



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

**Produção, extração e purificação integrada de proteases com
atividade fibrinolítica produzida por fungos do gênero *Rhizopus* e
sua caracterização bioquímica**

STELIANE LIMA SANTOS

Recife, 2022



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

STELIANE LIMA SANTOS

**Produção, extração e purificação integrada de proteases com
atividade fibrinolítica produzida por fungos do gênero *Rhizopus* e
sua caracterização bioquímica**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biociência Animal. Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Tatiana Souza Porto

Co-Orientadora: Dr^ª Márcia Nieves Carneiro da Cunha

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)

S237p Santos, Steliane
Produção, extração e purificação integrada de proteases com atividade fibrinolítica produzida por fungos do gênero *Rhizopus* e sua caracterização bioquímica / Steliane Santos. - 2022.
120 f. : il.

Orientador: Tatiana Souza Porto.
Coorientador: Marcia Nieves Carneiro da Cunha. Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.

1. *Rhizopus arrhizus*. 2. Protease fibrinolítica. 3. Sistema de duas fases aquosas . 4. Fermentação extrativa . I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Cunha, Marcia Nieves Carneiro da, coorient. III. Título

CDD 636.089

STELIANE LIMA SANTOS

**Produção, extração e purificação integrada de proteases com
atividade fibrinolítica produzida por fungos do gênero *Rhizopus* e
sua caracterização bioquímica**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto (Orientadora)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr^a. Camila Souza Porto
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Dr^a. Marlllyn Marques da Silva
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Dr^a. Amanda E. Sales Conniff
University of South Florida - USF

Dedico esta tese aos meus pais,
por todo o apoio, incentivo e por
sempre acreditarem no meu futuro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho, por me conceder saúde e disposição para enfrentar todos os desafios que a vida me proporciona. Obrigada por iluminar minhas escolhas, pelo apoio da minha família e amigos, por colocar pessoas que me ajudam e ajudaram a trilhar esse caminho e principalmente por ser minha base nos momentos felizes e difíceis. Aos meus pais por sonharem comigo um futuro diferente, por acreditarem que o conhecimento é a base para um futuro melhor e por todo amor que recebo.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tatiana Souza Porto pela oportunidade de continuar na área acadêmica, por acreditar no meu potencial, por todo o conhecimento repassado. Obrigada por ser paciente, por explicar minuciosamente, por ser atenciosa, uma profissional exemplar e por exigir o melhor de mim. Uma pessoa especial, admirável que contribuiu muito com meu desenvolvimento acadêmico e pessoal. Sempre lembrarei dos seus ensinamentos. A minha Coorientadora Dr^a. Márcia Nieves C. da Cunha pela parceria, por me acompanhar nos experimentos, pela paciência, pelos ensinamentos, pela acessibilidade e amizade. Obrigada por me acompanhar em todos os momentos, nas dificuldades e realizações.

Ao meu companheiro João, agradeço por sempre por seu apoio em todos os momentos, por me incentivar, por ser uma inspiração de determinação. Por todo o seu amor e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. A minha irmã Stefanne, aos meus sogros Marluce e Marcelo e minha cunhada Marina por estarem sempre na torcida de todas as minhas conquistas, por seu apoio e carinho.

A Prof^a. Dr^a. Ana Porto por ter me acolhido tão bem na iniciação científica, mestrado e doutorado, por permitir a realização dos experimentos no LABIOPROTECBIO, por todo o seu suporte e ajuda. Aos meus queridos amigos Dr. Thiago Nascimento, Dr. Romero Brandão e Dr^a. Juanize Batista que tanto me ajudaram. Obrigada por estarem sempre prontos para as inúmeras dúvidas que aparecem em todo processo da pesquisa. Cada um contribuiu de forma especial no meu aprendizado.

A Prof^a. Dr^a. Galba Takaki, Dra. Adriana Souza e por abrirem as portas da Universidade Católica de Pernambuco e por me ajudarem no processo de pesquisa. As minhas amigas Sabrina Santana, Gabrielly Duarte, Ligia Fernandes e Karoline Souza por compartilharem das frustrações e alegrias, por estarem na torcida da minha evolução acadêmica, por acreditarem na minha capacidade e por ficarem feliz com a minha felicidade. Obrigada por não permitirem que o tempo e os atropelos da vida nos afastassem. Tenho um carinho imensurável por cada uma de vocês.

Agradeço imensamente aos meus amigos Rafaella Leandra e Luís André por compartilharem comigo as dificuldades da vida acadêmica, os momentos felizes e tristes, por sempre estarem presentes em todos os momentos importantes da minha vida, obrigada por fazer parte da minha rede de apoio, por cada conversa, conselhos e carinho que recebi. Aos meus amigos do EREM Diário de Pernambuco, por seu apoio, torcida, por trazer alegria e gargalhadas ao meu dia, obrigada por me incentivarem e me ajudarem nos momentos de dificuldade. À FACEPE (Fundação para a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) pela bolsa de doutorado. À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo pela realização desse doutorado.

