51331–51345, 2021.

FRANZEN, J. M; SANTOS, J. M. S. R; ZANCANARO, V; Colágeno: uma abordagem para a estética. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde (RIES)**. v.2, n.2, p. 49- 61, 2013.

FREITAS, A. C.; ESCARAMBONI, B.; CARVALHO, A. F. A.; LIMA, V. M. G.; OLIVANETO, P. Production and application of amylases of *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus microsporus var. oligosporus* from industrial waste in acquisition of glucose. **Chemical Papers**, v. 68, p. 442-450, 2014

GALLEGO, M.; MORA, L.; TOLDRÁ, F. Health relevance of antihypertensive peptides in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 8–14, 2018.

GAO, W. et al. Nanoparticle–hydrogel: a hybrid biomaterial system for localized drug delivery. **Ann Biomed Eng**, v. 44, n. 6, p. 2049–61, 2016.

GAUTAM, M.; AZMI, W. Screening and isolation of collagenase producing microorganism from proteins waste found in Himalayan region. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 4, n. 1, p. 558–565, 2017.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 12, p. 1531–1546, 2003.

GENESER, F.; BRÜEL, A., *et al.*, **Geneser Histología**. Edición: 4ª Ed. Panamericana, 2015.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2006.

GIORDANO, D. *et al.*, Biotechnological Applications of Bioactive Peptides From Marine Sources. **Advances in Microbial Physiology**, 2018.

GODDARD, J. S.; PERRET, J. S. M. Co-drying fish silage for use in aquafeeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.118, p. 337–342, 2005.

GOLDBERG, B.; RABINOVITCH, M. Tecido conjuntivo. *In*: Weiss L, Greep RO. **Histologia**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 120-47. 1981.

GOOSEN, N. J.; FRANCOIS DE WET, L.; GÖRGENS, J. F.; JACOBS, K.; BRUYN, A. Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 188, p. 74–84, 2014.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. A. AND MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids** 25(8): 1813-1827. 2011.

GRAMINHO, E. R.; DA SILVA, R. R.; DE FREITAS CABRAL, T. P. *et al.*, Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. **Appl Biochem Biotechnol**, 169:201– 214. 2013.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HASHIM, P. MOHD RIDZWAM, M. S. BAKAR, J. MAT HASHIM, D. Collagen in food and beverage industries. **International Food Research journal**, v.22, n.1, p.1-8. 2015.

- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v 46. 2011.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Dados gerais do município, 2015. Disponível em: < <http://cod.ibge.gov.br/N1G4> >
- JAIN, R. & JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. **Indian J. Exp. Biol.**, 48(2), 174–8. 2010.
- JEEVITHAN, E. *et al.*, Purification, characterization and antioxidant properties of low molecular weight collagenous polypeptide (37 kDa) prepared from whale shark cartilage (*Rhincodon typus*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6312–6322, 2015.
- JEONG, Y. *et al.*, Nanoparticle–dendrimer hybrid nanocapsules for therapeutic delivery. **Nanomedicine (Lond)**, v. 11, n. 12, p. 1571–8, 2016.
- JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Adv. Enzym. Res.**, 01(03), 39–51, 2013.
- JUNIER, P.; JOSEPH, E. Microbial biotechnology approaches to mitigating the deterioration of construction and heritage materials. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1145–1148, 2017.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto & Atlas**. 13ª edição. Guanabara Koogan, 2017.
- KAMALEDDIN, M. A. Nano-ophthalmology: Applications and considerations. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 1459–1472, 2017.
- KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. Enzymes. *In*: KERMASHA, S.; ESKIN, M. N. **Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, cap 2, 2021, páginas 15-44. 2021.
- KETNAWA, S.; WICKRAMATHILAKA, M. & LICEAGA, A. M. Alterações na atividade antioxidante de hidrolisados de proteínas tratados com micro-ondas após digestão gastrointestinal simulada: Purificação e identificação. **Química de Alimentos**, 254, 36 – 46, 2018.
- KIM, M.; HAMILTON, S. E.; GUDDAT, L. W.; OVERALL, C. M. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1770, p. 1627–1635. 2007.
- KIM, S.K.; MENDES, E. Bioactive compounds from marine processing byproducts – A review. **Food Research International**, v. 39, p. 383–393. 2006.

KOOLMAN, J.; RÖHM, K.H. **Bioquímica**: texto e atlas. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KOVAČEĆ, E.; LIKAR, M.; REGVAR, M. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. **Fungal Biology**, v. 120, n. 5, p. 666-678, 2016.

KUMAR, S. *et al.* Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

KUMAR, D.; SAVITRI, N.; THAKUR, R.; VERMA, R.; BHALLA, T, C. Microbial Proteases and Application as Laundry Detergent Additive. **Research Journal of Microbiology**. 661-672, 2008.

LI, Z. R. *et al.*, Isolation and characterization of acid soluble collagens and pepsin soluble collagens from the skin and bone of Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*). **Food Hydrocolloids**, v. 31, n. 1, p. 103–113, 2013.

LIMA, C. A. *et al.*, Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 7, p. 4459–4466, 2014.

LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G. & PORTO, A. L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 16(3), 549–560. 2011.

LIMA, C. A.; RODRIGUES, P. M. B; PORTO, T. S. *et al.*, Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. **Biochem Eng J** 43:315–320, 2009.

LIMA, C. A., FREITAS-JUNIOR, A.C.V., LIMA-FILHO, J. L., CONVERTI, A., MARQUES, D. A. V., CARNEIRO DA-CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, 75: 64-71. 2013.

LIMA, D. X. *et al.*, Diversity of Mucorales in natural and degraded semi-arid soils. *Brazilian Journal of Botany*, v. 39, n. 4, p. 1127-1133, 2016.

LIMA, D. X. *et al.*, Diversity of basal fungal order *Mucorales* (*Mucoromycota*) in a remaining area of the Brazilian Atlantic Rainforest. **Nova Hedwigia**, v. 107, n. 3-4, p. 459-471, 2018.

LIN, L. *et al.*, An overview of gelatin derived from aquatic animals: Properties and modification. **Trends in Food Science and Technology**, v. 68, p. 102–112, 2017.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Elsevier Inc. All rights reserved, 2017.

MAHMOUD, Y. A. G; ABU EL-SOUOD, S. M.; EL-SHOUBAGY, S. M. & EL-BADRY, A. S. M. Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers. **Ann. Microbiol.**, 57(1), 109– 113. 2007.

MAJZOUB, R. N.; EWERT, K. K.; SAFINYA, C. R. Cationic liposome-nucleic acid nanoparticle assemblies with applications in gene delivery and gene silencing. **Philos Trans A Math Phys Eng Sci**, v. 374, 2016.

MANDAL, D. *et al.*, Water-in-oil microemulsion doped with gold nanoparticle decorated single walled carbon nanotube: scaffold for enhancing lipase activity. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 113, p. 442–9, 2014.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. *et al.*, Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 76-82, 2016.

MERHEB C. W. *et al.*, Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v.104, p. 127–131, 2007.

MEROPS. **Families of Proteolytic Enzymes**. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P. Acesso em 20 nov. 2021.

MITRA, R. N. *et al.*, Nanoparticle-mediated miR200-b delivery for the treatment of diabetic retinopathy. **J Control Release**, v. 236, p. 31–7, 2016.

MONTEIRO FILHO, E. S. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência & Tecnologia**. v. 1, n. 1,p. 33-41, 2010.

MONTERO, P.; ALEMÁN, A.; PÉREZ-SANTÍN, E.; , S.; ARNAUDIN, I. AND GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. [Food Research International. Volume 44, Issue 4](#), p.1044-1051, 2011.

MONTGOMERY, D. C.; **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed., John Wiley: New York, 1991.

MOURA, R. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Partição da lectina de *Canavalia grandiflora Benth* (ConGf) em sistema de duas fases aquosas usando PEG/fosfato. In: X Jornada de ensino, pesquisa e extensão (JEPEX 2010), UFRPE: Recife. **Anais do X Jornada de ensino, pesquisa e extensão**, 2010.

- MUYONGA, J. H.; COLE, C. G. B.; DUODU, K. G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). **Food Chemistry**, v. 85, p. 81–89, 2004.
- NASCIMENTO, K. B. M.; MARTINS, A. G. R.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus sp* isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 95-103. Editora UniBH, 2014.
- NAVEED, M.; NADEEM, F.; MEHMOOD, T.; BILAL, M.; ANWAR, Z.; AMJAD, F. Protease - um biocatalisador versátil e ecológico com aplicações multiindustriais: uma revisão atualizada. **Catal Lett.**, 151 (2): 307–323, 2021.
- NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597–611, 2013.
- NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Strategies for the discovery and identification of food protein-derived biologically active peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 289–305, 2017.
- OLIVEIRA, A. C. D. *et al.*, Comparação entre três bioprocessos para a produção de enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, 2012.
- OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro, 230p. 2014.
- OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos**. Mestrado (dissertação). Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Manaus – AM, 2010.
- OLIVEIRA, V. M., ASSIS, C. R. D., HERCULANO, P. N., CAVALCANTI, M. T. H., BEZERRA, R. S. & PORTO, A. L. F. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.43, n.1, p.52-64, 2017.
- OLIVEIRA, V. DE M. *et al.*, Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: Structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1176, p. 751–758, 2019.
- Ok, T. & HASHINAGA, F. Detection and production of extracellular collagenolytic enzyme from *Zygosaccharomyces rouxii*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 42, 517–523. 1996.
- ORLANDELLI, R.; SPECIAN, V.; FELBER, A.; PAMPHILE, J. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.l.], v. 7, n. 3, 2012

PAL, G. K.; SURESH, P. V. Microbial collagenases: Challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33763–33780, 2016.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindenses* em processos descontínuos.** (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós Graduação em Engenharia, USP, 2003.

PANDEY, A. *et al.*, **Enzyme Technology**. 1st. ed. [s.l.] Springer, 2006.

PATEL, S.; HOMAEI, A.; EL-SEEDIDE, H. R.; AKHTAR, N. Catepsinas: proteases que são vitais para a sobrevivência, mas também podem ser fatais. **Biomed Pharmacother**. 2018.

PELE, M. A., MONTERO-RODRIGUEZ, D., RUBIO-RIBEAUX, D. *et al.*, Development and improved selected markers to biosurfactant and bioemulsifier production by *Rhizopus* strains isolated from Caatinga soil, 17(6), 150–157. 2018.

PEREIRA, W. E. S.; SILVA, R. R.; AMO, G. S.; RULLER, R.; KISHI, L. T.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. A Collagenolytic Aspartic Protease from *Thermomucor indicaeseudaticae* Expressed in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, part of Springer Nature, 2020.

PESSOA-Jr, A. and KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Editora Manole, São Paulo, Brasil, p. 176 – 279, 2005.

PLANTE, A. F.; STONE, M. M.; MCGILL, W. B. The Metabolic Physiology of Soil Microorganisms. Soil Microbiology, **Ecology and Biochemistry**, p. 245, 2014.

POLDERMANS, B. Proteolytic enzymes. In: Gerhartz W, editor. Proteolytic enzymes in industry: production and applications. **VCH Publishers**, p. 108–123, 1990.

PHONGTHAI, S.; D'AMICO, S.; SCHOENLECHNER, R.; HOMTHAWORNCHOO, W.; RAWDKUEN, S. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, 240, 156–164, 2018.

PORFÍRIO, E. and FANARO, G. B. Collagen supplementation as a complementary therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: a systematic review. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol**, 19 (1): 153-164. Rio de Janeiro, 2016.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, 15 (1): 65-74, 2013.

QURESHI, A. S., BHUTTO, M. A., KHUSHK, I., DAHOT, M. U. Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 5173-5181, 2011.

RABELO, A. P. B.; TAMBOURGI, E. B.; PESSOA Jr A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. **Journal of Chromatography B**, 807: 61–68, 2004.

RANGEL-YAGUI *et al.*, Micellar solubilization of ibuprofen – influence of surfactant head groups on the extent of solubilization, abr./jun., **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 41, n. 2. São Paulo, 2005.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V.. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v.62, n.3, p.597-635, 1998.

RAZZAQ, A.; SHAMSI, S.; ALI, A.; ALI, Q.; SAJJAD, M.; MALIK, A.; ASHRAF, M. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–20, 2019.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; THOMAS, P. D.; HUANG, X.; BATEMAN, A.; FINN, R. D. A base de dados MEROPS de enzimas proteolíticas, seus substratos e inibidores em 2017 e uma comparação com peptidases na base de dados PANTHER. **Nucleic Acids Res.**, 46 : D624 – D632, 2018.

RE, R. *et al.*, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic BiolMed**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RODRIGUES, G. S.; AMARAL, M. N.; VIGHI, I. L.; *et al.*, Caracterização funcional das enzimas antioxidantes em plantas de arroz expostas ao estresse salino. **Biol Plant**, 61, 540-550, 2017.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; SPELZINI, D.; BOERIS, V.; CRISTÓBAL N.; AGUILAR, G. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 392-397, 2013.

ROJAS *et al.*, Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Feb. v: 63, n. 2, p. 169-175, 2009.

ROSA, P. A. J. *et al.*, Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 559–567, 2011.

ROSS, M.; PAWLINA, W. **Ross | Histologia - Texto e Atlas - Correlações com Biologia Celular e Molecular**, 7ª edição. Guanabara Koogan, 2016.

ROSSO, B. U.; LIMA, C. A.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, C. O.; PESSOA-JR, A.; PORTO, A. L. F AND CUNHA, M. G. C. Collagenase partitioning in poly (ethylene glycol) phosphate aqueous two-phase system. **XVII Simpósio nacional de bioprocessos**, RN/Natal, 2009.

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.

SAIGA, A. *et al.*, Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 3, p. 942–945, 2006.

SAMPAIO, E. V. S. B. Overview of the Brazilian Caatinga. *In*: S. H. Bullock, H. A. Mooney & E. Medina (eds.). Seasonally dry tropical forests. **Cambridge University Press**, Cambridge, p: 34-63, 1995.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G. & PANDEY, A. Comparative evaluation of neural protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochem.**, 40, 2689–2694, 2005.

SANGSAWAD, P.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the simulated in vitro gastrointestinal digestion of cooked chicken breast. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 77–83, 2017.

SARBON, N. M.; BADI, F.; HOWELL, N. K. Purification and characterization of antioxidative peptides derived from chicken skin gelatin hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 85, n. July, p. 311–320, 2018.

SATO, K. Food for Skin Health: Collagen Peptides Background 1 Detection of Collagen Peptides in the Body 1 Structure of the Food-Derived Collagen Peptides in Blood 2 In Vitro Activity of Pro-Hyp and Other Peptides 2 Effects of Collagen Peptide on the Skin 3 Conclusions 4 References 4. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 1–5, 2018.

SENA, L. A. **Produção e Caracterização de Compósitos Hidroxiapatita - Colágeno para Aplicações biomédicas**. D.Sc. Tese, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

SIMÕES, A. O. *et al.*, Conhecendo a biodiversidade. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, n. 26, p. 196, 2019.

SILVA, F. B. R.; RICHÉ, G. R.; TONNEAU, J. P.; SOUZA NETO, N. C.; BRITO, L. T. L.; CORREIA, R. C.; CAVALCANTI, A. C.; SILVA, A. B.; ARAÚJO, F. J. C.; & LEITE, A. P. **Zoneamento agroecológico do Nordeste: diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico**. Petrolina: EMBRAPA-CPTSA, 2V, 1993.

- SILVA, I. E. B. da *et al.*, Fungolândia: jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da Caatinga. **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 15, n. 6, p. 52–99, 2020.
- SILVA, L. H. M.; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.
- SILVA, R. R. Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 1, p. 1–19, 2017.
- SILVA, R. *et al.*, Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova** [online], v.32, n.3, p.661-671, 2009.
- SINGH, B. P.; VIJ, S. In vitro stability of bioactive peptides derived from fermented soy milk against heat treatment, pH and gastrointestinal enzymes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. January, p. 303–307, 2018.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular Interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 735, 2004.
- SIQUEIRA, J. G. W.; GOMES, S. C. M.; SANTOS, R. K. S.; SILVA, J. C.; DIAS, J. L.; PORTO, T. S. Purificação de pectinases de *Aspergillus phoenicis* URM4924 por sistemas de duas fases aquosas e aplicação na clarificação de suco de maçã. **XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX** – UFRPE: Recife, 2013.
- SHARKOVA, T. S.; KURAKOV, A. V.; OSMOLOVSKIY, A. A.; MATVEEVA, E. O.; KREYER, V. G.; BARANOVA, N. A.; EGOROV, N. S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among *Micromycetes*. **Microbiology (Russian Federation)**, v. 84, n. 3, p. 359–364, 2015.
- SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46 (7), 541– 549, 2010.
- SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p. 76-85. 1985.
- SOUZA, P. M.; DE ASSIS BITTENCOURT, M. L.; CAPRARA, C. C.; DE FREITAS, M.; DE ALMEIDA, R. P. C.; SILVEIRA, D.; FONSECA, Y. M.; FILHO, E. X. F.; PESSOA JUNIOR, A.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.

SUMANTHA, A.; DEEPA, P.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Arch Biol Technol.** 49(5):843–85, 2006.

SUN, L. *et al.*, Purification of antioxidant peptides by high resolution mass spectrometry from simulated gastrointestinal digestion hydrolysates of *Alaska pollock* (*Theragra chalcogramma*) skin collagen. **Marine Drugs**, 2016.

STATSOFT. **Statistica**: data analysis software system. Tulsa: StatSoft, 2010.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, 2013.

TERUEL, S.R.L.T. Purification and characterization of collagenases from the skeletal muscle of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). [Tese]. McGill University Montreal, Quebec, 1997.

THYS, R. C. S.; GUZZON, S. O.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Optimization of protease production by *Microbacterium sp.* in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**. v. 41, p. 67–73, 2006.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

TRUFEM, S. F. B. **Diversidade no reino fungi: Zygomycota**. São Paulo: Universidade de São Paulo. USP- Instituto de Botânica, Brasil, 2000.

UESUGI, Y.; ARIMA, J.; USUKI, H.; IWABUCHI, M. & HATANAKA, T. Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1784: 716-726, 2008.

VELOORVALAPPIL, N. J. *et al.*, Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, 2013.

VENTURA, M. M.; FREITAS, S. M.; FREIRE, A. P. Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia *In*: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 1, p. 1- 27, 2008.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. *In*: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *In*: Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: **Interciência**, cap. 11, p. 273-287, 2008.

VEERURAJ, A.; ARUMUGAM, M.; BALASUBRAMANIAN, T. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). **Process Biochemistry**, v. 48, n. 10, p. 1592 – 1602, 2013.

VIDOTTI, R. M.; GONÇALVES, G. S. Produção e caracterização de solagem e óleo de Tilápia e sua utilização na alimentação animal. **Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Continental Industrial de Pesca** – APTA – SAA. São José do Rio Preto, SP, Brasil, 2006.

VILLEGAS, J. C., D. D. BRESHEARS, C. B. ZOU, AND D. J. LAW. Ecohydrological controls of soil evaporation in deciduous drylands: how the hierarchical effects of litter, patch and vegetation mosaic cover interact with phenology and season. **Journal of Arid Environments**, 74:595–602, 2010.

WANDERLEY, M. C. de A.; NETO, J. M. W. D.; FILHO, J. L. de L.; LIMA, C. de A.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

WANDERLEY, M. C. de A., NETO, J. M. W. D., LIMA, C. D. A., SILVÉRIO, S. I. C., TEIXEIRA, J. A. AND PORTO, A. L. Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium sp.* UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 4(4), 1-10, 2016.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. DE. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**, v. 1, n. 1, p. 44–50, 2011.

WANG, B. *et al.*, Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Marine Drugs**, 2013.

WANG, Y. *et al.*, Application of water-miscible alcohol-based aqueous two-phase systems for extraction of dyes. **Separation Science and technology**, v. 46, p. 1283- 1288, 2011.

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

WISEMAN, A. **Manual de Biotecnologia de los enzimas**, Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha, 1985.

Wu, Q.; Li, C.; CHEN, H. & SHULIANG, L. Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus*. **J. Appl. Biochem. Biotechnol.**, 160 (1), 129–39. 2010.

XU, L. *et al.* Effect of marine collagen peptides on physiological and neurobehavioral development of male rats with perinatal asphyxia. **Marine Drugs**, v. 13, n. 6, p. 3653–3671, 2015.

YAVARI, M. *et al.*, Partitioning of alkaline protease from *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424) using PEG – K₂HPO₄ aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 337, p. 1–5, 2013.

- ZUNIGA, E.; STELLABOTTE, F.; CRUMP, J. G. Jagged-Notch signaling ensures dorsal skeletal identity in the vertebrate face. **Development** , 137, 1843–1852, 2010.
- ZAFERANLOO, B. *et al.*, Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-1762, 2014.
- ZANPHORLIN, L. M. *et al.*, Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p.2137–2143, 2011.
- ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico, **Revista Liberato**, v.10, n.14, p.123-137, 2009.
- ZOU, M.; YANG, H. WANG, H.; ZHANG, J.; WEI, B.; ZHANG, H.; XIE, D. Detection of type I collagen fibrils formation and dissociation by a fluorescence method based on thioflavin T. **Int. J. Biol. Macromol.** v.92, p.1175–1182, 2016

CAPÍTULO I**Primeiro relato de produção de colagenase por fungo isolado do solo da Caatinga - *Rhizopus microsporus* UCP 1296**

Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira¹, Maria Carolina de Albuquerque Wanderley¹, Ana Lucia Figueiredo Porto^{1*}

Artigo submetido à revista: Research, Society and Development - ISSN: **2525-3409**



*Autor correspondente

Ana Lucia Figueiredo Porto

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira¹, Maria Carolina de Albuquerque Wanderley¹, Ana Lucia Figueiredo Porto¹

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, S/N, Recife, PE, Brasil.

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo estudar o fungo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga enfatizando o desenvolvimento e aplicação de processos biotecnológicos para produção de uma nova collagenase. Para tanto, parâmetros fermentativos significantes como: temperatura, pH, meio de cultura e tempo de fermentação foram avaliados. Amostras do microrganismo foram mantidas a 4 °C em meio ágar extrato de malte. O micélio foi suspenso em 5 mL de uma solução composta de NaCl e Tween 80. Após a inoculação feita com a suspensão de esporos contendo 150 µL (10^6 esporos/mL), foi realizada a fermentação submersa em frascos *Erlenmeyer* contendo 250mL de gelatina. Uma curva de crescimento foi desenvolvida para identificar o melhor tempo de produção da enzima. Os resultados que a produção da collagenase ocorreu com 120 horas de fermentação, obtendo-se 550 U/mL de atividade colagenolítica e biomassa 0,42 g/L na fase estacionária, indicando que a collagenase produzida é um metabólito secundário. Um planejamento fatorial 2^4 foi realizado para selecionar os melhores parâmetros onde foi avaliada a influência das variáveis: temperatura (°C), pH, agitação e concentração do substrato (gelatina). Com o resultado do planejamento fatorial obtivemos um aumento da produção enzimática cerca de 32%. Este é o primeiro estudo que descreve condições otimizadas de produção de collagenase por cepas de *R. microsporus*.

Palavras-chave: Collagenase; Fungo filamentoso; Bioprocessos; Inovação.

Abstract

The present work aimed to study the fungus *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolated from the Caatinga soil, emphasizing the development and application of biotechnological processes for the production of a new collagenase. Therefore, significant fermentation parameters such as temperature, pH, culture medium and fermentation time were evaluated. Samples of the microorganism were kept at 4 °C in malt extract agar medium. The mycelium was suspended in 5 mL of a solution composed of NaCl and Tween 80. After inoculation with the spore suspension containing 150 µL (10^6 spores/mL), submerged fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks containing 250 mL of gelatin. A growth curve was developed to identify the best time for enzyme production. The results show that collagenase production occurred with 120 hours of fermentation, obtaining 550 U/mL of collagenolytic activity and 0.42 g/L biomass in the stationary phase, indicating that the collagenase produced is a secondary metabolite. A 24 factorial design was carried out to select the best parameters where the influence of the variables was evaluated: temperature (°C), pH, agitation and substrate concentration (gelatin). As a result of the factorial design, we obtained an increase in enzyme production of about 32%. This is the first study to describe optimized conditions for collagenase production by *R. microsporus* strains.

Keywords: Collagenase; Filamentous fungus; Bioprocesses; Innovation.

Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo el estudio del hongo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 aislado del suelo de la Caatinga haciendo hincapié en el desarrollo y aplicación de procesos biotecnológicos para la producción de una nueva colagenasa. Para ello, se evaluaron parámetros fermentativos significativos como: temperatura, pH, medio de cultivo y tiempo de fermentación. Las muestras del microorganismo se mantuvieron a 4 °C en medio de agar de extracto de malta. El micelio se suspendió en 5 mL de una solución compuesta por NaCl y Tween 80. Tras la inoculación realizada con la suspensión de esporas que contenía 150 µL (106 esporas/mL), se realizó la fermentación sumergida en matraces Erlenmeyer que contenían 250mL de gelatina. Se desarrolló una curva de crecimiento para identificar el mejor momento para la producción de enzimas. Los resultados que la producción de colagenasa se produjo con 120 horas de fermentación, obteniendo 550 U/mL de actividad colagenolítica y biomasa 0,42 g/L en la fase estacionaria, indicando que la colagenasa producida es un metabolito secundario. Se realizó un diseño factorial 2⁴ para seleccionar los mejores parámetros donde se evaluó la influencia de las variables: temperatura (°C), pH, agitación y concentración de sustrato (gelatina). Con el resultado de la planificación factorial obtuvimos un aumento de la producción enzimática de alrededor del 32%. Este es el primer estudio que describe las condiciones optimizadas para la producción de colagenasa por cepas de *R. microsporus*.

Palabras clave: Colagenasa; Hongo filamentoso; Bioprocesos; Innovación.

1. Introdução

Proteases são enzimas altamente complexas que diferem entre si na especificidade do substrato, mecanismo catalítico e sítio ativo (SUMANTHA *et al.*, 2006). Entre as enzimas industriais disponíveis no mercado, as proteases são descritas como uma das mais versáteis por desenvolverem uma série de funções e várias aplicações biotecnológicas importantes (LIMA *et al.*, 2009; GURUMALLESH *et al.*, 2019; KUMAR; SINGH, 2014), não apresentando toxicidade e patogenicidade, consideradas como ecologicamente corretas e seguras para todos os setores biotecnológicos (YAZID, 2017). As proteases podem ser encontradas em inúmeros organismos (KERMASHA & ESKIN, 2021). Atualmente, colagenases proveniente de microrganismos são preferíveis devido a características específicas que permitem a degradação do colágeno em mais de um local, aos baixos custos de produção e manutenção, por apresentarem alto rendimento, facilidade no controle das condições de produção e maior produtividade (WANDERLEY *et al.*, 2017; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Colágeno e peptídeos de colágeno são também biomateriais de grande interesse industrial. São comumente associados à alimentação, medicamentos, cosméticos e outros produtos vinculados à área da saúde humana e animal (GAO, 2019). Segundo Oliveira *et al.*, (2017) até o presente momento, foram identificados 29 tipos genéticos distintos de colágeno, muitos dos quais com características únicas e alguns com características inter-relacionadas; contudo, todos formados por subunidades polipeptídicas designadas de cadeias. O colágeno é a mais abundante proteína dos mamíferos, representa cerca de 20-30% do total de proteínas corporais e constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos de vertebrados. Dentre os microrganismos, os fungos apresentam vantagem na produção de colagenase, pois a mesma ocorre extracelularmente, o que torna mais fácil a sua recuperação após a fermentação (SANDHYA *et al.*, 2005). Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas (ZIMMER *et al.*, 2009). Algumas enzimas de fontes microbianas foram descobertas no século 20 e desde então, estudos sobre seu isolamento,

caracterização de propriedades, produção em escala industrial e sua aplicação na bioindústria, progrediram e o conhecimento sobre elas continua a ser atualizado regularmente (NIGAM, 2013).

A busca por novas colagenases microbianas assim como metodologias economicamente mais viáveis de produção têm aumentado ao longo dos anos, e alguns autores relatam que essa perspectiva representa, atualmente, uma das maiores dentro da indústria de enzimas (ABIDI *et al.*, 2013; GRAMINHO *et al.*, 2013). Sendo necessário o desenvolvimento e investimento em estudos que comprovem a aplicação de novas colagenases produzidas por microrganismos, uma vez que possuem vasto espectro de aplicação com alto potencial biotecnológico e valor comercial agregados, e poucos trabalhos publicados relatam a produção da colagenase por fungos (WANDERLEY *et al.*, 2016).

A biotecnologia utiliza agentes biológicos para obter bens ou assegurar serviços por manipulação de microrganismos, plantas e animais para obtenção de processos e produtos de interesse. Os microrganismos têm sido largamente empregados por apresentarem elevada velocidade de síntese, estabilidade e rendimento elevado de substrato em produto, além de pouco tempo de geração, diversidade e facilidade de manipulações genética e de condições ambientais (HAZAN *et al.*, 2006; VENTURA *et al.*, 2008). Os diferentes tipos de bioprocessos geram variadas respostas em relação à produção de proteases (AGRAWAL *et al.*, 2004). O microrganismo utilizado nesse trabalho é o fungo filamentosso *Rhizopus microsporus* UCP 1296, isolado do solo da Caatinga.

A Caatinga é um bioma com características peculiares, fazendo-se presente apenas no território brasileiro, com uma área cerca de 844.453 km², o que equivale a 11% do território nacional. É considerada uma das maiores regiões de floresta seca do mundo, com muitas espécies de microrganismos, plantas e animais adaptados exclusivamente para a vida nesta região semiárida (SILVA *et al.*, 2020; DA ROCHA *et al.*, 2019; IBGE, 2015). Os microrganismos endêmicos deste ecossistema se apresentam uma fonte valiosa de biomoléculas com atividades biológicas potencialmente inovadoras; variações extremas em temperatura, umidade e alta salinidade do solo, acompanhado por baixos níveis de nutrientes e altas irradiações UV, fazem

com que os microrganismos desenvolvam a capacidade genética de se adaptar metabolicamente para sobreviver. Cepas microbianas descendentes das características acima relatadas têm uma influência importante na produção industrial biotecnológica, incluindo fatores como tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, temperatura, tempo de fermentação, maior rendimento e viabilidade econômica (DA ROCHA *et al.*, 2019).

O presente trabalho teve como proposta avaliar a produção de colagenase por *Rhizopus microsporus* UCP 1296, utilizando o planejamento estatístico para estabelecer os parâmetros fermentativos mais relevantes para o melhoramento da produção.

2. Metodologia

Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o fungo filamentosos proveniente do solo da Caatinga, *Rhizopus microsporus* UCP 1296, cedido pelo Banco de Culturas de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP.

Meios de cultura

A cepa vem sendo mantida no meio ágar extrato de malte contendo: extrato de malte (0,5%), peptona (0,1%), glicose (2%) e ágar 1,5 (%) autoclavado a 121 °C e mantido em estufa a 30 °C por 5 dias até esporulação e posteriormente mantido sob refrigeração a 4 °C. O meio de cultura utilizado para a produção de enzimas é composto por: gelatina (0,5% p/v) e solução mineral, segundo Lima *et al.*, (2011) modificado. A solução mineral foi preparada adicionando, por 100 mL de água destilada, 100 mg FeSO₄-7H₂O, 100 mg MnCl₂-4H₂O, 100 mg ZnSO₄-H₂O, e 100 mg CaCl₂-H₂O, e foi utilizada a 1% do volume total de fermentação, esterilizado em autoclave a 121 °C.

Cinética do crescimento e produção de enzimas colagenolíticas

O micélio foi suspenso em aproximadamente 5 mL de solução composta de 0,9% (p/v) NaCl e 0,01% (v/v) de solução de *Tween* 80, previamente esterilizados a 121°C por 20min. Após inoculação com uma suspensão de 150 µL esporos que foi padronizada para uma concentração final de 10⁶ esporos/mL, em uma câmara de contagem de *Neubauer*, a fermentação submersa foi realizada durante 5 dias a 28 °C e 150 rpm em frascos *Erlenmeyer* contendo 250mL do meio de cultura de gelatina. A intervalos de 24 horas foram colhidas amostras para determinação da biomassa, teor de proteínas e da atividade colagenolítica. O caldo obtido no final da fermentação (120h), o extrato bruto (EB), foi filtrado a vácuo para remoção da biomassa e os sobrenadantes analisados quanto à produção de colagenase.

Avaliação de parâmetros significativos para produção da enzima colagenolítica

Com o objetivo de selecionar os melhores parâmetros para a produção da enzima colagenolítica extracelular produzida por *R. microsporus* UCP 1296 em fermentação submersa foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴ (Tabela 1), para avaliar a influência do pH inicial, concentração inicial de gelatina, temperatura e agitação orbital.

Tabela 1 – Condições do planejamento fatorial 2⁴ – Otimização das condições do cultivo

FATORES	NÍVEIS		
	MENOR (-1)	CENTRAL (0)	MAIOR (+1)
pH	6	7	8
Concentração da Gelatina (% w/v)	0,25	0,5	0,75
Temperatura (°C)	24	28	32
Agitação orbital (rpm)	100	150	200

Fonte: a autora

O ponto central foi realizado em quadruplicata para fornecer uma estimativa de variância de respostas a erros experimentais puros. A partir

disso, foram baseados os efeitos dos erros experimentais e utilizado para avaliar o significado dos efeitos e interações das variáveis independentes - pH, concentração da gelatina, temperatura e velocidade de agitação orbital sobre a produção de enzima colagenolítica. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas com 95% de confiança utilizando o software *Statistic 8.0* (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

Determinação da atividade colagenolítica

A atividade da collagenase foi realizada pelo método de Chavira *et al.*, (1984) modificado, tendo como substrato o Azocoll (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), solubilizado em 950 μL de tampão Tris-HCl, pH 7,0 (0,05 M) e posteriormente centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. Foram realizadas sucessivas lavagens do substrato com o tampão até verificar que o azocoll não estava mais liberando nenhuma cor através da análise espectrofotométrica. A reação consistiu na adição de 50 μL do extrato enzimático e 950 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 ao substrato após as lavagens. A mistura foi incubada em banho-maria por 3 horas a 37°C. Após a incubação as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 2 min (modelo KR-20000T; Kubota Seisakusho, Tóquio, Japão). A absorbância do sobrenadante foi medida a 520 nm por um espectrofotômetro UV-Vis (modelo B582; Micronal, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima, por mililitro, que levou a um aumento de absorbância de 0,1 a 520 nm sendo expressa em U/mL.

Determinação de proteínas totais e biomassa

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método do ácido bicinconínico, usando Pierce™ BCA Protein Assay Kit e albumina de soro bovino como padrão (Smith *et al.*, 1985). A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de albumina de soro bovino (BSA). O volume total dos frascos de fermentação foi filtrado a vácuo através de membranas de nitrocelulose com diâmetro de poro de 0,45 μm para remoção da biomassa e

posteriormente as membranas foram colocadas na estufa de secagem a 80 °C durante 24h.

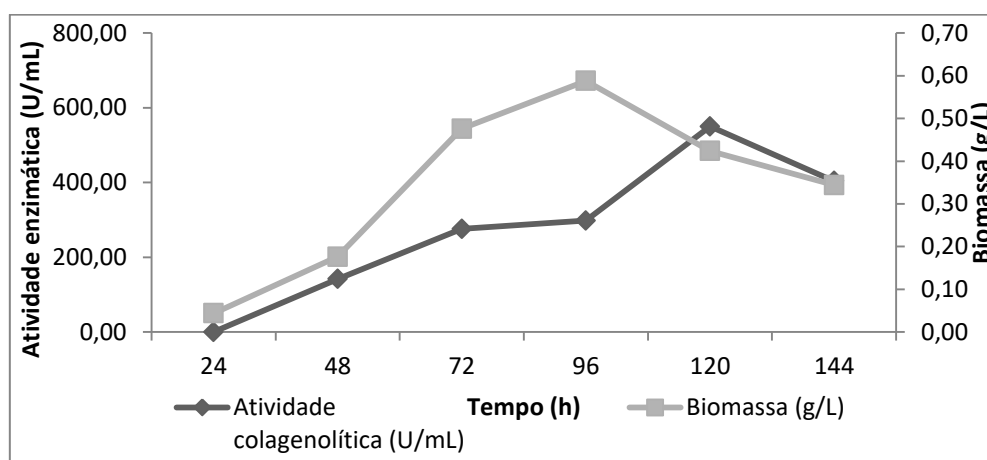
3. Resultados e Discussão

Cinética de produção enzimática

A figura 1 representa os resultados da produção cinética da enzima. Conforme o gráfico, a biossíntese da enzima teve início juntamente com o crescimento do fungo. A produção foi crescente e atingiu o ápice com 120 horas de fermentação onde obtivemos 550 U/mL da enzima colagenolítica com valor de biomassa nesse período de (0,42 g/L), comprovando que a produção de collagenase por *R. microsporus* UCP 1296 ocorreu durante a fase estacionária, indicando que a enzima é um metabólito secundário. Com base nestes resultados, foi estabelecido o tempo de fermentação de 120 horas. A eficácia da produção foi avaliada pela atividade colagenolítica volumétrica devido à relevância industrial deste parâmetro (LIMA *et al.*, 2011).