RESUMO

Enzimas com atividade fibrinolítica são obtidas de diferentes fontes e possuem a capacidade de degradar a fibrina, o principal componente proteico dos coágulos sanguíneos. O acúmulo de fibrina nos vasos pode gerar trombose, uma doença que ocorre quando há formação de coágulos sem haver sangramento. Nesse sentido, o objetivo desta tese foi selecionar fungos filamentosos do gênero *Rhizopus*, produzir e extrair proteases fibrinolíticas por fermentação submersa, fermentação extrativa e sistema de duas fases aquosas (PEG/Citrato), além de caracterizar bioquimicamente a enzima. Para a seleção do microorganismo foi realizada uma fermentação submersa com fungos do gênero *Rhizopus*, utilizando um planejamento fatorial 2^3 completo para determinar as melhores condições de produção. A influência das variáveis tipo de substrato (TS), concentração do substrato (CS) e concentração de glicose (CG) foram avaliadas sobre a produção da protease fibrinolítica. A enzima produzida foi extraída por sistema de duas fases aquosas (SDFA) constituído de polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio, sendo realizado de acordo com um planejamento fatorial 2^4 , para avaliar a influência das variáveis: massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), concentração de citrato de sódio (C_{cit}) e pH, sobre o coeficiente de partição (K), recuperação (Y%) e fator de purificação (FP). Em seguida a enzima foi caracterizada em parâmetros bioquímicos e cinéticos. Um planejamento fatorial 2^4 também foi realizado para avaliar a influência de M_{PEG} , C_{PEG} , C_{cit} e pH sobre o K e Y na fermentação extrativa. A protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 foi produzida nas condições de 3% de soja, e 0,5% de glicose, sob agitação de 120 rpm, a 30°C por 96 horas de fermentação submersa, apresentando uma atividade proteásica de 10,37 U/mL e uma atividade fibrinolítica com um halo de 31 mm, correspondendo a uma atividade de 850,60 U/mL. Quanto à extração em SDFA, os melhores resultados foram obtidos no ensaio formado por 24,0 % (m/m) de PEG 8000, 15 % (m/m) de citrato de sódio e pH 8. Nesta condição a enzima particionou preferencialmente para fase rica em PEG, com um K de 1,58, FP 4,07, Y de 97,0% e uma atividade fibrinolítica com um halo de 16 mm, correspondendo a uma atividade de 44,39 U/mL. No processo de fermentação extrativa a enzima particionou para ambas as fases, tendo a melhor condição no ensaio composto por PEG 8000 g/mol, na concentração de 20%, 15% de citrato e pH 8,0, apresentando um K de 2,4 e recuperação de atividade (Y) 71,5% e 3,83 U/mL de atividade proteásica. A enzima

presente no tanto no extrato enzimático, quanto no SDFA apresentaram temperatura ótima de 50°C e pH ótimo 8. Quanto aos parâmetros cinéticos o extrato enzimático apresentou constante de Michaelis Menten (K_m) de 4,06 mg/mL com velocidade máxima de 45,05 U/mL. A enzima obtida por fermentação extrativa não foi caracterizada bioquimicamente. Esses resultados demonstram o potencial da produção de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 em fermentação submersa e dos processos de extração da protease fibrinolítica e sua possibilidade para ser explorado em aplicações industriais como candidatos a agentes trombolíticos.

Palavras chave: *Rhizopus arrhizus*, SDFA, Protease fibrinolítica, Fermentação extrativa, Purificação.

ABSTRACT

Enzymes with fibrinolytic activity are obtained from different sources and can degrade fibrin, the main protein component of blood clots. The accumulation of fibrin in vessels can lead to thrombosis, a disease that occurs when clots form without bleeding. The work in question has as objectives to produce and purify proteases with fibrinolytic activity from filamentous fungi by submerged fermentation; carry out purification processes through an aqueous two-phase system (PEG/Citrate), in addition to biochemically characterize the fibrinolytic enzyme obtained from *Rhizopus arrhizus* UCP 1605. For production, a submerged fermentation was carried out with fungi of the genus *Rhizopus* using a complete 2^3 factorial design to determine the best production conditions. The influence of the variables substrate type (TS), substrate concentration (CS) and glucose concentration (GC) were evaluated under the production of fibrinolytic proteases. The produced enzyme was extracted by an aqueous two-phase system (ATPS) consisting of polyethylene glycol (PEG) and sodium citrate, being carried out according to a 2^4 factorial design, to evaluate the influence of the variables: molar mass of PEG (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}), sodium citrate concentration (C_{cit}) and pH, on the partition coefficient (K), recovery (Y%) and purification factor (FP). Then the enzyme was characterized of biochemical and kinetic parameters. A 2^4 factorial design was also carried out to evaluate the influence of M_{PEG} , C_{PEG} , C_{cit} and pH on K and Y in extractive fermentation. The fibrinolytic protease from *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 was produced under the conditions of 3% soybean and 0.5% glucose, under stirring at 120 rpm, at 30°C for 96 hours of submerged fermentation, showing a protease activity of 10.37 U /mL and a fibrinolytic activity with a halo of 31 mm, corresponding to an activity of 850.60 U/mL. As for extraction in ATPS, the best results were obtained in the assay formed by 24.0% (m/m) of PEG 8000, 15% (m/m) of sodium citrate and pH 8. In this condition, the enzyme preferentially partitioned to the PEG-rich phase, with a K of 1.58, FP 4.07, Y of 97.0% and a fibrinolytic activity with a halo of 16 mm, corresponding to an activity of 44.39 U/ml. In the extractive fermentation process, the enzyme partitioned for both phases, with the best condition in the test composed of PEG 8000 g/mol, at a concentration of 20%, 15% citrate and pH 8.0, with a K of 2.4 and activity recovery (Y) 71.5% and 3.83 U/mL of activity protease. The enzyme present in both the enzymatic extract and the ATPS showed an optimal temperature of 50°C and an optimal pH of 8. As for the kinetic parameters, the