Ainda em relação à figura 1, após 120 horas, pode-se observar uma diminuição gradativa na biossíntese da enzima, provavelmente devido ao esgotamento de nutrientes para o microrganismo. Segundo Gupta e colaboradores (2004) as proteases geralmente são sintetizadas durante a fase estacionária sendo reguladas pela limitação de nutrientes no meio de cultivo, principalmente as fontes de carbono e nitrogênio. Agrawal *et al.*, (2004) demonstraram em seus experimentos que a atividade da enzima depende especificamente do tipo de microrganismo, composição do meio de cultura e tempo de incubação. Usando um fungo do mesmo gênero, *Rhizopus oryzae*, Benabda *et al.*, (2019), obtiveram melhor produção de protease 2412 U/g, com 120h de fermentação. Merheb *et al.*, (2007), registraram melhor produção da protease por *Thermoascus aurantiacus*, um fungo termófilo no final da fase estacionária. Silva *et al.*, (2017) verificaram 243,0 U/mL de atividade para a produção de collagenase com o *A. tamarii* URM4634.

Figura 1- Curva de crescimento e biomassa produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina



Fonte: a autora

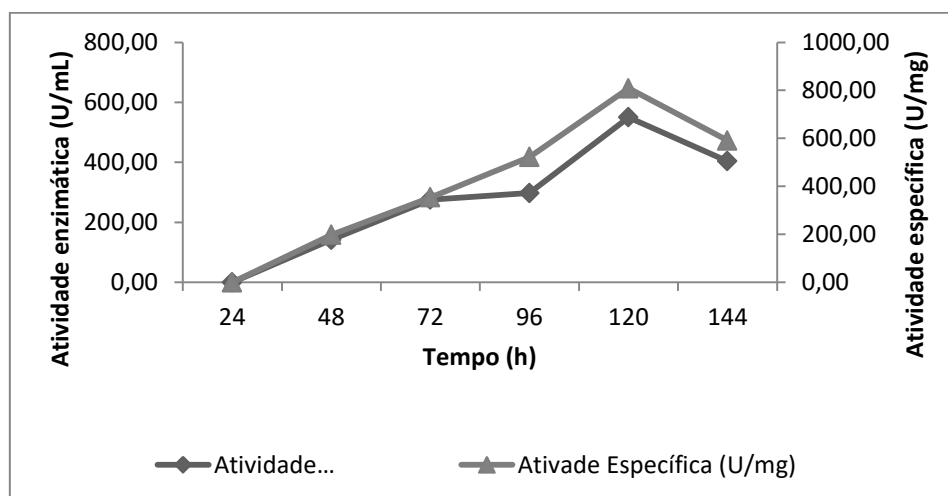
Atividades colagenolítica e específica da colagenase produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina

A maior atividade enzimática colagenolítica foi 550 U/mL, correspondendo a atividade específica de 808,23 U/mg, com tempo de 120 horas à 100 rpm de agitação em condições iniciais de fermentação na concentração de gelatina a 0,75% (p/v), pH 8 e 24 °C (Figura 2). Segundo Daboor *et al.*, (2010) a atividade colagenolítica pode ser descrita como hidrólise do colágeno pela colagenase com liberação de peptídeos ou aminoácidos. Diferentes métodos são descritos na literatura para medir essa atividade: colorimétrica, fluorescência, turbidez e viscosimetria ou radioatividade, entre outros. Todos esses métodos consomem bastante tempo, variando de 3 a 18 horas. No presente estudo, usamos o método colorimétrico que tem como base o Azocoll. O Azocoll é um colágeno impregnado com corante azo, substrato específico da colagenase, pois permite observar a hidrólise por liberação de peptídeos solúveis impregnados com corante que são medidos por espectrofotometria, aumentando a sensibilidade do método (CHAVIRA *et al.*, 1984).

A atividade colagenolítica específica de (808,23 U/mg) por *R. microsporus* UCP 1296 obtido nesse estudo é de grande importância para a ciência pois não foi encontrado na literatura científica relatos da produção de colagenase pelo fungo utilizado nesse experimento, além disso, esse valor é muito maior do que outros resultados publicados para outros microrganismos. Baehaki *et al.*, (2014) conseguiram uma atividade específica de 0,546 U/mg com *Bacillus licheniformis*; Jain e Jain (2010) encontraram 15,66 U/mg de atividade específica por *Streptomyces sp.*, Wu *et al.*, (2010) obtiveram 2,77 U/mg usando *Bacillus pumilus*, Mahmoud *et al.*, (2007), encontraram em seus experimentos atividade específica de 97,12 U/mg com *Aspergillus flavus* e Ok e Hashinaga (1996), 70,4 U/mg com *Zygosaccharomyces rouxii*.

A literatura descreve a importância de definir parâmetros que tenham uma influência significativa na produção de enzimas extracelulares por microrganismos, não apenas a composição do meio de cultura como fonte de carbono, nitrogênio e oligoelementos devem ser considerados, mas também as condições de cultura como pH, temperatura e velocidade de agitação (LIMA *et al.*, 2009).

Figura 2- Atividades colagenolítica e específica da colagenase produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga em meio de cultura de gelatina



Fonte: a autora

Planejamento fatorial para otimização das condições do cultivo

De acordo com os resultados da cinética de produção da enzima colagenolítica, o melhor tempo de fermentação foi estabelecido em 120 horas, possibilitando dessa forma a realização de um planejamento fatorial completo 2^4 , para a otimização das condições do cultivo, para isso foram utilizadas variáveis descritas de acordo com a literatura como importantes para produção da enzima como: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, agitação orbital e concentração do substrato (gelatina). Os resultados dos ensaios foram analisados estatisticamente (ao nível de 95% de confiança) e estão representados na Tabela 2.

Tabela 2- Resultados do planejamento fatorial 2^4 para otimização de parâmetros fermentativos para produção de enzima colagenolítica por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga

ENSAIOS	PARÂMETROS				RESPOSTAS			
	pH	So (% p/v)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Agitação (rpm)	Atividade (U/mL)	Prot. Totais (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Biomassa (g/L)
1	6	0,25	24	100	273,00	0,63	432,35	0,60
2	8	0,25	24	100	528,00	0,93	565,14	0,32
3	6	0,75	24	100	459,00	0,70	655,71	0,92
4	8	0,75	24	100	727,50	0,66	1102,27	0,84
5	6	0,25	32	100	441,00	0,64	686,00	0,32
6	8	0,25	32	100	540,00	0,65	832,60	0,32
7	6	0,75	32	100	487,50	0,52	942,68	0,88
8	8	0,75	32	100	504,00	1,21	415,06	0,76
9	6	0,25	24	200	411,00	0,61	669,07	0,36
10	8	0,25	24	200	226,50	0,66	343,18	0,24
11	6	0,75	24	200	282,00	0,68	416,46	1,08
12	8	0,75	24	200	381,00	0,67	572,32	1,64
13	6	0,25	32	200	294,00	0,42	700,00	0,36
14	8	0,25	32	200	468,00	0,63	747,95	0,36
15	6	0,75	32	200	300,00	0,73	411,76	1,08
16	8	0,75	32	200	559,50	0,61	910,81	1,24
17	7	0,5	28	150	550,00	0,68	808,23	0,42
18	7	0,5	28	150	563,00	0,68	823,10	0,39
19	7	0,5	28	150	548,00	0,68	807,07	0,44
20	7	0,5	28	150	555,00	0,68	814,98	0,38

Fonte: a autora

De acordo com a tabela 2, o ensaio denominado 4, foi o mais relevante pois obteve 727,50 U/mL de atividade colagenolítica e 1102,27 U/mg de atividade específica para a enzima produzida pelo *R. microsporus* UCP 1296 com as seguintes condições: agitação de 100 rpm, temperatura de 24°C, pH= 8,0 e concentração do substrato gelatina de 0,75% (p/v). Com o planejamento fatorial obtivemos um aumento da produção enzimática cerca de 32% em comparação com os resultados preliminares obtidos nas experiências cinéticas. Destacamos dessa forma a importância do planejamento fatorial para favorecer a produção da enzima desejada. O planejamento fatorial é uma estratégia analítica útil e sua principal aplicação reside na triagem das variáveis mais relevantes de um determinado sistema analítico. Na proposição de um planejamento experimental é fundamental que o mesmo seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que o analista deseja. Assim, a atividade mais importante não está na análise de dados, e sim no planejamento dos experimentos em que estes dados devem ser obtidos (MONTGOMERY, 1991; BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995)

Na tabela 3 são observados os efeitos significativos das quatro variáveis estudadas, assim como as interações entre as mesmas. A análise estatística das condições de cultivo mostra que a agitação teve significância estatística no valor de atividade colagenolítica (apontado em destaque na tabela abaixo).

Tabela 3– Interações e efeitos estatisticamente significativos das quatro variáveis estudadas

ANOVA; Var.:Collagenolytic Activity (U/mL); R-sqr=,84088; Adj:,39535 (Planejamento Fatorial 2 ⁴)					
2 ^{**} (4-0) design; MS Residual=9977,66 DV: Collagenolytic Activity (U/mL)					
	SS	df	MS	F	P
(1)pH	60885,6	1	60885,56	6,102189	0,056512
(2)So (% w/v)	16835,1	1	16835,06	1,687276	0,250633
(3)T (°C)	5852,3	1	5852,25	0,586535	0,478338
(4)Agitation (rpm) *	67340,3	1	67340,25	6,749102	0,048372
1 x 2	5625,0	1	5625,00	0,563759	0,486562
1 x 3	770,1	1	770,06	0,077179	0,792279
1 x 4	5292,6	1	5292,56	0,530441	0,499086
2 x 3	5738,1	1	5738,06	0,575091	0,482437
3 x 4	7056,0	1	7056,00	0,707180	0,438736

1*2*3	5402,3	1	5402,25	0,541435	0,494887
1*2*4	11990,2	1	11990,25	1,201710	0,322950
1*3*4	53708,1	1	53708,06	5,382831	0,068046
2*3*4	12488,1	1	12488,06	1,251602	0,314094
Erro	49888,3	5	9977,66		
Total SS	313529,8	19			

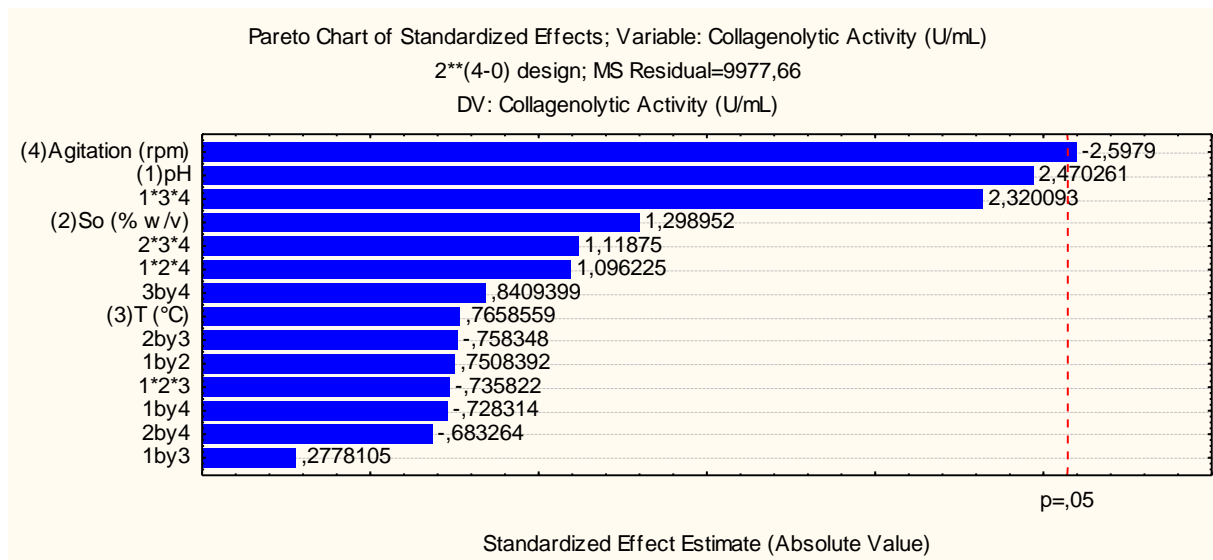
* Significante

Segundo Wanderley e colaboradores (2017) a análise de variáveis que interferem na produção de proteases por microrganismos é extremamente relevante. Por não existir um meio geral de produção, cada microrganismo tem que ser estudado individualmente para a descoberta das melhores condições que levem a uma máxima produção de biomoléculas.

No presente trabalho foram avaliados três valores de agitação orbital 100, 150 e 200 rpm. Os valores obtidos pela análise das variáveis indicam que, em média, foram obtidas atividades mais elevadas quando a variável 4 (agitação) estava em 100 rpm. Segundo Cui *et al.*, (1998), a maior produção enzimática sob condição de agitação pode ser atribuída a transferência de calor e a dispersão de oxigênio de forma homogênea com os componentes do meio de cultura. Para Elibol e Moreira (2005) as enzimas apresentam sensibilidade às forças mecânicas, conseqüentemente agitação elevada pode levar a desnaturação e conseqüentemente perda de sua atividade. El-enshasy, Kleine e Rinas (2006) observaram que um aumento na velocidade de agitação mudou a morfologia do fungo *A. niger*, da forma de *pellet* para a forma de filamentos, e simultaneamente aumentou sua produção de proteínas extracelulares. Azevedo e colaboradores (2018) afirmam que a agitação orbital entre 100-120 rpm foram as mais adequadas na produção de proteases por *Fusarium* INPA 6 e *Aspergillus* INPA 154. De acordo com Pamboukian (2003), para melhor desempenho do processo fermentativo, a condução de estudos de fermentação em *shaker* tem sido importante ferramenta para a otimização das condições para obtenção de vários produtos, incluindo as enzimas.

O gráfico de Pareto abaixo (Figura 3) confirma que o efeito da agitação sobre a atividade colagenolítica foi negativo, ou seja, a menor agitação favoreceu ao aumento da atividade enzimática.

Figura 3- Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações: pH (1), concentração de substrato (2), temperatura (° C) (3) e agitação (rpm) (4)



Fonte: a autora

5. Conclusão

O fungo *R. microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga foi capaz de produzir elevadas concentrações de colagenase extracelular, utilizando apenas gelatina como fonte de carbono e nitrogênio. Foram estabelecidas as melhores condições de produção enzimática tendo o efeito agitação orbital o mais significativo. Diante dos primeiros resultados obtidos, acredita-se que o *R. microsporus* apresenta potencial biotecnológico para produção e aplicação da colagenase, podendo ser empregada futuramente em diversos segmentos, como na indústria têxtil, alimentícia, produção de medicamentos, além da degradação de resíduos da indústria aviária. Dessa forma, espera-se contribuir com a geração de possíveis subprodutos biotecnológicos em diversas áreas.

Referências

Abidi, F.; Aissaoui, N.; Gaudin, JC.; Chobert, JM.; Haertlé, T & Marzouki, MN (2013). Analysis and Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. *Appl Biochem Biotechnol*.

Agrawal, D.; Patidar, P.; Banerjee, T & Patil, S_(2004). Production of alkaline

- protease by *Penicillium sp.* under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochem.** 39, v. 8, p.977-981.
- Azevedo, TOM.; Silva, B.; Lima, ES & Souza, JVB. de (2018). Fungos isolados de amostras de solo da região amazônica, *Aspergillus* INPA 154 e *Fusarium* INPA 6, produzem proteases com potencial para utilização em formulações cosméticas. **Dissertação de mestrado.**
- Baehaki, A.; Sukamo, SD.; Setyahadi, S. & Suhartono, MT. (2014). Production and characterization of collagenolytic protease from *Bacillus licheniformis* F11.4 originated from Indonesia. **Asian J. Chem**, 26 (10): 2861-2864
doi: [10.14233/ajchem.2014.15863](https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.15863)
- Barros Neto, B.; Scarminio, IS & Bruns, RE. (1996). **Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas:** Ed. UNICAMP, 2. ed. 299 p. ISBN: 8526803360
- Benabda, O.; M'hir, S.; Kasmi, M.; Mnif, W & Hamdi, M. (2019). Optimization of Protease and Amylase Production by *Rhizopus oryzae* Cultivated on Bread Waste Using Solid-State Fermentation. **Hindawi Journal of Chemistry**. v. 3, p.1-9. doi: [10.1155/2019/3738181](https://doi.org/10.1155/2019/3738181)
- Bhagwat, P.K. & Dandge, P. B. (2018). Colágeno e proteases colagenolíticas: Uma revisão. *Biocatálise e Biotecnologia Agrícola*. 15 (18), 43-55.
- Chavira, R. J.; Burnett, T. J. & Hageman, J. H. (1984). Assaying proteinases with azocoll. **Anal. Biochem**, v.136, p.4446–4450. doi:10.1016/0003-2697(84)90242-2.
- Cui, Y. Q.; Van der Lans, RGJM & Luyben, K. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 409-419.
- Daboor, S. M.; Budge, S. M.; Ghaly, A. E.; Brooks, S & Dave, D. (2010). Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v.6, n.4, p.239-263.
doi: [10.3844/ajbbbsp.2010.239.263](https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2010.239.263)
- Da Rocha, W. R. V.; Agamez-Montalvo, G. S.; Feitosa, V. A.; Machado, S. E. F.; De Souza Lima, G. M.; Pessoa-Jr, A & Alves, H. S. (2019). Screening and optimizing fermentation production of lasparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1426–1437. doi:10.1111/jam.14221
- EL-Enshasy, H.; Kleine, J & Rinas, U. (2006). Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2103-2112.
doi: [10.1016/j.procbio.2006.05.024](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.024)
- Elibol, M. & Moreira, A. R. (2005). Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Teredinobacter turnirae* under solid

substrate fermentation. *Process biochemistry*. 40 (5), 1951-1956.
doi:[10.1016/j.procbio.2004.07.010](https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.010)

Gao, S.; Hong, H.; Zhang, C.; Wang, K & Zhang, B. (2019). Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide-induced immunosuppression in BALB/c mice. **Journal of Functional Foods**. V. 60 (1). doi: [10.1016/j.jff.2019.103420](https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103420)

Gupta, R.; Gupta, N. & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 64(6):763-81. doi: [10.1007/s00253-004-1568-8](https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8).

Gurumalles, P. Alagu, K.; Ramakrishnan, B & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081).

Graminho, E. R.; Da Silva, R. R.; De Freitas Cabral, T. P.; Arantes, E. C.; Da Rosa, N. G.; Juliano, L.; Okamoto, D. N.; De Oliveira, L. C.; Kondo, M. Y.; Juliano, M. A. & Cabral, H. (2013). Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. **Appl Biochem Biotechnol**, 169(1), P. 201– 214. doi: [10.1007/s12010-012-9974-3](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9974-3).