enzymatic extract presented a Michaelis Menten constant (K_m) of 4.06 mg/mL with a maximum velocity of 45.05 U/mL. The enzyme obtained by extractive fermentation wasn't biochemically characterized. These results demonstrate the potential of the production of *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 in submerged fermentation and of the fibrinolytic proteases extraction processes and their possibility to be explored in industrial applications as candidates for thrombolytic agents.

Keywords: *Rhizopus arrhizus*, ATPS, Fibrinolytic protease, extractive fermentation, Purification.

1.INTRODUÇÃO	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. Proteases	24
2.2. Aplicações de proteases e seu mercado comercial	26
2.3. Proteases fibrinolíticas	28
2.3.1. Homeostase	29
2.3.2. Agentes fibrinolíticos	32
2.4. Fontes de enzima fibrinolítica	34
2.5. Fermentação submersa	37
2.6. Sistema de duas fases aquosas	39
2.6.1. Efeitos da massa molar e concentração do polietilenoglicol	40
2.6.2. Hidrofobicidade na partição de biomoléculas	41
2.6.3. Efeitos da adição de sais	41
2.6.4. Efeito da temperatura	41
2.6.5. Efeito do pH	42
2.7. Fermentação Extrativa	42
2.8. Uso de planejamento experimental em bioprocessos	44
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo geral	47
3.2. Objetivos específicos	47
4. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO I	54
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	54
RESUMO	55
ABSTRACT	56
1. INTRODUÇÃO	57
2. MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1. Manutenção dos micro-organismos	58

2.2. Seleção da linhagem fúngica produtora de proteases com atividade fibrinolíticas	58
2.3. Planejamento fatorial 2 ³ para produção de proteases com atividade fibrinolíticas por fermentação submersa	59
2.4 Determinações analíticas	59
2.5. Caracterização bioquímica	60
2.5.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease	60
2.5.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	61
2.5.3. Efeito dos íons metálicos na atividade de protease	61
2.5.4. Efeito de inibidores na atividade de protease	61
2.5.5. Cinética da enzima	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
3.1. Seleção do micro-organismo produtor de protease com atividade fibrinolítica	62
3.2. Planejamento fatorial para a produção de protease com atividade fibrinolítica	64
3.3. Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica	67
3.3.1. Efeitos de pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease	68
3.3.2. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática	69
3.3.3. Cinética da ativação de proteases	71
4. CONCLUSÃO	72
5. AGRADECIMENTOS	72
6. REFERÊNCIAS	73
CAPÍTULO II	76
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605 EXTRAÍDA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)	76
RESUMO	77
ABSTRACT	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. MATERIAL E MÉTODOS	80

2.1. Micro-organismo	80
2.2. Produção da protease fibrinolítica	80
2.3. Atividade proteolítica, proteínas totais e atividade fibrinolítica	80
2.4. Sistemas de duas fases aquosas	81
2.5. Parâmetros a serem avaliados K, Y e FT	82
2.6. Caracterização bioquímica da protease de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605	83
2.6.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease	83
2.6.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	83
2.6.3. Efeito dos íons metálicos na atividade de protease	84
2.6.4. Efeito de inibidores na atividade de protease	84
2.6.5. Cinética da enzima	84
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Coeficiente de partição (K)	85
3.2. Determinação da Recuperação (Y)	89
3.3. Fator de purificação (FP)	90
3.4. Caracterização bioquímica da protease extraída de <i>Rhizopus arrhizus</i>	92
3.4.1. Efeitos de pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease	92
3.4.2. Efeito dos inibidores na atividade enzimática	94
3.4.3. Cinética enzimática	95
4. CONCLUSÃO	96
5. AGRADECIMENTOS	96
6. REFERÊNCIAS	96
CAPÍTULO III	101
PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/CITRATO DE UMA PROTEASE DE <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605	101
RESUMO	102
ABSTRACT	103
1. INTRODUÇÃO	104

2. MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1. Micro-organismo	105
2.2. Produção de protease por fermentação submersa	105
2.3. Produção e extração simultânea de protease por fermentação extrativa	106
2.4. Determinações analíticas	107
2.5. Determinação da razão de volume, coeficiente de partição e recuperação	107
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	108
3.1. Fermentação extrativa usando SDFA para produção de protease de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605	108
3.2. Efeitos no coeficiente de partição (K)	110
3.3. Efeitos na recuperação em atividade (Y)	113
4. CONCLUSÃO	115
5. AGRADECIMENTOS	115
6. REFERÊNCIAS	115
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	120