Hasan, F.; Shah, A. A. & Hammed, A. (2006). Industrial application of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39 (2), p. 235-251.
doi: [10.1016/j.enzmictec.2005.10.016](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Dados gerais do município, 2015. Disponível em: < <http://cod.ibge.gov.br/N1G4> >

Jain, R. & Jain, P. C. (2010). Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. **Indian J. Exp. Biol.**, 48(2), 174–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20455327>

Kermasha, S & Eskin, M. N. Enzymes. *In: KERMASHA, S.; ESKIN, M. N.* (2021). **Enzymes Novel Biotechnological Approaches for the Food Industry**. 1 ed. Cambridge: Academic Press, cap 2, p.15-44.

Kumar & Singh, D. (2014). Global scenario of industrial enzyme market Complimentary Contributor Copy. **Industrial Enzymes**, v. 10, p. 173–196.

Lima, C. A.; Lima Filho, J. L.; Neto, B. B.; Converti, A.; Carneiro-da-Cunha, M. G. & Porto, A. L. F. (2011). Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 16 (3), 549–560.doi:[10.1007/s12257-010-0247](https://doi.org/10.1007/s12257-010-0247)

Lima, C. A.; Rodrigues, P. M. B.; Porto, T. S.; Viana, D. A.; Lima Filho, J. L. & Porto, A. L. F.; Carneiro-da-Cunha, MG. (2009). Production of a collagenase from *Candida albicans* URM 3622. **Biochem Eng J**. v. 43, n.3, p.315–320.
[doi:10.1016/j.bej.2008.10.014](https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.014)

Lima, C. A.; Freitas-Junior, A. C. V.; Lima-Filho, J. L.; Converti, A.; Marques, D. A. V.; Carneiro-da-Cunha, M. G. & Porto, A. L. F. (2013). Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, 75: 64-71. doi:10.1016/j.bej.2013.03.012

Mahmoud, Y. A. G.; Aabu El-Souod, S. M.; El-Shourbagy, S. M. & El-Badry, A. S. M. (2007). Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers. **Ann. Microbiol.**, 57(1), 109– 113. 2007. doi.org/10.1007/BF03175058

Merheb, C. W.; Cabral, H. & Da Silva, R. (2007). Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v.104, p. 127–131. doi: [10.1016/J.FOODCHEM.2006.11.010](https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.11.010)

Montgomery, D. C. (1991). **Design and Analysis of Experiments**. 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., Nova York.

Nigam, P. S. (2013). Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. **Biomolecules**, v. 23;3(3) n. 3, p. 597–611. doi: 10.3390/biom3030597.

Oliveira, V. M.; Assis, C. R. D.; Herculano, P. N.; Cavalcanti, M. T. H.; Bezerra, R. S. & Porto, A. L. F. (2017). Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.43, n.1, p.52-64. doi: [10.20950/1678-2305.2017v43n1p52](https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p52)

Ok, T. & Hashinaga, F. (1996). Detection and production of extracellular collagenolytic enzyme from *Zygosaccharomyces rouxii*. **J. Gen. Appl. Microbiol.**, v. 42, 517–523. doi: 10.2323/jgam.42.517

Pamboukian, C. R. D. (2003). **Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindenses* em processos descontínuos**. (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós Graduação em Engenharia, USP.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M. S. & Deshpande, V. V.(1998). Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v.62, n.3, p.597-635. doi.org/papers2://publication/uuid/E58ABF6D-8C97-4209-810DA452EE30B2CD

Sandhya, C.; Sumantha, A.; Szakacs, G. & Pandey, A. (2005). Comparative evaluation of neural protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochem.**, 40, 2689–2694. doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001

Salomão, E de A. (2020). **Purificação e caracterização bioquímica das amilases produzidas por *Aspergillus sp.* e *Neurospora crassa* exo-1: imobilização da enzima em alginato de sódio**. Ponta Grossa, PR: Atena

Silva, O. S.; Gomes, M. H. G.; Oliveira, R. L.; Porto, A. L. F.; Converti, A. & Porto, T. S. (2017). Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p.168-173.

Silva, I. E. B. da; Jardim, L. A. de S.; Ribeiro, E. M. S.; & Lima, R. L. F. de A. (2020). **Fungolândia**: Jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da caatinga. *Revista Brasileira de Educação Ambiental (REVBEA)*, v. 15, n. 6, p. 52–99. doi: [10.34024/revbea.2020.v15.11449](https://doi.org/10.34024/revbea.2020.v15.11449)

Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J. & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p. 76-85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Sumantha, A.; Deepa, P.; Sandhya, C.; Szakacs, G.; Soccol, C. R. & Pandey, A. (2006). Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Arch Biol Technol.** 49(5):843–851. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132006000600019>

Teruel, S. R. L. T. (1997). Purification and characterization of collagenases from the skeletal muscle of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). [Tese]. McGill University Montreal, Quebec.

Uesugi, Y.; Arima, J.; Usuki, H.; Iwabuchi, M. & Hatanaka, T. (2008). Two bacterial collagenolytic serine proteases have different topological specificities. **Biochimica et Biophysica Acta**,1784: 716-726.

Ventura, M. M.; Freitas, S. M. & Freire, A. P. (2008). Catálise enzimática – alguns destaques na evolução da enzimologia *In*: E. P. S. Bon; M. A. Ferrara; M. L. Corvo. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 1, p. 1- 27.

Wanderley, M. C. de A.; Neto, J. M. W. D.; Lima Filho, J. L. de; Lima, C de A.; Teixeira, J. A. C. & Porto, A. L. F. (2017). Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001>.

Wanderley, M. C. de A.; Neto, J. M. W. D.; Lima, C. D. A.; Silvério, S. I. C.; Teixeira, J. A. & Porto, A. L. F. (2016). Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium sp.* UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 4(4), 1-10. doi: 10.7324/JABB.2016.40401

Watanabe, K. Collagenolytic proteases from bacteria. (2004). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 63, n. 5. p. 520 - 526. doi:[10.1007/s00253-003-1442-0](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1442-0)

Wu, Q.; Li, C.; Chen, H. & Shuliang, L. (2010). Purification and characterization of a novel collagenase from *Bacillus pumilus*. **J. Appl. Biochem. Biotechnol.**, 160 (1), 129–39. doi:10.1007/s12010-009-8673-1

Zimmer, K. R.; Borré, G. L.; Trentin, D. S.; Júnior, C. W.; Frasson, A. P.; Graeff, A. A.; Gomes, P & Macedo, A. J. (2009). Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico, **Revista Liberato**, v.10, n.14, p.123-137.

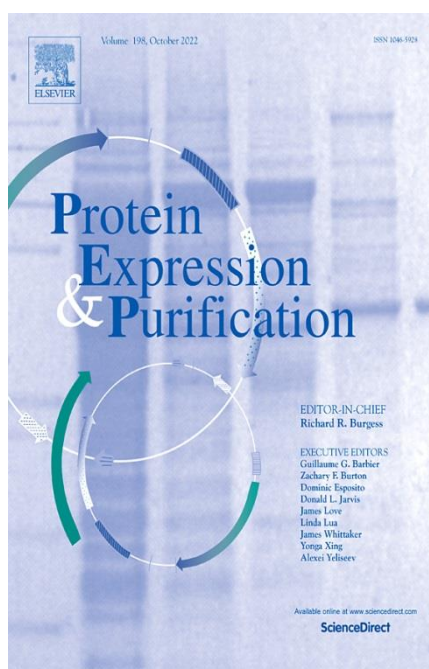
Yazid, N. A. (2017) Proteases from protein-rich waste : Production by SSF, downstream, immobilisation onto nanoparticles and application on protein hydrolysis. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental. **Tese de Doutorado**. 286 p.

CAPÍTULO II

**Recuperação, purificação e caracterização parcial de colagenase de
Rhizopus microsporus UCP 1296 usando um sistema bifásico aquoso
(PEG/Fosfato)**

Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira¹, Maria Carolina de Albuquerque
Wanderley¹, Ana Lucia Figueiredo Porto^{1*}

Artigo a ser submetido à revista: Protein, Expression & Purification - ISSN:
1046-5928



Resumo

Este trabalho objetivou extrair por sistemas de duas fases aquosas (PEG/fosfato) e caracterizar bioquimicamente colagenases extracelulares obtidas por fermentação submersa (FS) pelo fungo *Rhizopus microsporus* UCP 1296. A busca por novas enzimas e processos mais simples são incessantes, pois o mercado mundial de enzimas vem apresentando cada vez mais a necessidade de novos bioprodutos e metodologias que possam produzir, purificar e caracterizar de forma eficaz, rápida e com baixo investimento financeiro. Os fungos filamentosos possuem potencial para a produção de colagenases. Nesta perspectiva, um planejamento experimental 2^4 foi usado, onde variáveis descritas na literatura como importantes para o SDFA foram estudadas. Os melhores resultados a partir do extrato bruto produzido por *R. microsporus* foram obtidos utilizando PEG 8000 a 12,5% (m/m), fosfato a concentração 10,0% (m/m) e pH 8,0 onde foram observados os valores mais elevados da atividade colagenolítica 793 U/mL, rendimento em atividade de 113% e fator de purificação de 62,34%. Os resultados demonstraram que a purificação por SDFA PEG/fosfato foi eficiente para extração de colagenases. Os parâmetros, pH e temperatura ótima, bem como a influência dos inibidores foram determinados para a caracterização da enzima purificada. Neste contexto, o pH 8,0 e temperatura 37 °C foram os melhores. A enzima apresentou parcial inibição ao ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ao ácido iodo acético (IAA). Os resultados sugerem que a enzima produzida apresenta-se como um produto biotecnológico promissor com aplicabilidade em diversas áreas.

Palavras-chave: SDFA; Colagenases; Fungos filamentosos; Biotecnologia enzimática; Inovação

Abstract

This work aimed to extract by systems of two aqueous phases (PEG/phosphate) and biochemically characterize extracellular collagenases obtained by submerged fermentation (SF) by the fungus *Rhizopus microsporus* UCP 1296. The search for new enzymes and simpler processes are incessant, because the world enzyme market has been presenting more and more the need for new bioproducts and methodologies that can produce, purify and characterize effectively, quickly and with low financial investment. The filamentous fungi have potential for the production of collagenases. In this perspective, an experimental planning 2^4 was used, where variables described in the literature as important for Aqueous two-phase systems (ATPS) were studied. The best results from the crude extract produced by *R. microsporus* were obtained using PEG 8000 at 12.5% (m/m), phosphate at concentration 10.0% (m/m) and pH 8.0 where the highest values of collagenolytic activity 793 U/mL, activity yield of 113% and purification factor of 62.34% were observed. The results showed that purification by ATPS-PEG/Phosphate was efficient for extraction of collagenases. The parameters, pH and optimum temperature as well as the influence of inhibitors were determined for the characterization of the purified enzyme. In this context, pH 8.0 and temperature 37 °C were the best. The enzyme showed partial inhibition to ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and iodoacetic acid (IAA). The results suggest that the enzyme produced presents itself as a promising biotechnological product with applicability in several areas.

Keywords: SDFA; Collagenase; Filamentous fungi; enzyme biotechnology; Innovation

1. Introdução

O desenvolvimento de metodologias que favoreçam a purificação e caracterização de um bioproduto de interesse industrial é alvo constante de estudos devido sua importância comercial. As proteases somam cerca de 60% do total de enzimas comercializadas mundialmente (GUPTA *et al.*, 2008). Esses biocatalisadores têm uma grande variedade de aplicações biotecnológicas, principalmente em formulação de detergentes, bebidas e processamento de alimentos, amaciamento de couro, tratamento de águas residuais e formulações médicas (MERHEB *et al.*, 2007).

A purificação de um bioproduto voltado para o mercado industrial deve conter algumas características tais como: robustez, confiabilidade, facilidade no escalonamento do processo e na remoção de impurezas, velocidade de processo, alto rendimento de recuperação e baixo custo (ROSA *et al.*, 2011).

A extração líquido-líquido utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) é um dos processos mais promissores de biosseparação, constituído por duas fases polares imiscíveis, possui composição próxima de 70 a 90% de água, por isso são apropriados para purificação de materiais biológicos, minimizando os riscos de desnaturação das biomoléculas preservando suas principais características. (PANDEY *et al.*, 2006; SILVA; LOH, 2006; MOURA *et al.*, 2010; ROSSO *et al.*, 2012). Diversas linhas de pesquisas são desenvolvidas à procura de novas fontes produtoras de collagenases.

A produção de enzimas por fungos filamentosos compõe um dos cenários mais promissores da biotecnologia quando se tratam de produção, purificação, caracterização e aplicação de biomoléculas. O uso de fungos em bioprocessos tem aumentado demasiadamente em importância devido à produção de várias enzimas com diferentes características físico-químicas e excelente potenciais para a aplicação nos mais diversos setores industriais (PASIN *et al.*, 2019; CRUZ, 2021).

Os fungos filamentosos se destacam na produção de enzimas por fermentação submersa, devido à sua grande facilidade de cultivo, por secretarem suas enzimas diretamente no meio de produção, não sendo necessária, assim, a ruptura celular para sua liberação, facilitando desta forma

também processos de purificação (NASCIMENTO *et al.*, 2014; BATISTA *et al.*, 2020). Segundo Wanderley e colaboradores (2016), muitos microrganismos ainda não foram estudados e utilizados como potenciais produtores de colagenase. Existem poucos relatos sobre a produção, purificação e caracterização de enzimas produzidas por *Rhizopus*.

Neste trabalho utilizamos o extrato bruto contendo enzimas colagenolíticas previamente adquiridas por fermentação submersa, objetivando a purificação por SDFA e a caracterização bioquímica da colagenase produzida por *R. microsporus* UCP 1296, fungo filamentosso proveniente do solo da Caatinga (Pernambuco - Brasil).

Material e Métodos

Microrganismo

O microrganismo utilizado nesse estudo foi o fungo filamentosso proveniente do solo da Caatinga, *Rhizopus microsporus* UCP 1296, cedido pelo Banco de Culturas de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP.

Meios de cultura

A cepa vem sendo mantida no meio ágar extrato de malte contendo: extrato de malte (0,5%), peptona (0,1%), glicose (2%) e ágar 1,5 (%) autoclavado a 121° C por 15min e mantido em estufa a 30°C por 5 dias até esporulação e posteriormente mantido sob refrigeração a 4°C, sendo repicado a cada 30 dias. O meio de cultura utilizado para a produção de enzimas é composto por: gelatina (0,5% p/v), MgSO₄-7H₂O (0,025 p/v), K₂HPO₄ (1,5 p/v), FeSO₄-7H₂O (0,015 p/v), CaCl₂ (0,025 p/v) e solução mineral (1% v/v) (Lima *et al.*, 2011) modificado.

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinconínico - BCA para detectar proteínas em amostras enzimáticas (Smith *et al.*, 1985). A curva de calibração foi obtida a partir de soluções de albumina de soro bovino (BSA).

Determinação da atividade colagenolítica

A atividade da colagenase foi realizada pelo método de Chavira *et al.*, (1984), com algumas modificações, tendo como substrato o Azocoll (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*). Inicialmente foi pesado 3,0 mg/mL de Azocoll, solubilizado em 950 μ L de tampão Tris-HCl, pH 7,0 (0,05 M) e posteriormente centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos. A mistura foi incubada em banho-maria por 2 horas a 37°C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, 4 °C por 20min (modelo KR-20000T; *Kubota Seisakusho*, Tóquio, Japão). A absorbância do sobrenadante foi medida a 520 nm por um espectrofotômetro UV-Vis (modelo B582; Micronal, São Paulo, Brasil). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima, por mililitro, que levou a um aumento de absorbância de 0,1 a 520 nm sendo expressa em U/mL. A atividade específica foi determinada através da razão atividade/proteína e expressa em U/mg.

Sistema duas fases aquosas (SDFA)

Os experimentos foram realizados de acordo com método descrito por Lima *et al.*, (2013). Uma solução tampão de fosfato a 40% (p/p) foi preparada à temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). As quantidades necessárias desta solução foram misturadas com soluções de PEG a 60% (p/p) com as seguintes massas molares: 1500, 4000 e 8000 g/mol. Essas soluções foram então adicionadas a tubos graduados (15 mL). Posteriormente, foi adicionado o extrato bruto enzimático correspondendo a 20% da massa total do sistema juntamente com água suficiente para totalizar um sistema de 10 g. Após agitação por 1min, os sistemas foram deixados em repouso para que as fases fossem separadas por decantação. Em seguida, os volumes das fases foram mensurados e

analisados para a concentração de proteína, atividade proteásica e colagenolítica.

Para evitar qualquer interferência de PEG ou fosfato, todas as amostras foram analisadas contra soluções padrão sem proteína com a mesma composição de fase.

Planejamento Fatorial

Um planejamento fatorial completo 2^4 foi realizado para avaliar as variáveis significativas do processo de purificação assim como os efeitos e interações da massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), pH e concentração de sal de fosfato (C_{PHOS}) para posteriores cálculos sobre as variáveis respostas escolhidas: coeficiente de partição (K), rendimento enzimático (Y) e fator de purificação (PF) nas fases PEG e sal da enzima colagenolítica produzida por *R. microsporus*. O delineamento experimental foi composto de 20 corridas. O ponto central foi executado em quadruplicata, para fornecer uma estimativa do erro puro (Tabela 1). Após a realização dos experimentos, a análise estatística dos resultados foi realizada, com o auxílio do programa Statistica 7.0 (*STATSOFT INC*, 2008). A análise de variância, a partir do qual a significância estatística de todos os efeitos, ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$), foi determinada.

Tabela 01: Níveis dos fatores do Planejamento fatorial completo 2^4 para purificação de proteases por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 por sistema de duas fases aquosas.

VARIÁVEL	NÍVEL		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
PEG massa molar (M_{PEG})	1500	4000	8000
PEG concentração (C_{PEG})	12.5	15.0	17.5
Concentração Fosfato (C_{PHOS})	10.0	12.5	15.0
pH	6.0	7.0	8.0

Fonte: A autora (2022)

Definições das variáveis

O coeficiente de partição da colagenase foi determinado como a razão entre a atividade da biomolécula na fase superior rica em PEG (A_s) e a fase inferior rica em sal (A_i) respectivamente.

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

A recuperação (Y) foi determinada como a atividade total na fase superior ou inferior ($A_{S-I} V_{S-I}$) e a do extrato bruto ($A_{EB} V_{EB}$), expressa em porcentagem (%).

$$Y = \left(\frac{A_{S-I} V_{S-I}}{A_{EB} V_{EB}} \right) \times 100$$

Onde, V_{S-I} e V_{EB} são os volumes da fase superior ou inferior e do extrato bruto, respectivamente.