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1-** Modelo clássico da cascata de coagulação Fonte: Adaptado de (HOFFBRAND; MOSS, 201831
- Figura 2-** Exemplificação da cascata de coagulação baseada em superfícies celulares Fonte: Adaptado de (FERREIRA et al., 2010).....32
- Figura 3-** Microscopia das estruturas morfológicas do micro-organismo *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 nas objetivas de 10x (A) e 40x (B). (Fonte a autora).....36
- Figura 4-** Produção de enzima fibrinolítica por fermentação submersa. (Fonte a autora).....37
- Figura 5-** Produção do sistema de duas fases aquosas usando PEG/citrato de sódio. (Fonte a autora).....39

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

- Figura 1-** Atividade fibrinolítica por degradação do halo de fibrina pelo fungo *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 após 96h de incubação (em triplicata).....63
- Figura 2-** (A) Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis para produção de protease por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605; (B) Gráfico cúbico de interação das variáveis na produção de protease fibrinolítica. TS - Tipo de substrato, CS - Concentração do substrato, CG --Concentração de glicose.....67
- Figura 3-** Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 (A) Temperatura ótima e estabilidade da enzima presente no extrato enzimático, (B) pH ótimo e estabilidade da enzima presente no extrato enzimático. 69
- Figura 4-** Gráfico de cinética enzimática da protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 presente no extrato enzimático. A linha pontilhada representa a curva de ajuste desenhada de acordo com a equação de Lineweaver-Burk72

CAPÍTULO II

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 EXTRAÍDA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)

- Figura 1-** Diagrama geométrico dos efeitos da massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio, tendo como variável resposta o coeficiente de partição da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 (K)89
- Figura 2-** Gráfico cúbico mostra o resultado da interação entre as variáveis: concentração do citrato de sódio e concentração do PEG para resposta fator de purificação da protease fibrinolítica.91
- Figura 3-** Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 pré-purificada em SDFA PEGcit (A) Estabilidade a temperatura em SDFA e perfil de atividade relativa versus temperatura, (B) pH ótimo e estabilidade ao pH da amostra e SDFA.....93
- Figura 4-** Gráfico de Lineweaver-Burk para protease fibrinolítica pré-purificada em SDFA PEG CITde *Rhizopus arrhizus* UCP 160595

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/CITRATO DE UMA PROTEASE DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

- Figura 1-** Diagrama de interpretação geométrica da interação entre os efeitos massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio e (B) Gráfico cúbico dos efeitos do pH, concentração de citrato e massa molar do PEG (MPEG) tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K) 112
- Figura 2-** Diagrama de interpretação geométrica da interação entre os efeitos massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio tendo como variável resposta recuperação enzimática (Y)..... 114

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 Aplicações de proteases em processos industriais. Fonte: Adaptado de (SALWAN E SHARMA, 2019)	27
Tabela 2- Utilização de espécies do gênero <i>Rhizopus</i> para produção de enzimas e suas condições de cultivo	36

CAPÍTULO I

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Tabela 1 Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^3 para produção de proteases com atividade fibrinolítica.	59
Tabela 2- Produção de proteases por fungos filamentosos do gênero <i>Rhizopus</i> por fermentação submersa.....	63
Tabela 3- Resultados da atividade proteásica produzida por <i>Rhizophus arrhizus</i> UCP 1605 em fermentação submersa realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3	65
Tabela 4- Efeitos de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica obtida do extrato enzimático de <i>Rhizophus arrhizus</i> UCP 1605.	70

CAPÍTULO II

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 EXTRAÍDA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)

Tabela 1- Níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial 2^4 para extração da protease fibrinolítica de <i>Rhizophus arrhizus</i> UCP 1605 através do SDFA (PEG/Citrato).....	82
Tabela 2 Matriz do Planejamento Fatorial 2^4 e resultados da purificação parcial da protease fibrinolítica de <i>Rhizophus arrhizus</i> UCP 1605 utilizando sistema de duas fases aquosas.	86

Tabela 3- Efeitos e interações das variáveis do planejamento fatorial 2 ⁴ para extração de proteases fibrinolíticas de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605 por sistemas de duas fases aquosas (PEG/Citrato).....	87
Tabela 4- Efeitos de inibidores na atividade proteolítica.....	94

CAPÍTULO III

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/CITRATO DE UMA PROTEASE DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2 ⁴ para a fermentação extrativa S DFA PEG/citrato de uma protease de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605.	107
Tabela 2- Matriz do Planejamento Fatorial completo 2 ⁴ com resultados da extração de protease usando fermentação extrativa	109
Tabela 3- Efeitos das variáveis independentes e de suas interações sob a produção de protease de <i>Rhizopus arrhizus</i> UCP 1605 por fermentação extrativa em Sistema de duas fases aquosas (S DFA) formado por PEG/citrato utilizando planejamento fatorial 2 ⁴	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância
AVC - Acidente Vascular Cerebral
BSA - Bovino Soro Albumina
Ccit - Concentração de citrato de sódio
CG - Concentração de glicose
CPEG - Concentração do PEG
°C - Grau Celsius
CS - Concentração do substrato
CTI - Cromatografia de Troca iônica
DCVs - Doenças cardiovasculares
DX - Dextrana
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.
FATOR I - Fibrinogênio
Fator II - Protombina
Fator IIA - Trombina
Fator IX - Fator natal
Fator X - Fator de Stuart-Prower
Fator XI - Tromboplastina plasmática
Fator XII - Fator de coagulação ou fator de Hageman
Fator XIIA - Serina protease ativada
Fator XA - Trombinase
Fator XIII - Fator estabilizador da fibrina
FT Fator - tecidual
FC - Fator de concentração
FES -Fermentação em Estado Sólido
FS - Fermentação Submersa
FvW - Fator de Von Willebrand
IM - Infarto do Miocárdio
K - Coeficiente de partição
kDa - Quilodaltons.
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPEG - Massa molar do PEG

MS-2 - Meio de cultivo a base de soja 2%

MSR - Metodologia de Superfície de Resposta

OMS - Organização Mundial de Saúde.

PEG - Polietileno glicol

PF - Fator de purificação

pH - Potencial Hidrogeniônico

PMSF - Fluoreto diMetilfenilsulfonil.

RPM - Rotações por minuto

SDFA - Sistema de Duas Fases Aquosas

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio.

t-PA - Ativador Tecidual do Plasminogênio.

TS -Tipo de substrato

UCP - Universidade Católica de Pernambuco

UK - Uroquinase.

Y - Recuperação em Atividade enzimática

µm - Micrômetro

1.INTRODUÇÃO

A demanda mundial por enzimas vem crescendo efetivamente devido a ampla diversidade de aplicações nos setores industriais. As proteases constituem um dos maiores grupos de enzimas industriais altamente ativas, estáveis e com funções terapêuticas específicas, em evidência estão as proteases fibrinolíticas (MANJREKAR, WADEKAR; SUMANT, 2021). Essas enzimas desempenham um papel importante no tratamento de doenças cardiovasculares, pois possuem a capacidade de degradar a fibrina, principal componente proteico dos coágulos sanguíneos, formada a partir da ativação do fibrinogênio pela trombina que normalmente encontra-se em equilíbrio no organismo (STEPHANI et al., 2017).

Os coágulos sanguíneos são formados em resposta ao mecanismo de proteção do corpo humano, que impede hemorragias bloqueando o fluxo sanguíneo nos vasos e levando a formação de trombos. Tais trombos quando não dissolvidos podem ocasionar em diversas doenças cardiovasculares (DCVs) como: Infarto agudo do miocárdio, acidente cardiovascular, embolia pulmonar e trombose (VIJAYARAGHAVAN et al., 2019). A plasmina é a única enzima produzida pelo corpo humano capaz de dissolver os coágulos e manter a corrente sanguínea desobstruída. Atualmente a terapia com agentes fibrinolíticos é uma das abordagens utilizadas para o tratamento das DCVs, pois as enzimas fibrinolíticas possuem mecanismo de ação semelhante ao realizado pela plasmina. Portanto, é importante impulsionar a busca por novas fontes de enzimas fibrinolíticas, que atuem diretamente na dissolução dos coágulos (CHOI et al., 2011).

As enzimas fibrinolíticas podem ser purificadas de várias fontes, como o Natto (um alimento fermentado oriental) (SUMI et al., 2004), de minhocas (WANG et al., 2011), cobras (VIVAS et al., 2016), e fontes microbianas, tais como: bactérias (KOTB, 2014), algas (SOUZA, de et al., 2016) e fungos do filamentosos do gênero *Rhizopus* (JIA-MIN et al., 2020). Os micro-organismos são utilizados efetivamente para produção de enzimas por serem importantes fontes de agentes trombolíticos, destacam-se por secretar proteases extracelularmente (LU et al., 2010). Para aumentar o rendimento e a produção em larga escala das enzimas fibrinolíticas na indústria, otimizar e escolher um meio de cultura adequado é essencial, pois o sucesso

da fermentação depende da existência de condições ambientais definidas (PAN et al., 2019).

As condições de cultivo são fatores determinantes para o crescimento dos micro-organismos e para a produção de protease fibrinolítica por fermentação. A utilização de técnicas de fermentação submersa, tem sido utilizada para aumentar a produção e a síntese comercial de diversas enzimas industriais (FARINAS, 2015). Esta técnica apresenta vantagens notáveis em relação a facilidade no controle e monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH, oxigênio dissolvido, troca de calor do sistema, redução da degradação do produto, além de permitir o controle da fonte de carbono e retirada do produto do meio (KUMAR; HARIDAS; SABU, 2018).