O fator de purificação (FP) foi definido como a razão entre a atividade específica na fase superior ou inferior (A_{S-I}/C_{S-I}) e seu valor inicial no extrato bruto antes da partição (A_{EB}/C_{EB}):

$$FP = \frac{A_{S-I}/C_{S-I}}{A_{EB}/C_{EB}}$$

Onde, C_{S-I} e C_{EB} são as concentrações totais de proteína (mg/mL) na fase superior ou inferior e no extrato bruto, respectivamente.

Caracterização bioquímica parcial

Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

Para avaliar o efeito do pH na atividade da enzima, uma solução de azocoll à 0,5% (p/v) foi preparada em tampões que variaram o pH entre 3,0 ~ 11,0. Os tampões utilizados foram: citrato (pH 3,0 ~ 6,0) 0,05 M, Tris-HCl (pH 7,0 ~ 9,0) 0,05 M e carbonato-bicarbonato (pH 10,0 ~ 11,0) 0,05 M. O efeito temperatura foi determinado utilizando uma mistura da solução tampão, azocoll e a solução enzimática, incubadas em diferentes temperaturas (de 25 °C a 75 °C), para posterior determinação da atividade enzimática (Nascimento *et al.*, 2017).

Efeito de inibidores enzimáticos

O efeito inibidor da protease foi investigado seguindo os procedimentos do guia de inibidores do fabricante. Os inibidores testados foram: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) para serino proteases, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para as metaloproteases e ácido iodoacético (IAA) para as cisteínoproteases, na concentração de 10 mM. Para a determinação da sensibilidade, a enzima foi pré-incubada durante 30 min a 37 °C com os inibidores. Após, a atividade colagenolítica foi realizada utilizando o método do azocoll. A atividade residual foi determinada como a porcentagem da atividade proteolítica numa amostra controle livre de inibidores.

Resultados e discussão

O modelo estudado apresentou bons resultados para a extração e purificação da colagenase produzida pelo *R. microsporus* UCP 1296 pelo sistema duas fases aquosas como pode ser observado pelos resultados demonstrados na tabela 02 que apresenta a matriz do planejamento e resultados.

As respostas observadas foram: atividades colagenolíticas das fases superior (TP) e inferior (BP), coeficiente de partição (K), rendimento na atividade (Y) e fator de purificação (PF) das fases inferiores.

O coeficiente de partição é um importante parâmetro utilizado para avaliar a separação de biomoléculas em SDFA. Para Babu *et al.*, (2008), o volume ocupado pelo polímero aumenta com o aumento da concentração e da massa molar do próprio polímero que resulta no menor espaço para a biomolécula na fase superior, assim as biomoléculas tendem a particionar para a fase inferior, efeito chamado de volume de exclusão, no entanto, a solubilidade de biomoléculas na fase inferior rica em sal diminui com o aumento da concentração do sal, o que resulta em aumento de partição de biomolécula na fase superior e a esse efeito dá-se o nome de *salting out*.

Nesse estudo, o coeficiente de partição foi inferior a 1 em todas as corridas, indicando que a colagenase extraída pelo SDFA, migrou para a fase inferior (BP) ou fase sal em todos os ensaios, usando, PEG 8000 g/mol a 12,5% (p/p) de concentração, pH 8,0 e concentração de fosfato a 10% (p/p)

ou seja, no ensaio do planejamento com os melhores resultados, a massa molar do PEG foi a maior, porém a concentração foi a menor, não ocorrendo porém o efeito de exclusão. Em relação ao fosfato, 10% (p/p), essa concentração foi a menor para o estudo, excluindo também a possibilidade do efeito *salting out*.

Diante dos dados obtidos a collagenase produzida pelo *R. microsporus*, migrou para fase sal por afinidade, o que demonstra maior confiança e robustez nos resultados da purificação. Rodríguez-Durán (2013) e colaboradores verificaram na purificação da tanase produzida pelo *A. niger* coeficientes de partição muito baixos em sistemas contendo PEG 6000 ou superior.

Barros *et al.*, (2011) obtiveram os melhores resultados da purificação da collagenase produzida por *Streptomyces sp.* DPUA 1559, na fase sal, utilizando também 12,5% (m/m) de PEG 8000 e concentração de fosfato a 10,0% (m/m). Babu *et al.*, (2008) na purificação da polifenoloxidase e Siqueira *et al.*, (2013) na purificação da pectinase produzida pelo *Aspergillus phoenicis* URM 4924, por SFA encontraram uma maior atividade enzimática na fase sal.

Wanderley *et al.*, (2017), identificaram altos valores da atividade collagenolítica (797 e 812 U/mL) na fase inferior pela collagenase produzida por *Penicillium sp.* UCP 1286. Resultados, portanto, similares ao encontrado neste estudo.

A análise estatística (Tabela 03) com relação à atividade enzimática mostrou que a massa molar do PEG (MPEG (g/mol)) (1) e a interação entre esse fator e a concentração de fosfato (C Fosfato (%m/m)) (4), (1x4) foram significativos, indicando que a maior massa molar (8000 g/mol) e a menor concentração do fosfato (10 m/m) favoreceram a uma maior atividade enzimática, 793 U/mL, o que pode ser confirmado no gráfico de Pareto abaixo (Figura 01).

A presença dessa elevada atividade na fase inferior demonstra que tal fase é a que mantém a maior concentração de todas as collagenases do complexo.

Tabela 02: Planejamento experimental fatorial completo 2⁴ e resultados da purificação de proteases de *R. microsporus* UCP 1296 pelo sistema duas fases aquosas (SFA), PEG/fosfato

Ensaio	M _{PEGa}	C _{PEGb}	pH ^c	C fos ^d	At. Enz TP ^e	At. Enz BP ^f	K ^g	Y _{BP} ^h	FP _{BP} ⁱ
1	1500	12,5	6	10	36,5	369,5	0,1	53	20,87
2	8000	12,5	6	10	23	510	0,05	73	24
3	1500	17,5	6	10	105,5	389	0,27	56	9
4	8000	17,5	6	10	21	540	0,04	77	37,28
5	1500	12,5	8	10	62,5	362	0,17	52	9,77
6	8000	12,5	8	10	41	793	0,05	113	62,34
7	1500	17,5	8	10	62,5	460,5	0,14	66	16,09
8	8000	17,5	8	10	424	589	0,72	84	16,31
9	1500	12,5	6	15	14	460	0,03	66	21,35
10	8000	12,5	6	15	20	539	0,04	77	27,66
11	1500	17,5	6	15	86	453	0,19	65	18,28
12	8000	17,5	6	15	86	501	0,17	72	36,44
13	1500	12,5	8	15	111	457	0,24	65	13,97
14	8000	12,5	8	15	117	421	0,28	60	28,49
15	1500	17,5	8	15	55	501	0,11	72	13,33
16	8000	17,5	8	15	349	371	0,94	53	31,73
17	4000	15	7	12,5	20	527	0,04	75	43,97
18	4000	15	7	12,5	15	538	0,03	77	44,89
19	4000	15	7	12,5	21	549	0,04	78	42,67
20	4000	15	7	12,5	18	543	0,03	78	43,19

Fonte: A autora (2022)

Onde: a- Massa molar do PEG (g/mol); b- Concentração do PEG (% m/m); c- pH; d- Concentração de fosfato (% m/m); e- Atividade enzimática U/mL, fase superior- (TP- Top phase); f- Atividade enzimática U/mL, fase inferior- (BP- Bottom phase) g- Coeficiente de partição (K); h- Rendimento da atividade (Y) na fase inferior (BP) (%); i- Fator de purificação (FP) na fase inferior (BP).

Tabela 03: Efeitos estatísticos referentes à atividade colagenolítica na fase inferior (BP) do sistema duas fases aquosas PEG/Fosfato realizadas de acordo com o delineamento experimental 2⁴ da Tabela 02.

Var.: Ativ. Enz BP (U/mL); R-sqr=71444; Adj:39714 (Planej SFA R. microsporus UCP 1296) 2^{**}(4-0) design; MS Residual=5746,36 DV: Ativ. Enz BP (U/mL)

Variável /Interação	Effect	Std.Err	t(9)	p	-95,%	+95,%	Coeff. t	Std.Err	-95,%	+95,%
Mean/Interc	495	16,9	29,2	0,00	457,4	534	496	16,9	457,4	534,2
(1)MPEG (g/mol)	95,2	37,7	2,5	0,03	9,93	180	47,6	18,8	4,96	90,2

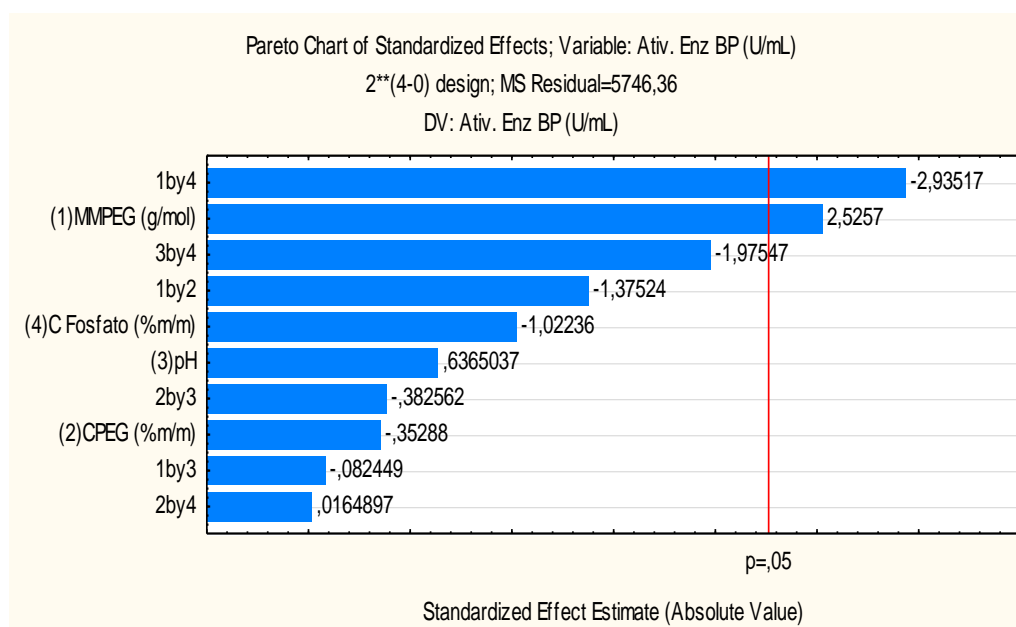
(2)CPEG (%m/m)	-13	37,9	-0,35	0,73	-99,1	72,3	-6,68	18,9	-49,5	36,1
(3)pH	24,1	37,9	0,63	0,54	-61,6	110	12,0	18,9	-30,8	54,9
(4)C Fos (%m/m)	-39	37,9	-1,02	0,33	-124	46,9	-19,4	18,9	-62,2	23,4
1x2	-52	37,9	-1,37	0,20	-138	33,6	-26,0	18,9	-68,9	16,8
1x3	-3,1	37,9	-0,08	0,93	-88,8	82,6	-1,56	18,9	-44,4	41,3
1x4	-11	37,9	-2,93	0,01	-197	-25,5	-55,6	18,9	-98,4	-12,7
2x3	-14	37,9	-0,38	0,71	-100	71,2	-7,20	18,9	-50,1	35,6
2x4	0,62	37,9	0,01	0,98	-85,1	86,4	0,312	18,9	-42,5	43,1
3x4	-75	37,9	-1,97	0,07	-160	10,8	-37,4	18,9	-80,3	5,4

Onde: (1) MPEG (g/mol); (2) CPEG (%m/m); (3) pH; (4) C Fosfato (%m/m)

Fonte: a autora (2022)

Figura 01- Gráfico Pareto referente à atividade colagenolítica na fase inferior (BP) do S DFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 da

Tabela 02



Fonte: a autora, 2022

Efeitos na Recuperação da Atividade da enzima (Y)

Assim como o coeficiente de partição e atividade colagenolítica, a recuperação da atividade (Y) da protease na fase sal (BP) teve efeito significativo positivo para concentração a massa molar do PEG, e para a interação entre CFOSFATO e MPEG (1*4) efeito negativo, como é possível observar pelos ensaios 6 e 8 (10% m/m de fosfato, massa molar do PEG 8000g/mol) que apresentaram recuperação na atividade da protease de 113%

e 84% respectivamente, valores esses que demonstraram um alto rendimento da atividade enzimática após a extração e remoção de possíveis inibidores. Podendo esse efeito ser observado na tabela (4) e também demonstrados através do gráfico de Pareto (Figura 2).

Wanderley *et al.*, (2017) também conseguiram maiores rendimentos enzimáticos com menores concentrações do sal fosfato, 12,5% (p/p), assim como Lima e colaboradores (2013) utilizando o S DFA PEG/fosfato apresentaram rendimento de 61,68%, utilizando PEG 8000 (g/mol) e fosfato com à concentração de 15% (p/p).

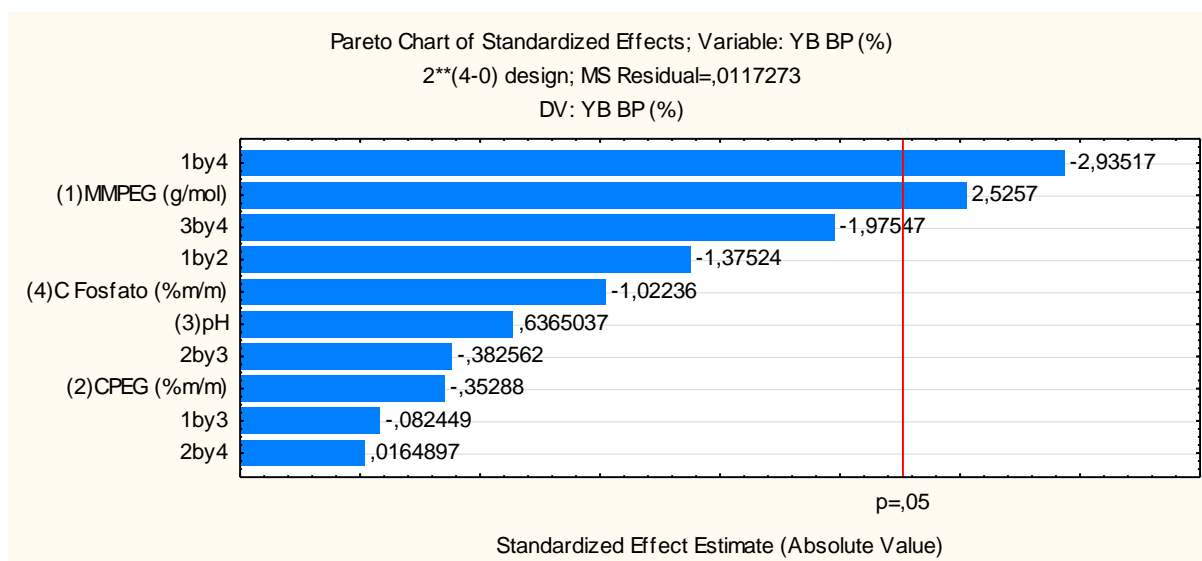
Tabela 4– Análises estatísticas em relação a variável rendimento da purificação do S DFA na BP

Effect Estimates; Var.:YB BP (%); R-sqr=,71444; Adj.,39714 (Planej S DFA Rhizopus) 2**(4-0) design; MS Residual=,0117273 DV: YB BP (%)										
Variável ou interação	Effect	Std.Err.	t(9)	P	-95,00%	95,00%	Coeff.	Std.Err.	-95,00%	95,00%
Mean/Interc. *	0,70	0,02	29,20	0,00	0,65	0,76	0,71	0,02	0,65	0,76
(1)MPEG (g/mol) *	0,13	0,05	2,52	0,03	0,01	0,26	0,07	0,03	0,01	0,13
(2)CPEG (%m/m)	-0,01	0,05	-0,30	0,73	-0,14	0,10	-0,01	0,03	-0,07	0,05
(3)pH	0,03	0,05	0,63	0,54	-0,08	0,16	0,02	0,03	-0,04	0,08
(4)C Fosfato (%m/m)	-0,05	0,05	-1,00	0,33	-0,18	0,07	-0,03	0,03	-0,09	0,03
1x2	-0,07	0,05	-1,30	0,20	-0,20	0,05	-0,04	0,03	-0,10	0,02
1x3	0,00	0,05	-0,08	0,94	-0,13	0,12	0,00	0,03	-0,06	0,06
1x4 *	-0,16	0,05	-2,94	0,02	-0,28	-0,04	-0,08	0,03	-0,14	-0,02
2x3	-0,02	0,05	-0,38	0,71	-0,14	0,10	-0,01	0,03	-0,07	0,05
2x4	0,00	0,05	0,02	0,99	-0,12	0,12	0,00	0,03	-0,06	0,06
3x4	-0,11	0,05	-1,98	0,08	-0,23	0,02	-0,05	0,03	-0,11	0,01

*Significante

Fonte: A autora (2022)

Figura 02– Gráfico Pareto referente à variável rendimento da purificação na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 da Tabela 02

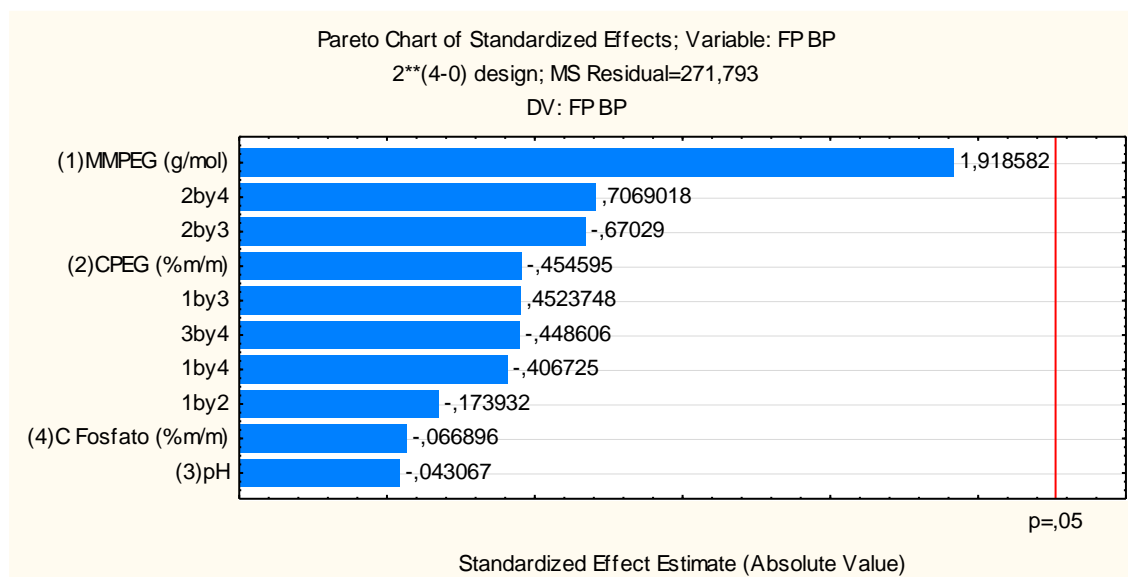


Fonte: a autora, 2022

Efeitos no fator de purificação (FP)

A razão entre a atividade específica da fase inferior e a atividade específica do extrato bruto define o fator de purificação (FP) proporcionado pelo SDFA, por esse motivo essa variável tem imensa importância em estudos de purificação de enzimas visando principalmente à possibilidade de aplicação em indústrias. Como pode ser observado na tabela (2), obtivemos nesse estudo um fator máximo de purificação de 62,34%, no ensaio 6. No entanto, os resultados não foram significativos, como mostra o gráfico de Pareto abaixo (Figura 3).

Figura 03– Gráfico Pareto em relação a variável fator de purificação na fase inferior (BP) do SDFA realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^4 da Tabela 2



Fonte: a autora, 2022

Entretanto, com base no rendimento e na atividade colagenolítica, foi escolhido o ensaio de número 6 para dar continuidade aos experimentos, com as seguintes características: M_{PEG} (g/mol) = 8000, C_{PEG} (%m/m) = 12,5, pH do tampão fosfato = 8 e C_{FOS} (%m/m) = 10.

Caracterização bioquímica

Os parâmetros, pH e temperatura ótima, bem como a influência dos inibidores foram determinados para a caracterização da enzima purificada.

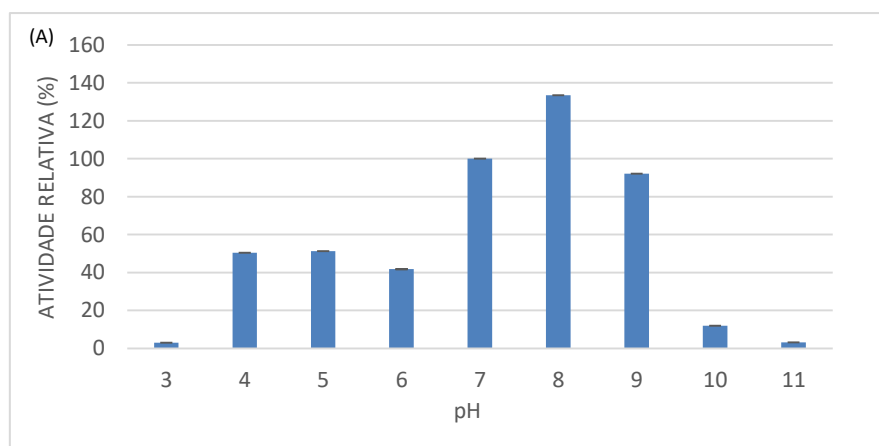
A caracterização enzimática se faz necessário para conhecer as particularidades dos catalisadores como a termo estabilidade e variações ao pH, atrelando-se as condições ideais para uma atividade catalítica.

Conhecer bioquimicamente a enzima viabiliza o emprego da mesma em reações industriais que necessitam de produção e duração em larga escala em razão do tempo (HAKI, 2003; NIGAM, 2013). Neste contexto, a enzima foco do estudo, mostrou-se muito ativa entre pH 7,0 ~ 9,0 tendo pH 8,0 como ótimo, porém abaixo do pH 4,0 ou acima do pH 9,0 a sua atividade diminuiu bruscamente como pode ser observado na figura 04. Portanto a enzima foi

caracterizada como alcalina, uma vez que manteve os melhores resultados para a atividade relativa na faixa alcalina.

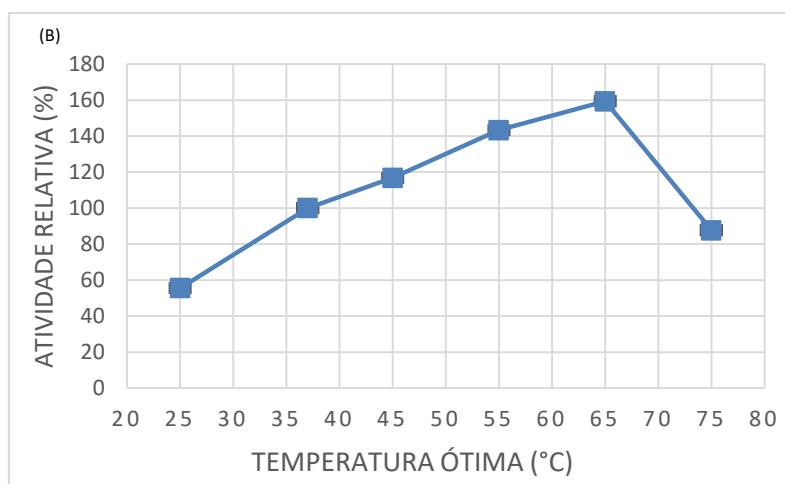
Cardoso e colaboradores (2022) também obtiveram os melhores resultados em atividades com pH alcalino (pH 8 e 9) para proteases produzidas por *A. ochraceus* URM604, assim como Amaral *et al.*, (2020), melhor atividade na faixa de pH 8~10 para a enzima produzida por *A. tamarii* Kita UCP1279. Resultados semelhantes foram relatados para proteases alcalinas de *Aspergillus niger* (pH 8,0), Davi, (2008), da Silva *et al.*, (2018) *Aspergillus tamarii* URM4634, os quais apresentaram estabilidade ao pH na faixa de (6,0-12,0), corroborando com os dados desse trabalho.

Figura 04 – Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade da protease de *R. microsporus* UCP 1296 no SDFA composto por PEG massa molar 8000 g/mol, pH 8, concentração de fosfato 10% e concentração de PEG 12,5%



Fonte: a autora, 2022

A enzima colagenolítica apresenta-se como termoestável em temperaturas elevadas em relação à atividade relativa, onde também foi verificado que abaixo de 37°C e acima de 65 °C, a atividade enzimática diminui gradativamente como pode ser observado na figura 5, podendo essa característica ter haver com necessidades adaptativas do microrganismo frente às condições climáticas do Bioma Caatinga em especial ao solo onde o fungo foi retirado. As mesmas condições foram identificadas para termo estabilidade enzimática em temperaturas elevadas, tendo como a temperatura ótima 60 °C para enzimas do *R. oryzae* que possui o mesmo gênero do fungo estudado (Kumar *et al.*, 2005).



Fonte: a autora, 2022

A avaliação do efeito dos inibidores sobre a enzima colagenolítica extraída mostrou que após 30 min de incubação a 37°C na presença de 10 mM de IAA foi mantida uma atividade residual de 77,72% e 67,22% pelo EDTA e que houve inibição ao PMSF. Desta forma, considerando a parcial inibição pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e pelo ácido iodo acético (IAA), a enzima parece ter porções de metalo e cisteíno proteases.

De acordo com Patel (2017), os inibidores de proteases podem ser agrupados fundamentando-se nos mecanismos de reação envolvidos, a origem dos mesmos e por semelhanças na estrutura. Tem grupos que reagem com mais de uma protease, tem outros que interagem quimicamente com uma dada classe e, ainda, outros inibidores que apresentam alta afinidade por uma protease específica. Kumar *et al.*, (2005) também tiveram a enzima colagenolítica produzida pelo *R. oryzae* parcialmente inibida pelo IAA. Amaral *et al.*, (2020), Obtiveram 28,86% de inibição por PMSF da atividade colagenolítica da enzima produzida por *A. tamarii* Kita UCP1279 e 16.60% de inibição por EDTA para *A. tamarii*.

Conclusões

A técnica de purificação via sistema duas fases aquosas (SDFA) foi eficaz para a partição e extração da colagenase produzida por *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga.

A melhor condição foi encontrada a 10% de concentração de fosfato, 12,5% de concentração de PEG, PEG 8000 g/mol e pH 8,0. Esta condição

mostrou atividade enzimática de 793U/mL, 113% de rendimento e partição total para a fase rica em sal (K 0,05) e 62,34 de fator de purificação.

A enzima colagenolítica apresenta-se como termoestável em temperaturas elevadas em relação à atividade relativa e mostrou-se muito ativa entre pH 7,0 - 9,0 tendo pH 8,0 como ótimo. Sugeriu ter porções de metalo e cisteíno proteases por inibição do EDTA E IAA, características de interesse para diversos processos industriais.

Portanto o S DFA apresenta-se como um método promissor no desenvolvimento de bioprocessos principalmente por ser elaborado de forma rápida, eficiente e com baixo custo para purificação de biomoléculas. Dessa forma, foi possível estudar as propriedades dessa nova enzima com grande potencial em aplicações biotecnológicas.

.

Referências

AMARAL, Y. M. S.; da SILVA, O. S.; de OLIVEIRA, R. L. & PORTO, T. S. Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 50(6), 619–626, 2020. doi:10.1080/10826068.2020.1721535

BABU, B.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, 47, 83-89, 2008.

BARROS, M. C. DA S.; DA SILVA, M. F.; LIMA FILHO, J. L. de. *et al.*, Extração de colagenases de *streptomyces sp.* DPUA 1559 utilizando o sistema duas fases aquosas peg-fosfato. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2011.

BATISTA, J. M. S. *et al.*, Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, 2020.

CARDOSO, K. B. B.; NASCIMENTO, T. P.; OLIVEIRA, V. DE M. *et al.*, Protease with fibrinolytic and collagenolytic activity produced by *Aspergillus ochraceus* URM604. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e15511225500, (CC BY 4.0), 2022. | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25500>

CHAVIRA, R.J.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN J.H. Assaying proteinases with azocoll. **Anal. Biochem**, v.136, p.4446–4450, 1984.

- CRUZ, A. V. A. Processos de “downstream” aplicados na conversão de materiais lignocelulósicos. **Monografia** (Engenharia Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 65 f. 2021.
- DEVI, M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents, **Indian J.1**, 1– 6. 2008.
- DA SILVA, O. S.; DE ALMEIDA, E. M.; DE MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. Purification and Characterization of a Novel Extracellular Serine-Protease with Collagenolytic Activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. **Int. J. Biol. Macromol.** 117, 1081–1088, 2018.
- GUPTA, A. *et al.*, Production and characterization of α -amylase from *Aspergillus niger*. **Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 551-556, 2008
- HAKI, G. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, ago. 2003.
- KUMAR, S. *et al.*, Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.
- LIMA, C. A.; FILHO, J. L. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CARNEIRO DA CUNHA, M. G. & PORTO, A. L. F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 16(3), 549–560. 2011.
- LIMA, C. A. *et al.*, Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 64– 71. 2013.
- MAYERHOFF, Z., ROBERTO, I and FRANCO, T. Purification of xylose reductase from *Cândida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical engineering journal**, v.18, p. 217-223, 2004.
- MERHEB C. W. *et al.*, Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v.104, p. 127–131, 2007.
- MOURA, R. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T S.; CAVADA, B. S.; NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F. Partição da lectina de *Canavalia grandiflora Benth* (ConGf) em sistema de duas fases aquosas usando PEG/fosfato. In: X Jornada de ensino, pesquisa e extensão (JEPEX 2010), UFRPE: Recife. Anais do X Jornada de ensino, pesquisa e extensão, 2010.
- NASCIMENTO, K. B. M.; MARTINS, A. G. R.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A.; OKADA, K. Utilização de resíduos agroindustriais para produção de tanase por *Aspergillus sp.* isolado do solo da caatinga de Pernambuco, Brasil. **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7 n. 1, p. 95-103. Editora UniBH, 2014.

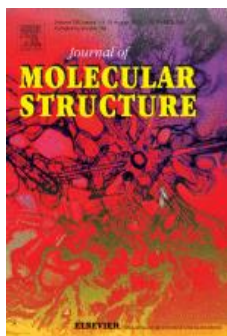
- NASCIMENTO, T. P. et al. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(8), 1209–1219, 2017.
- NIGAM, P. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules*, v. 3, n. 3, p. 597–611, 23 ago. 2013.
- PANDEY, A. et al., **Enzyme Technology**. 1st. ed. [s.l.] Springer, 2006.
- PASIN, T. M. et al., Novel amylase-producing fungus hydrolyzing wheat and brewing residues, *Aspergillus carbonarius*, discovered in tropical forest remnant. *Folia Microbiologica*, v. 65, n. 1, p. 173–184, 2019.
- PATEL, S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergologia et Immunopathologia*, Madri, 2017.
- RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V.; SPELZINI, D.; BOERIS, V.; CRISTÓBAL N.; AGUILAR, G. Partition in aqueous two-phase system: Its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 392-397, 2013.
- ROSA, P. A. J. et al., Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 559–567, 2011.
- 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.
- SILVA, L. H. M.; LOH, W. **Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas**. *Quim. Nova*, v. 29, n. 6, p. 1345-1351, 2006.
- SIQUEIRA, J. G. W.; GOMES, S. C. M.; SANTOS, R. K. S.; SILVA, J. C.; DIAS, J. L.; PORTO, T. S. Purificação de pectinases de *Aspergillus phoenicis* URM4924 por sistemas de duas fases aquosas e aplicação na clarificação de suco de maçã. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX – UFRPE: Recife, 2013.
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p. 76-85. 1985
- STATSOFT. **Statistica**: data analysis software system. Tulsa: StatSoft, 2010.
- WANDERLEY, M. C. de A., NETO, J. M. W. D., LIMA, C. D. A., SILVÉRIO, S. I. C., TEIXEIRA, J. A. AND PORTO, A. L. Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium sp.* UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 4(4), 1-10, 2016.

WANDERLEY, M. C. de A.; NETO, J. M. W. D.; FILHO, J. L. de L.; LIMA, C. de A.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

CAPÍTULO III**EXTRAÇÃO DE COLÁGENO PROVENIENTE DE SUB-PRODUTOS DA
INDÚSTRIA AVÍCOLA E CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FT-
IR PARA OBTENÇÃO DE PEPTÍDEOS BIOATIVOS**

Isabele Albuquerque Alcoforado Ferreira¹, Maria Carolina de Albuquerque
Wanderley¹, Ana Lucia Figueiredo Porto^{1*}

Artigo a ser submetido à revista: Journal of Molecular Structure - ISSN: **222860**



RESUMO

Pernambuco é um dos maiores produtores de aves da Região Nordeste. Concomitante a produção está à geração de resíduos, muitas vezes rejeitados inadequadamente e acarretando agravos ambientais. O reaproveitamento desses resíduos tem sido motivo de preocupação constante. Produtos de inovação tecnológica podem ser desenvolvidos à medida que possam contribuir para a redução e/ou reutilização desses despejos, tornando o processo uma atividade ecosustentável, e que viabilize a diminuição de custos, como forma de agregar valor e alicerçar a produtividade. A carne de aves, além de apresentar elevada qualidade nutricional, é uma excelente fonte de hidrolisados proteicos e peptídeos bioativos. Nesse sentido, os resíduos da indústria aviária apresentam-se como alternativa para obtenção de matérias-primas de interesse biotecnológico, como o colágeno. O colágeno é uma proteína fibrosa e estrutural, que tem sido explorada nos últimos 15 anos, graças a fontes alternativas e novas funcionalidades. A produção de peptídeos de colágeno com atividade biológica tem se mostrado eficaz no tratamento de várias doenças, como artrite, osteoporose e infecções por algumas bactérias. Dessa maneira, a busca por novas aplicações médicas, farmacêuticas e alimentícias desses peptídeos têm sido incentivadas, para que possam ser desenvolvidos novos produtos de valor agregado a partir de resíduos da indústria aviária. Assim, essa pesquisa propõe a reutilização de resíduos sólidos de aves como fonte potencial de biomoléculas para fornecer um produto novo e aplicável em diferentes segmentos industriais, contribuindo para com a consolidação e o fortalecimento da área da biotecnologia em Pernambuco.

Palavras-chave: Biotecnologia; Colágeno; Peptídeos de colágeno.

ABSTRACT

Pernambuco is one of the largest poultry producers in the Northeast Region. Concomitant to the production is the generation of waste, often inappropriately rejected and causing environmental damage. The reuse of these wastes has been a constant concern. Technological innovation products can be developed to the extent that they can contribute to the reduction and/or reuse of these wastes, making the process an eco-sustainable activity, and which makes it possible to reduce costs, as a way of adding value and underpinning productivity. Poultry meat, in addition to presenting high nutritional quality, is an excellent source of protein hydrolysates and bioactive peptides. In this sense, waste from the avian industry is an alternative for obtaining raw materials of biotechnological interest, such as collagen. Collagen is a fibrous, structural protein that has been explored for the past 15 years, thanks to alternative sources and new features. The production of collagen peptides with biological activity has been shown to be effective in the treatment of various diseases, such as arthritis, osteoporosis and infections caused by some bacteria. In this way, the search for new medical, pharmaceutical and food applications of these peptides has been encouraged, so that new value-added products can be developed from waste from the avian industry. Thus, this project proposes the reuse of solid waste as a potential source of biomolecules to provide a new product applicable in different industrial segments, contributing to the consolidation and strengthening of the Biotechnology area in Pernambuco.

Keywords: Biotechnology; Collagen; Collagen peptides.

INTRODUÇÃO

As indústrias de processamento de alimentos, especialmente as das aves, geram uma variedade de subprodutos, muitos dos quais são descartes devido baixo interesse comercial, que não possuem tratamento adequado e acabam sendo negligenciados no ambiente, sendo motivo de preocupação da sociedade e pauta em discussões para formação de planos de gestão ambiental (DHAKAL et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). Com relação ao mercado de aves, o Brasil tem se destacado, a nível mundial, como um dos principais fornecedores de carne de frango.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018), o Brasil, no ranking mundial, encontra-se em segundo lugar na produção e em primeiro lugar na exportação de carne de frango. O despejo em não conformidade com a legislação e boas práticas de resíduos sólidos causa alterações negativas no solo, na água e no ar. (MOR; KHAIWAL, 2018; PEREZ-SAEZ et al., 2017). A adoção de técnicas de inovações ambientais precisa estar associada à resolução de problemas que envolvem o descarte ambientalmente inadequado de resíduos sólidos, além de buscarem aumentar a eficiência dos processos produtivos, para diminuição da geração desses materiais (OYAKE-OMBIS; VANVLIET; MOL, 2015).

A biotecnologia ambiental como forma de inovação é aplicada no intuito de recuperação e de valorização dos resíduos sólidos, sendo de suma relevância para a diminuição da extração dos recursos naturais, devido à incorporação das matérias-primas de valor econômico até então inexplorado (CORTEZ *et al.*, 2017). Os resíduos agroindustriais, ou agro-resíduos, são fontes potenciais como matéria-prima para fornecimento de moléculas de alto valor biológico, como proteínas, peptídeos, polissacarídeos, amido, gordura e várias outras moléculas bioativas, tais como minerais, vitaminas e nutrientes (DHAKAL *et al.*, 2018).