Entretanto o processo de formulação de um fármaco fibrinolítico é complexo e envolve várias etapas para purificação da enzima, sendo este um dos grandes desafios para indústria biotecnológica, pois as enzimas fibrinolíticas necessitam de um alto grau de pureza, possuem um alto custo de obtenção, apresentam estabilidade em condições fisiológicas e especificidade. Nesse sentido é ideal buscar novas abordagens de procedimentos com baixo custo e com elevado fator de purificação (YEGIN et al., 2012). O sistema de duas fases aquosas (SDFA), é uma técnica de purificação que vem sendo utilizado como um método promissor não convencional, e eficiente, sendo amplamente utilizado para recuperação de produtos biológicos, no qual apresenta diversas vantagens como, facilidade na operação, ecologicamente correto, rápida transferência de massa e diminuição de operações unitárias (FERREIRA et al., 2012; PIMENTEL et al., 2013).

Dessa forma, percebemos a relevância na busca por novas fontes enzimáticas e dos processos de otimização das condições de fermentação para se obter um máximo rendimento e pureza das enzimas. Esta necessidade leva a seleção de novas espécies fúngicas produtoras de protease fibrinolítica, extração por SDFA, de forma isolada e integrada com a fermentação, análise das condições de produção e caracterização bioquímica da enzima extraída.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteases

As proteases destacam-se como um grupo importante de enzimas que desempenham a função de catalisar a hidrólise das ligações peptídicas em uma molécula de proteína. (ZAMAN et al., 2023). Essas enzimas estão presentes em todos os organismos e são comumente utilizadas no tratamento trombolítico, síntese de peptídeos, produção de nutrientes, crescimento, proliferação celular, regulação do processamento de proteínas e degradação de proteínas anormais ou danificadas das células (MATKAWALA et al., 2019).

Deste modo as proteases constituem uma grande família que diferem em sua especificidade ao substrato, mecanismo catalítico e sítio alvo. Podem ser classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, natureza química do sítio ativo e com base na faixa de pH (ácidas, neutras e alcalinas) em que apresentam maior atividade (SALWAN END SHARMA, 2019). Tais enzimas podem ser subdivididas em exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação, onde quebram os peptídeos terminais ou os peptídeos distantes dos terminais. Com relação ao seu mecanismo de ação, são divididas em serino-protease, cisteíno-protease, aspártico-proteases, treonino-protease, metalo-proteases, glutamino-protease e ainda existem aquelas proteases cujos resíduos envolvidos na catálise são desconhecidos (HARISH E UPPULURI, 2018).

Diversas proteases são classificadas como serino e cisteíno proteases e seus mecanismos de reações catalíticas envolvem os grupos funcionais de aminoácidos como a hidroxila da serina e o enxofre da sulfidril da cisteína como nucleófilos, essas enzimas conseguem hidrolisar as ligações peptídicas em seu sítio ativo, através desses resíduos muito reativos, (SOUZA et al., 2015). Enquanto as aspártica-proteases contém dois resíduos de ácido aspártico que ativam a molécula de água mediando o ataque sobre a ligação peptídica e as metalo-proteases possuem um íon de zinco no sítio ativo catalítico ligado por duas histidinas e um glutamato no centro ativo (BOZIN et al., 2023). Já o mecanismo de ação da treonino-protease é fornecido por uma tríade catalítica onde um resíduo de histidina é usado para ativar uma

treonina, lisina e ácido glutâmico como nucleófilo, ou através da formação de uma molécula de água nucleofílica capaz de atacar o grupo carbonila da ligação peptídica. Essas treonino-proteases estão presentes no proteossoma das células e são responsáveis pela sua manutenção, tendo a função de quebrar as proteínas indesejadas ou danificadas (MOFFITT; MARTIN; WALKER, 2010).

As enzimas proteásicas fazem parte de uma das maiores famílias utilizadas na bioengenharia e biotecnologia, sendo amplamente aplicadas nos setores industriais como: nas indústrias de detergentes, alimentos, têxteis, couro, farmacêuticas, cosméticos, diagnósticos, tratamento de águas residuais e na recuperação de íons metálicos, têm sido utilizado proteases como uma ferramenta de produção, recuperação de produtos e subprodutos (SUN et al., 2016). Dessa forma, as proteases podem servir como uma alternativa mais ecológica, substituindo o uso de produtos químicos tóxicos nas indústrias, já que mostraram estabilidade em relação às amplas mudanças físicas e químicas no ambiente (SUJITHA et al., 2018). Todavia, o custo da enzima desempenha um papel crítico, delimitando o uso de proteases para várias aplicações. Grande parte desse custo é justificado pelos meios de produção e pelas etapas envolvidas no processamento e purificação da enzima (ABDULLAH AL-DHABI et al., 2020).

Diante de tanta diversidade a busca por diferentes produtores de enzimas tem sido uma tarefa importante para os pesquisadores, pois essas enzimas possuem um papel fundamental no metabolismo de organismos. Elas podem ser isoladas de diferentes fontes (animais, plantas e micro-organismos), destacam-se como grandes produtores as bactérias do gênero *Bacillus* (SUBERU et al., 2019) e fungos dos gêneros *Aspergillus*, e *Rhizopus*, muito utilizados em processos biotecnológicos (SILVA, et al., 2017; HSIAO et al., 2014).

Dentre os micro-organismos, particularmente os fungos filamentosos são excelentes fontes para a produção de enzimas, pois possuem uma enorme diversidade bioquímica apresentando vantagens técnicas e econômicas, incluindo: fácil cultivo e manipulação, rápido crescimento, necessitando de pouco espaço para o seu cultivo, são passíveis à manipulação genética e podem crescer em meios de cultura sólidos e líquidos. Os fatores como temperatura, composição do meio e pH são primordiais para obtenção de enzimas de interesse industrial, já que as enzimas se mantêm ativas em uma ampla faixa de pH (4 a 11) além de exibir vantagens como:

ampla especificidade ao substrato (PIRES et al., 2019) e algumas espécies são consideradas GRAS (Generally recognized as safe) geralmente reconhecidas como seguros para utilização na saúde (SHARMA et al., 2019).

2.2. Aplicações de proteases e seu mercado comercial

A globalização impulsiona o crescimento do mercado de enzimas industriais que foi avaliado em mais de US \$ 6.000 milhões em 2021 e está projetado para registrar um crescimento de mais de 6% durante o período de previsão (2022-2027), segundo a ResearchAndMarkets. As enzimas são biocatalisadoras muito empregadas em processos industriais e biotecnológicos, com grande relevância econômica no mercado (CHAPMAN et al., 2018). Entre essas enzimas, as proteases destacam-se por apresentar grande versatilidade de aplicações devido à sua atividade e estabilidade em condições operacionais adversas, elas representam um dos maiores grupos de enzimas industriais e está projetado para atingir US\$ 16,9 bilhões até 2027 (SNEHAL MANJREKAR, TRUPTI WADEKAR E ONKAR SUMANT, 2021).

Quase 2% do genoma total de células codificam proteases necessárias para várias funções metabólicas e fisiológicas, além disso as proteases são amplamente utilizadas no setor industrial, sendo o biocatalisador dominante e mais vendido (SUJITHA et al., 2018). O mercado de proteases possui diversas aplicações tanto para uso industrial usada em produtos de limpeza, alimentos e bebidas, quanto para uso farmacêutico com proteases que apresentam funções específicas, utilizadas na formulação de medicamentos. A indústria de detergentes é um dos setores com projeção de crescimento, que mais utilizam enzimas proteolíticas nos seus produtos, tornando sua atuação mais eficiente, já na indústria de couro as proteases são utilizadas nas etapas de imersão, depilação e amaciamento (PATYSHAKULIYEVA, 2021). Nas indústrias de alimentos e bebidas, com estimativa de aumento proporcional a utilização dessas enzimas nos diversos segmentos (SNEHAL MANJREKAR, TRUPTI WADEKAR E ONKAR SUMANT, 2021).

Nessa indústria alimentícia as proteases podem ser aplicadas no melhoramento de alimentos proteicos, já na fabricação de queijos, essas enzimas atuam prevenindo a coagulação do leite hidrolisando as proteínas e nas carnes são

utilizadas como amaciantes; também são utilizadas para reduzir a viscosidade na fabricação de cervejas entre outras aplicações (Tabela 1) (ALVES et al., 2019). Por razões ambientais, diversos setores vêm substituindo o uso de processos à base de produtos químicos por bioprocessos à base de enzimas, que oferecem outras vantagens, como: fácil controle, aumento da velocidade de reação e redução na geração de dejetos (SALWAN E SHARMA, 2019).

Tabela 1 Aplicações de proteases em processos industriais. Fonte: Adaptado de (SALWAN E SHARMA, 2019)

Indústrias	Atuação
Farmacêutica	Produção de cosméticos para pele Fármacos fibrinolíticos
Fotográfica	Recuperação de prata usada em filmes fotográficos
Detergente	Detergentes para lavar roupas com atuação em manchas
Couro	Amaciamento de couro e remoção de pelos
Processamento de alimentos	Modificação de materiais ricos em proteínas, como proteínas da soja ou glúten
Bebidas	Clarificação de bebidas
Laticínios	Processamento das proteínas do soro do leite, produção de enzimas modificadoras do queijo.

O Brasil consome cerca de 60% do total de enzimas da América Latina, importando muito mais (86%) do que exporta (14%). Isso demonstra um atraso tecnológico em relação à produção nacional de biocatalisadores. A expansão na produção dos biocatalisadores é de extrema relevância para o crescimento do Brasil, não apenas pelo mercado interno promissor, mas também por possuir o conhecimento necessário das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, por processos fermentativos e extrativos, assim como a maior biodiversidade do planeta como fonte de novas biomoléculas (REZENDE, SOCCOL E FRANÇA, 2016). Para atender à crescente demanda e reduzir os custos com importação das enzimas, são

necessários investimentos que despertem o interesse na busca por novas fontes e o desenvolvimento de tecnologias que combinem o desenvolvimento tecnológico com o uso de matérias-primas, para a produção em larga escala e purificação.