Os subprodutos de aves foram relatados como ricos em proteínas, como penas de frango, sangue, cabeças e pés. Sendo rico em colágeno, os pés de galinha são usados principalmente em ração animal e produtos de carne de baixo custo. Os valores econômicos dos pés de galinha são aumentados pela extração e caracterização do colágeno.

O colágeno pode ser definido como uma glicoproteína da matriz extracelular, composta de três cadeias polipeptídicas (denominadas cadeias ∞) enroladas em uma configuração helicoidal (ROSS & PAWLINA, 2017). Foram relatados pelo menos 29 tipos diferentes de colágeno, que são classificados de acordo com sua estrutura em: estriado (fibroso), não fibroso (formador de rede), microfibrilar (filamentoso) e associado às fibrilas (DAMODARAN *et al.*, 2010).

As fibras colágenas foram assim denominadas porque da sua cocção foi obtida uma gelatina usada como cola (do grego *kolla*, cola; *gennaein*, gerar), são constituídas pelo primeiro colágeno identificado: o colágeno do tipo I. (GENESER *et al.*, 2015). Segundo Franzen e colaboradores, (2013) o colágeno do tipo I é o mais abundante constituindo cerca de 80% do colágeno do organismo. É o tipo de colágeno mais desejado pelas indústrias devido às suas propriedades físico-químicas e mecânicas, tornando-se alvo para a produção de biomateriais (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Essa proteína, bem como seus hidrolisados associados, possuem características desejáveis como exemplo a baixa periculosidade para a saúde humana, capacidade de retenção de água em escala molecular, são nutrientes biológicos essenciais e podem atuar como partículas transportadoras (MORIMURA *et al.*, 2002). Outras características importantes são alta similaridade da sequência de aminoácidos entre as diversas espécies, sua estabilidade conformacional, abundância na matriz extracelular e sua capacidade de suportar a adesão e proliferação celular (CAMPOS, 2008).

A utilização do colágeno e seus peptídeos como biomateriais, bem como suas aplicações comerciais, têm aumentado cada vez mais. Produtos naturais com múltiplas funções, como o colágeno e seus peptídeos, atraem interesse e necessidade de estudos voltados a seus desenvolvimentos (WATANABE, 2004). Recentes avanços tecnológicos criaram grande interesse no uso de peptídeos de fontes alternativas que possuem atividades biológicas importantes como ações antioxidantes, anti-hipertensivas, antimicrobianas e promotoras da digestão para um efeito neuroprotetor, incluindo baixa toxicidade e alta especificidade, tornam essas moléculas de particular interesse para as indústrias de medicamentos (DE CASTRO; SATO, 2015).

Nessa pesquisa foi extraído colágeno obtido de resíduos agroindustriais de fonte aviária com o objetivo na obtenção de peptídeos bioativos do colágeno através da hidrólise enzimática.

METODOLOGIA

Obtenção dos Subprodutos

Os resíduos sólidos do manejo avícola foram obtidos de granjas localizadas na região metropolitana do Recife para aproveitamento biotecnológico onde foram adquiridos pés de galinha. Após a obtenção destes resíduos, os mesmos foram cortados em pedaços de aproximadamente 5 cm e estes foram armazenados em freezer para serem posteriormente utilizados na etapa de extração do colágeno.

Extração do colágeno

O colágeno utilizado foi extraído dos resíduos obtidos no item anterior de acordo com metodologia de Saiga *et al.*, (2006) adaptada. Onde, foi utilizado um quilograma de resíduo que será colocado a 100 °C, em 1,5 L de solução aquosa, por 2 horas. Após a fervura, o sobrenadante foi filtrado e centrifugado a 1000 rpm para remoção do precipitado e em seguida foi novamente filtrado, feito isso o extrato obtido nesta etapa foi levado freezer para ser congelado e em seguida liofilizado.

Caracterização do colágeno

FTIR (Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier)

Com a finalidade de avaliar a estrutura molecular do colágeno isolado, foram realizadas análises utilizando um Espectrômetro FT-IR Vertex 70 - Bruker, através do método pastilha de KBr, os espectros resultantes foram analisados usando o software Opus. Para isso, 1 mg de amostra de colágeno liofilizado foi misturada na proporção de aproximadamente 1:100 com brometo de potássio seco (KBr) (espectro puro) e prensado em pellets sob condições secas. Os testes foram realizados há uma temperatura de 21 °C, na região do infravermelho: 4000-650 cm^{-1} , tendo seu resultado obtido em transmitância.

Hidrólise do colágeno

A hidrólise enzimática realizada nessa etapa foi realizada utilizando collagenase comercial de *Clostridium histolyticum* (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO). Foram analisadas as seguintes variáveis: concentração enzimática e concentração do substrato. O grau de hidrólise foi determinado pelo teor de aminoácidos livres antes e após hidrólise, utilizando o método da L-leucina e a dosagem das proteínas totais, utilizando o método BCA - Ácido Bicinconínico (Smith *et al.*, 1985).

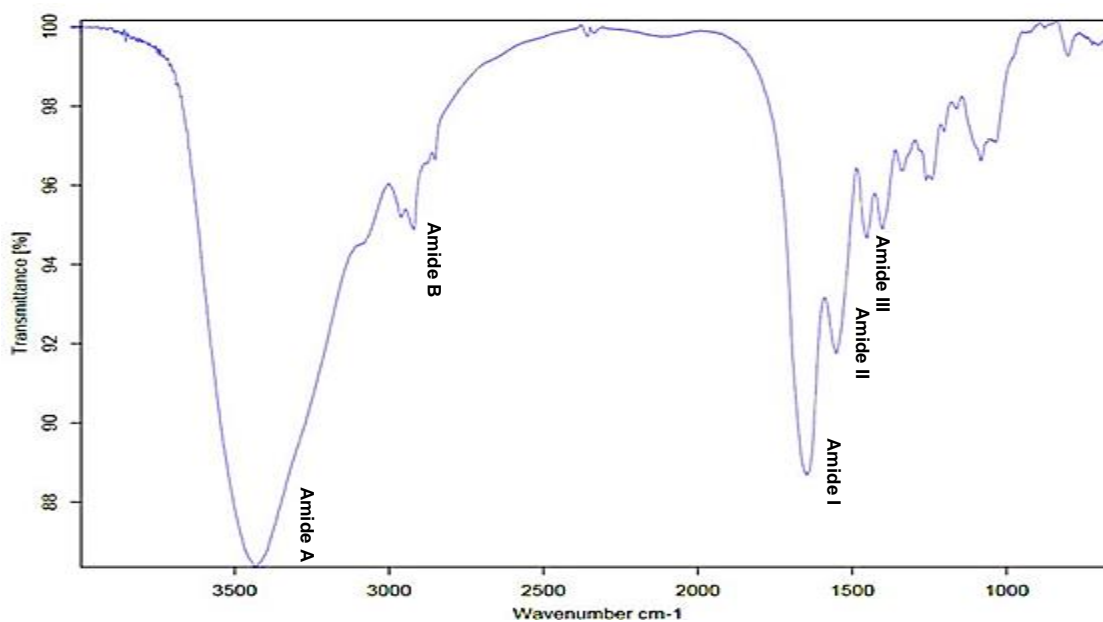
Separação dos peptídeos bioativos por filtros

Com intuito de separar os peptídeos obtidos após a hidrólise do colágeno, o extrato foi filtrado utilizando filtro de baixo peso molecular (10 KDa), após centrifugação por 20 min, a 4 °C, 6.000 rpm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

FTIR (Espectroscopia no infravermelho transformada de Fourier)

A figura 1 mostra os espectros FT-IR do colágeno extraído dos resíduos obtidos do pé de galinha, onde se podem visualizar os cinco picos nas regiões características das ligações amida que são os marcadores mais comuns da conformação da estrutura polipeptídica. Esses picos correspondem aos aminoácidos e iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) das moléculas intactas de colágeno conhecidas como bandas amida A, amida B, amida I, amida II e amida III (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Figura 1- Espectros de FTIR do colágeno extraído do pé de galinha

Fonte: a autora, 2022

O espectro apresentou bandas comuns a proteínas e estão de acordo com a estrutura molecular do colágeno sendo possível verificar bandas características de aminas primárias (A) em 3293 e 3401 cm^{-1} . As bandas em 1650 e 1653 são reportadas como sendo devido ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ de grupos amida, também conhecidos como amida I. As bandas em 1239 e 1243 cm^{-1} correspondem a vibrações típicas de proteínas conhecidas como amida III, resultante de estiramento vibracional de ligações $\text{C}-\text{N}$, tendo apresentado também a banda conhecida como amida II, resultante de dobramento de ligações $\text{N}-\text{H}$.

De acordo com Muyonga *et al.*, (2004) e Veeruraj *et al.*, (2013), a banda denominada amida A está relacionada com o estiramento $\text{N}-\text{H}$. As vibrações de estiramento $\text{N}-\text{H}$ livre ocorrem entre 3400 e 3440 cm^{-1} e quando o número da onda é deslocado para uma frequência mais baixa ($\sim 3300\text{ cm}^{-1}$) significa que um grupo $\text{N}-\text{H}$ na molécula de colágeno está unido a um hidrogênio e isso ajuda a manter a estrutura helicoidal tripla. Através da relação da absorvância das bandas em 1235 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} que se referem à banda da amida III e estereoquímica dos anéis pirrolidínicos, pode-se verificar a integridade da hélice tripla do colágeno. A primeira é sensível à presença de estrutura secundária do tropocolágeno, já a segunda independe dessa estrutura. Sendo assim, por meio da determinação da razão entre as absorvâncias nas bandas de números de onda 1235 e 1450 cm^{-1}

podemos avaliar a integridade da hélice tripla. Segundo Ahmad e Benjakul, (2010), é possível verificar a integridade da tripla hélice do colágeno através da razão entre as absorvâncias da banda denominada Amida III, associada ao estiramento vibracional de ligações C-N e da banda em 1452 cm^{-1} , associada a deformação de grupos C-H do anel pirrolidínico da prolina e da hidroxiprolina.

Hidrólise do Colágeno obtido de Fonte Aviária

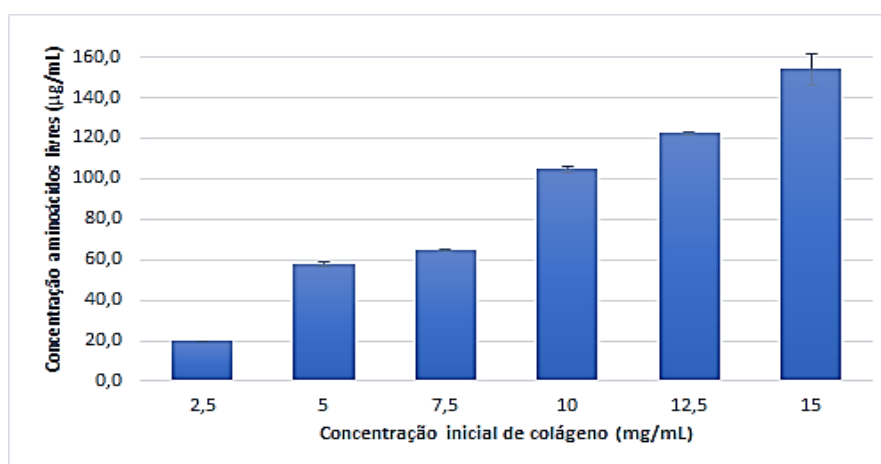
Para realizar a hidrólise do colágeno foi utilizado uma enzima comercial de *Clostridium histolyticum* (SIGMA Chemical Co.) a uma temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pH 7,0 parâmetros definidos pelo fabricante para ativação da enzima. Em seguida, foi feito uma análise da influência da concentração do substrato na hidrólise do colágeno, onde foram avaliados pelos métodos de dosagem de aminoácidos livres, utilizando a L- PA GE 28 leucina como padrão, e a dosagem de proteínas totais, através do BCA - Ácido Bicinconínico. Na dosagem de aminoácidos livres a L-leucina foi dosada em várias concentrações diferentes, gerando uma curva, onde aumentando a concentração de L-leucina aumentou também a absorvância, a partir disto pode-se calcular a equação linear. Através da obtenção da curva de L-leucina foi possível aplicar e converter as absorvâncias obtidas nas dosagens dos hidrolisados de colágeno e obter a concentração de aminoácidos livres. No método BCA - Ácido Bicinconínico (SMITH *et al.*, 1985), ocorre a formação de complexo colorido com BCA, pela redução do Cu^{+2} , em meio alcalino, com proteínas (ZAIA *et al.*, 1998). Segundo Smith *et al.*, (1985), a coloração da reação produzida por este ensaio é formada pela quelação de duas moléculas do ácido bicinconínico (BCA) com um íon cobre, a detecção colorimétrica e quantificação de proteínas totais pelo método BCA é dada pela redução do íon Cu^{+2} para Cu^{+1} , pelas proteínas em meio alcalino (reação do biureto) e o cátion cobre (Cu^{+}), é detectado colorimetricamente.

Assim como na dosagem de aminoácidos livres, a concentração de proteínas no método BCA é geralmente determinada e relatada em relação a padrões de uma proteína comum, tal como albumina de soro bovino (BSA) e a concentração de cada amostra desconhecida é determinada com base em uma curva de calibração.

O colágeno extraído foi dosado pelos dois métodos nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg/mL. Em ambas as metodologias foram possíveis

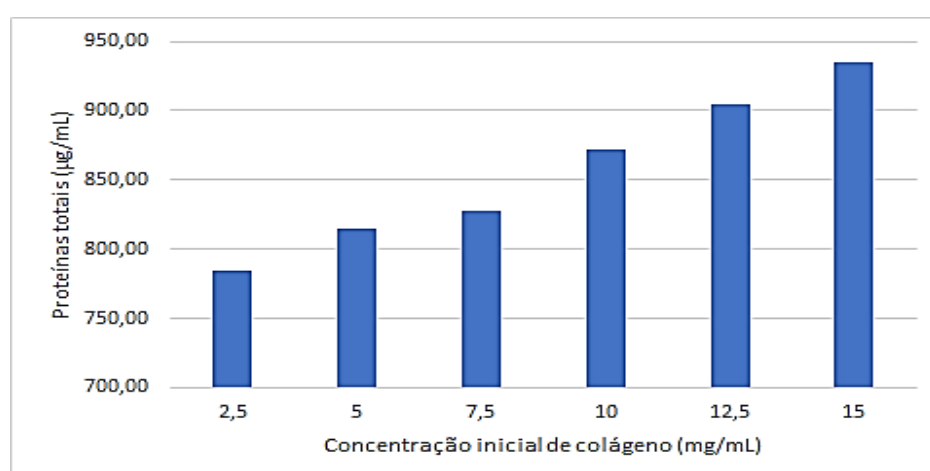
observar o mesmo comportamento, visualizando um mesmo padrão na curva de concentração. Viu-se que à medida que aumentava a concentração de colágeno, conseqüentemente aumentava a dosagem de aminoácidos livres e de proteínas totais. Onde, na concentração de 15 mg/mL de colágeno foi possível identificar as maiores concentrações 153,92 $\mu\text{g/mL}$ e 935 $\mu\text{g/mL}$ de aminoácidos livres e proteínas totais, respectivamente, como pode ser visualizado nas Figuras 2 e 3.

Figura 2- Gráfico da dosagem de Aminoácidos livres frente a diferentes concentrações do colágeno extraído do pé de galinha



Fonte: a autora, 2022

Figura 3- Gráfico da dosagem de Proteínas Totais frente a diferentes concentrações do colágeno extraído do pé de galinha



Fonte: a autora, 2022

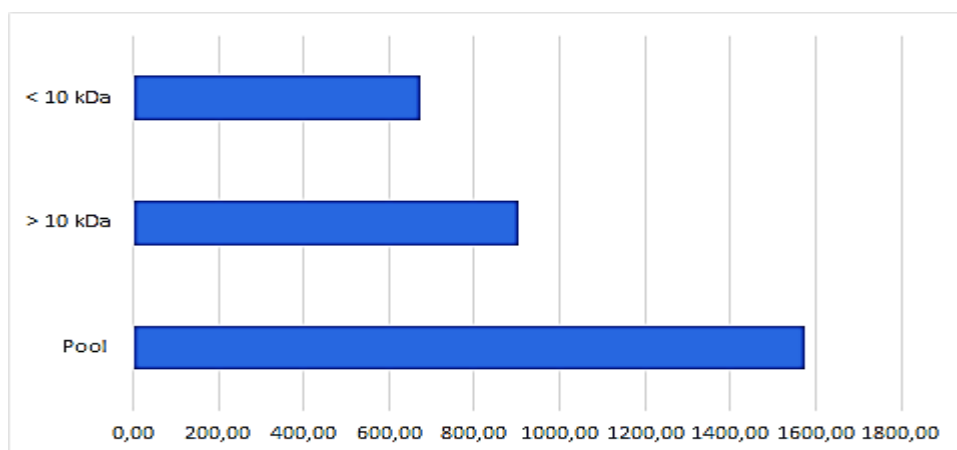
A partir destas análises, definiu-se como método para os demais testes a dosagem de proteínas totais, pois para hidrólise do colágeno utilizando aminoácidos

livres o ideal seria utilizar a hidroxiprolina como padrão, por se tratar de um aminoácido exclusivo do colágeno, seria um melhor parâmetro quando comparado a L-leucina.

Separação de peptídeos utilizando filtro de baixo peso molecular

Os peptídeos obtidos através da hidrólise do colágeno foram submetidos a separação utilizando filtro de baixo peso molecular. Esta etapa visava a filtração do pool de peptídeos e consequentemente a obtenção de peptídeos separados por tamanho. Para isto, foi utilizado uma membrana de filtração de baixo peso molecular de 10 KDa. Com esta etapa os peptídeos extraídos do colágeno do pé da galinha puderam ser separados em três frações: pool de peptídeos, peptídeos < 10 KDa e peptídeos > 10 KDa, que obtiveram uma dosagem de proteínas totais de 1573 $\mu\text{g/mL}$, 901,19 $\mu\text{g/mL}$ e 671,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 4). Estas três frações foram utilizadas nos testes posteriores, a fim de avaliar se estes peptídeos possuíam atividade biológica.

Figura 4: Gráfico da dosagem de proteínas totais das 3 frações obtidas após hidrólise



Fonte: a autora, 2022

Conclusão

Um novo processo de extração do colágeno obtido de resíduos agroindustriais de fonte aviária foi realizado de acordo com metodologia de Saiga *et al.*, (2006) adaptada. O extrato obtido foi congelado e em seguida liofilizado.

A fim de avaliar a estrutura molecular do colágeno isolado, foram realizadas análises utilizando um Espectrômetro FT-IR Vertex 70 - Bruker, através do método pastilha de KBr. Os espectros FT-IR do colágeno extraído dos resíduos obtidos do pé de galinha apresentaram cinco picos nas regiões características das ligações amida que são os marcadores mais comuns da conformação da estrutura polipeptídica. Esses picos correspondem aos aminoácidos e iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) das moléculas intactas de colágeno conhecidas como bandas: amida A, amida B, amida I, amida II e amida III;

A hidrólise enzimática foi realizada utilizando collagenase comercial de *Clostridium histolyticum* (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO), o extrato obtido foi filtrado utilizando filtro de baixo peso molecular (10 KDa). Foi possível então obter 3 frações distintas: pool de peptídeos, peptídeos < 10 KDa e peptídeos > 10 KDa. Essas 3 frações foram utilizadas para dar seguimento com os testes de atividade biológicas.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M. & BENJAKUL, S. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). *Food Chemistry*, 120: 817-824. 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2018.

CAMPOS, C. F. A.; RODRIGUÊS, K. F.; VAZ, R. G. M. V. *et al.*, Fungal enzymes in diets with alternative foods for slow-growing chicken. **Revista Desafios** – v. 04, n. 02, 2017.

CHAVIRA, R. J.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying Proteinases with Azocoll. **Analytical biochemistry**, v. 136, p. 446–450, 1984.

CORTEZ, S.; NICOLAU, A.; FLICKINGER, M. C.; MOTA, M. Biocoatings: A new challenge for environmental biotechnology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 121, p. 25-37, 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. AND FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. p. 726-730. 4ª ed. São Paulo: Artmed. 2010.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

DHAKAL, D. et al. Optimization of Collagen Extraction from Chicken Feet by Papain Hydrolysis and Synthesis of Chicken Feet Collagen Based Biopolymeric Fibres. **Food Bioscience**, 2018.

FRANZEN, J. M.; SANTOS, J. M. S. R.; ZANCANARO, V.; Colágeno: uma abordagem para a estética. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde (RIES)**. v.2, n.2, p. 49- 61, 2013.

GENESER, F.; BRÜEL, A., *et al.*, **Geneser Histología**. Edición: 4ª Ed. Panamericana, 2015.

MUYONGA, J.H.; COLE, C.G.B. ; DUODU, K.G. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*), *Food Chem.* 86 (2004) 325e332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.09.038>.

MOR, S.; NEGI, P.; KHAIWAL, R. Assessment of groundwater pollution by landfills in India using leachate pollution index and estimation of error. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 10, p. 467-476, 2018.

MORIMURA, S. et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 12, p. 1403–1412, 2002.

OLIVEIRA, V. M., ASSIS, C. R. D., HERCULANO, P. N., CAVALCANTI, M. T. H., BEZERRA, R. S. & PORTO, A. L. F. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.43, n.1, p.52-64, 2017.

OLIVEIRA, V. DE M. *et al.*, Crosslink-free collagen from *Cichla ocellaris*: structural characterization by FT-IR spectroscopy and densitometric evaluation. **Journal of Molecular Structure**, v. 1176, p. 751–758, 2019.

OYAKE-OMBIS, L.; VAN VLIET, B. J. M.; MOL, A. P. J. Managing plastic waste in East Africa: Niche innovations in plastic production and solid waste. **Habitat International**, v. 48, p. 188-197, 2015.

PEREZ-SAEZ, J.; RINALDO, A.; MANDE, J.; LARSEN, J.; CEPERLEY, N. Classification and prediction of river network ephemerality and its relevance for waterborne disease epidemiology. **Advances in Water Resources**, v. 110, p. 263-278, 2017.

ROSS, M.; PAWLINA, W. **Ross | Histologia - Texto e Atlas - Correlações com Biologia Celular e Molecular**, 7ª edição. Guanabara Koogan, 2017.

SAIGA, A., OKUMURA, T., MAKIHARA, T., KATSUTA, S., SHIMIZU, T., YAMADA, R., & NISHIMURA, T. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Food and Agricultural Chemistry*, 51(6), 1741–1745.

SAIGA, A., OKUMURA, T., MAKIHARA, T., KATSUDA, S.-I., MORIMATSU, F., & NISHIMURA, T. (2006). Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 942–945.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v.150, n.1, p. 76-85. 1985.

VEERURAJ, M. ARUMUGAM, T. BALASUBRAMANIAN. Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*), **Process Biochem.** 48 (2013) 1592e1602, in: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.011>.

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

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Química Nova*, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

5 CONCLUSÃO

O fungo *Rhizopus microsporus* UCP 1296 isolado do solo da Caatinga demonstrou produzir grandes quantidades de colagenase extracelular, em fermentação submersa, utilizando apenas gelatina como fonte de carbono. A produção da enzima colagenolítica atingiu o ápice com 120 horas de fermentação com 550 U/mL da enzima colagenolítica, biomassa de 0,42 g/L e atividade colagenolítica específica de 808,23 U/mg . Esses valores obtidos nesse estudo são de grande importância, pois não foi encontrado na literatura científica relatos da produção de colagenase pelo fungo utilizado nesse experimento, além disso, esse valor é muito maior do que outros resultados publicados para outros microrganismos.

Um planejamento fatorial completo 2^4 , foi utilizado para a otimização das condições do cultivo e como resultado obtivemos um aumento da produção enzimática em cerca de 32%.

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) foi utilizado para a purificação da colagenase produzida pelo *R. microsporus*. O modelo estudado apresentou bons resultados na purificação parcial da colagenase. A enzima migrou para a fase inferior em todos os ensaios, onde foram observados os valores mais elevados de atividade colagenolítica de 793 U/mL, usando PEG 8000 g/mol a 12,5% (m/m) de concentração, pH 8,0 e concentração de fosfato a 10,0% (m/m).

A análise estatística relacionada à atividade enzimática mostrou que apenas a massa molar do PEG (MPEG (g/mol) e a concentração de fosfato (C Fosfato (%m/m)), foram significativas, indicando que a maior massa molar favoreceu a uma maior atividade enzimática. Com o planejamento fatorial 2^4 , o ensaio denominado (6) apresentou um rendimento em purificação do SDFA de 113%, e fator em purificação de 62,34%.

Parâmetros como: temperatura, pH e inibidores foram avaliados para a caracterização parcial da enzima. Neste contexto, a enzima mostrou-se muito ativa entre pH 7,0 ~ 9,0 tendo pH 8,0 como ótimo, porém abaixo do pH 4,0 ou acima do pH 9,0 a sua atividade diminuiu bruscamente. Portanto a enzima foi caracterizada como alcalina. A enzima colagenolítica apresenta termoestabilidade em temperaturas elevadas onde também foi verificado que

abaixo de 37 °C e acima de 65 °C, a atividade enzimática diminui gradativamente. A avaliação do efeito dos inibidores mostrou que a atividade residual pelo IAA e EDTA foram mantidas em 77,72% e 67,22% respectivamente, e que houve inibição ao PMSF. Desta forma, a enzima parece ter porções de metalo e cisteíno proteases.

Os resultados sugerem que a enzima produzida apresenta-se como um produto biotecnológico promissor com aplicabilidade em diversas áreas.

APÊNDICES

Os apêndices abaixo são referentes às atividades realizadas que não constam nos objetivos, mas foram desenvolvidas durante o período do doutorado.

6 APÊNDICE - A

Síntese das nanopartículas magnéticas

A produção das nanopartículas de magnetita foi realizada segundo a metodologia de Duarte Neto (2018). Soluções de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,1 M e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,6 M foram adicionadas a 50 mL de água destilada, sob agitação magnética, e uma solução de NaOH 5M foi adicionada até pH 10. Em seguida, a mistura foi aquecida a 50 °C, por 30 minutos, sob constante agitação. Após, as nanopartículas foram vigorosamente lavadas com água destilada até atingir o pH 7. O material foi seco e mantido a 25 °C até o uso.

As nanopartículas produzidas foram revestidas com anilina através da polimerização oxidativa. As nanopartículas foram tratadas com KMnO_4 0,1 M (50 mL), a 25 °C por 1 hora. As partículas magnéticas tratadas com o KMnO_4 foram então imersas em uma solução contendo 50 mL de anilina 0,5 M (em HNO_3 1M). A polimerização ocorreu a 4°C por 1 hora. Em seguida, as nanopartículas revestidas com polianilina (mPANI) foram lavadas com água destilada, ácido cítrico 0,1 M e lavadas novamente com água destilada. Finalmente, o material seco foi mantido a 25 °C até o uso.

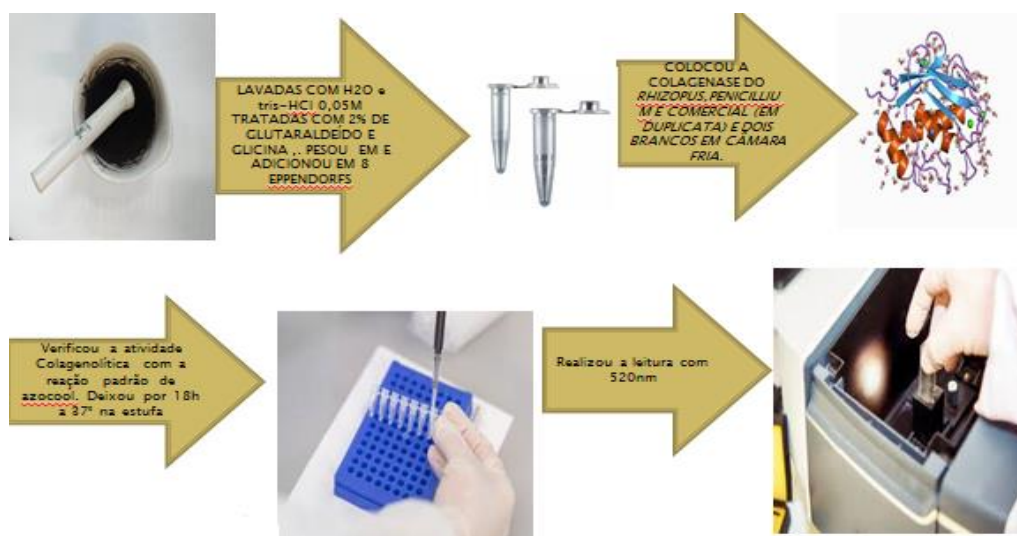
Imobilização da colagenase em nanopartículas magnéticas

As nanopartículas revestidas com polianilina (mPANI) foram ativadas com glutaraldeído (GLUT) a 2% (v/v). Com o auxílio de campo magnético gerado a partir de um ímã, as partículas foram lavadas com o tampão adequado para a colagenase (Tris-HCl 0,05 M, pH = 8). Após retirada do tampão, as mPANI foram colocadas em contato com 1 mL da colagenase purificada, onde ficaram sob homogeneização constante por 2 horas. Em seguida, a enzima purificada foi retirada e as mPANI contendo a enzima imobilizada foi guardada em tampão até o uso.

A atividade colagenolítica foi verificada com a solução padrão de azocoll e a absorbância medida por espectrofotômetro a 520nm.

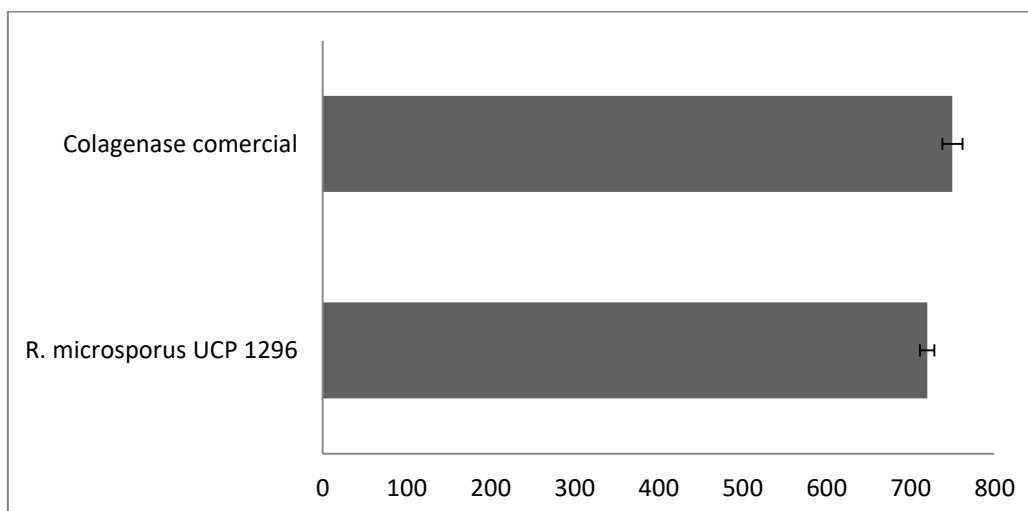
Com relação aos resultados de imobilização das enzimas colagenolíticas, a enzima produzida por *R. microsporus* UCP 1296 e a colagenase comercial apresentaram os melhores rendimentos com valores acima de 700 U/mL de atividade colagenolítica após imobilização em nanopartículas magnéticas, selecionadas desta forma, para os próximos ensaios de caracterização, figura 1.

Figura 1- Sequência das etapas para formação das nanopartículas magnéticas e testes com enzima imobilizada com a colagenase fúngica e comercial.



Fonte: a autora

Figura 2- Comparação das atividades colagenolíticas das enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas (U/mL)



Fonte: a autora

8 APÊNDICE - B

Atividades Biológicas dos Peptídeos

Atividade antioxidante

Os experimentos foram realizados usando o ensaio ABTS (Re *et al.*, 1999) que implica a formação de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina- Ácido 6-sulfônico) (ABTS), cromóforo radical por oxidação de ABTS com persulfato de potássio e seus resultados foram calculados e plotados como uma função da concentração do antioxidante de referência (Trolox).

A atividade de eliminação de radicais ABTS das três frações (*pool* de peptídeos, < 10 KDa e > 10 KDa) foram 64, 70 e 16%, que foram significativamente diferentes. As atividades e concentrações do radical ABTS também apresentaram correlação ($R^2 = 0,9917$, $p < 0,05$). O ensaio de eliminação de radicais ABTS é um método simples e rápido que tem sido amplamente aplicado para analisar as atividades de eliminação de radicais de compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (KETNAWA, WICKRAMATHILAKA, & LICEAGA, 2018; PHONGTHAI *et al.*, 2018).

Neste estudo, a fração de peptídeos < 10 KDa se mostrou mais eficiente na capacidade de eliminar o radical ABTS quando comparado ao pool de peptídeos e aos peptídeos > 10 KDa. Como padrão desse ensaio foi utilizado antioxidante de referência Trolox. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox) (Tabela 1).

Tabela 1- TEAC do pool de peptídeos, peptídeos < 10 KDa e peptídeos > 10 KDa.

Amostras	Equivalente [Trolox] (mM)	% Inibição
< 10 kDa	333,5	70%
> 10 kDa	55,25	16%
Pool	288,5	64%

Atividade Antimicrobiana

A atividade antibacteriana foi realizada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Inicialmente, o caldo *Müller Hinton* (CMH) foi adicionado em placas de microdiluição, em seguida, a solução de peptídeos foi adicionada por diluição seriada. As suspensões dos isolados clínicos bacterianos foram ajustadas na densidade de 0,5 da escala de *McFarland*, e em seguida, depositadas nos poços, obtendo uma concentração final de 10⁵ UFC/poço. Posteriormente, foi feita a leitura por espectrofotometria utilizando leitor de placa de Elisa no comprimento de onda de 620 nm (Multiskan FC - Thermo Scientific). A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir mais de 90% do crescimento microbiano.

As três frações de peptídeos foram testadas frente a oito diferentes cepas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 33591, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* NCTC 13864, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Klebsiella pneumoniae* KPC ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Acinetobacter baumannii* ATCC19606) (Quadro 1).

Quadro 1- Atividade antibacteriana de peptídeos frente diferentes cepas

Microorganisms	MIC (µg / mL)		
	Pool	<10 kDa	>10 kDa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>469	>335	>450
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ATCC 33591	>469	>335	>450
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>469	>335	>450
<i>Escherichia coli</i> NCTC 13864	>469	>335	>450
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>469	>335	>450
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC ATCC 700603	>469	>335	>450
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>469	>335	>450
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	>469	>335	>450

Onde: ATCC: *American Type Culture Collection*; MRSA: *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; NCTC: *National Collection of Type Cultures*; KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

Como pode ser visualizado no Quadro 1, observou-se que os peptídeos não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos isolados das diferentes cepas. Os resultados são representados na tabela com sinais de maior que (>), pois os peptídeos não apresentaram atividade na concentração testada das 3 frações (469, 335 e 450 µg/mL), porém isto não quer dizer necessariamente que estes peptídeos não possuam atividade antimicrobiana. A estratégia a ser seguida é aumentar a concentração das três frações, em quantidades maiores que (>) as testadas (469, 335, 450 µg/mL), para a partir daí poder afirmar que estes peptídeos possuem ou não possuem atividade antimicrobiana. É importante esta estratégia de aumento na concentração, pois as concentrações testadas foram submetidas a diluições seriadas nos poços da placa, e a quantidade final em cada poço pode não ter sido suficiente para inibir as cepas testadas.

Atividade Antiproliferativa

Os peptídeos foram testados em células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Os peptídeos nas concentrações testadas do pool (46,9 µg/mL) (Tabela 2), dos peptídeos > 10 kDa (45 µg/mL) (Tabela 3) e peptídeos < 10 kDa (33,5 µg/mL) (Tabela 4) não apresentaram atividade antiproliferativa. Porém, assim como visualizado nos testes de atividade antimicrobiana, nos testes de atividade antiproliferativa as frações também passaram por diluições seriadas o que fez com que a concentração inicial caísse. Por isto, para esta atividade será abordado à mesma estratégia de aumento da concentração inicial dos peptídeos para que assim quando estes passem pelas diluições ainda tenham uma quantidade significativa de peptídeos e assim avaliar se estes possuem atividade antiproliferativa ou não.

Tabela 2- Viabilidade celular do *Pool* peptídeos em células de MDA-MB-231

[$\mu\text{g/mL}$]	46,9	23,4	11,7	5,8	2,9
Média	100,3	93,9	103	101,2	73,9
Desvio padrão	6,2	7,1	8,4	11,7	12

Tabela 3- Viabilidade celular do >10KDA em células de MDA-MB-231

[$\mu\text{g/mL}$]	45	22,5	11,25	5,62	2,81
Média	102	90,1	90,9	92,6	91,2
Desvio padrão	7,1	11,6	7,4	6,7	9,4

Tabela 4- Viabilidade celular do <10KDA em células de MDA-MB-231

[$\mu\text{g/mL}$]	33,5	16,7	8,38	4,19	2,09
Média	94,4	92,2	97,4	96,8	120,7
Desvio padrão	8,8	7,9	10,7	8,1	8,1