2.3. Proteases fibrinolíticas

As proteases fibrinolíticas são enzimas importantes no tratamento trombolítico para dissolução de coágulos sanguíneos (trombos), pois possuem a capacidade de degradar a fibrina, principal componente proteico responsável pela coagulação do sangue. A fibrina é formada a partir da ação da trombina convertendo o fibrinogênio em fibrina e normalmente encontra-se em equilíbrio no organismo (CHOI et al., 2011). A plasmina (EC 3.4.2.1.7) é a única enzima presente no sangue com capacidade de degradar e remover os coágulos de fibrina naturalmente. É uma serino-protease terminal produzida a partir de uma pré-enzima inativa (plasminogênio) que consegue romper a rede de fibrina (CHAPIN E HAJJAR, 2015). No entanto, um desequilíbrio causado por alguns distúrbios pode resultar na falha da dissolução desses coágulos, levando à formação dos trombos e conseqüente desenvolvimento de doenças (CHOI et al., 2011).

Após uma lesão vascular os coágulos sanguíneos são formados em resposta ao mecanismo de proteção do corpo humano que impede hemorragias, bloqueando o fluxo sanguíneo nos vasos. Ao mesmo tempo, em condições homeostáticas, esses coágulos de fibrina são hidrolisados por enzimas fibrinolíticas (trombina e plasmina) para garantir o fluxo sanguíneo uniforme (LEITE et al., 2019). Essas obstruções no sistema venoso e/ou arterial podem ocasionar em diversas doenças cardiovasculares (DCVs), que são um problema crescente em todo o mundo, estando entre as principais causas de morte. Dentre as complicações mais severas estão: infecção miocárdica, trombose venosa profunda e embolia pulmonar (VIJAYARAGHAVAN et al., 2019).

Agentes trombolíticos diretos, como a plasmina, que degrada os coágulos de fibrina sem ativação do plasminogênio, mostraram resultados bioquímicos e pré-clínicos encorajadores para aplicações, sendo uma forma eficaz de superar as desvantagens dos efeitos colaterais causados por outros métodos (Sun et al., 2016). Desta forma, a investigação de novas enzimas fibrinolíticas semelhantes à plasmina de diferentes recursos, com alta especificidade à fibrina, seguras para aplicação e

com baixa toxicidade, que dissolvam efetivamente os coágulos sanguíneos é incentivada (KIM et al., 2015).

2.3.1. Homeostase

Um trombo é uma formação sólida composta pelos constituintes do sangue, que se formam bloqueando o sistema vascular. Eles obstruem o suprimento de oxigênio ao tecido circundante, resultando em sua degradação e morte. Dessa forma, quando a capacidade fibrinolítica é insuficiente, um desequilíbrio entre a deposição de fibrina e a dissolução de fibrina no vaso sanguíneo pode persistir levando a um quadro de trombose (WEINMANN E SALZMAN, 2018). Os trombos quando formados, podem ser transportados para diferentes locais através da corrente sanguínea, bloqueando os vasos, dando origem à condição conhecida como embolia (GUYTON & HALL., 2017). Podem se manifestar na forma de distúrbios tromboembólicos variados, sendo classificados de acordo com a localização da obstrução em acidente vascular cerebral (AVC), embolia pulmonar (EP), trombose venosa profunda (TVP), trombose arterial (TA), infarto agudo do miocárdio (IAM) e oclusão da veia central da retina (OVCR) (STEWART; KLINE, 2020).

Para manter a vida é imprescindível ter um fluxo sanguíneo ininterrupto por todo o corpo, que é controlado por um conjunto de mecanismos denominados hemostasia, responsável por manter o fluxo uniforme nos vasos sanguíneos e, também, por impedir extravasamentos quando estes sofrem danos. Tal processo envolve cerca de 30 proteínas diferentes em um conjunto complexo de reações, estas convertem uma proteína solúvel, fibrinogênio em fibrina, que em conjunto com as plaquetas formam um trombo estável. Existem vários modelos explicativos da cascata de coagulação, o modelo clássico foi introduzido em 1964 por MacFarlane, que conta com duas principais vias de coagulação em cascata, a via intrínseca e extrínseca, que se encontram em algum ponto para formar a via comum (KERAGALA et al., 2018).

O processo de coagulação é um processo complexo realizado por um uma série de fatores que compreende algumas vias. Esses fatores circulam livremente pela corrente sanguínea como um precursor enzimático inativo e são ativados em serina proteases que agem como um catalisador para clivar o próximo precursor em mais serina protease e, então, ativar o fibrinogênio. A via intrínseca consiste nos fatores I

(fibrinogênio), II (protrombina), IX (fator de coagulação), X (fator de Stuart-Prower), XI (tromboplastina plasmática e XII (fator de Hageman). Esta via começa com a clivagem do fator XII (serina protease inativa) para formar o XIIA (serina protease ativada), que é ativada através da exposição do colágeno endotelial quando ocorre dano. A partir disso o fator XIIA atua como catalisador para ativar outros fatores como uma cascata de ativação para então formar o fator Xa (trombinase) (HOFFBRAND; MOSS, 2018).

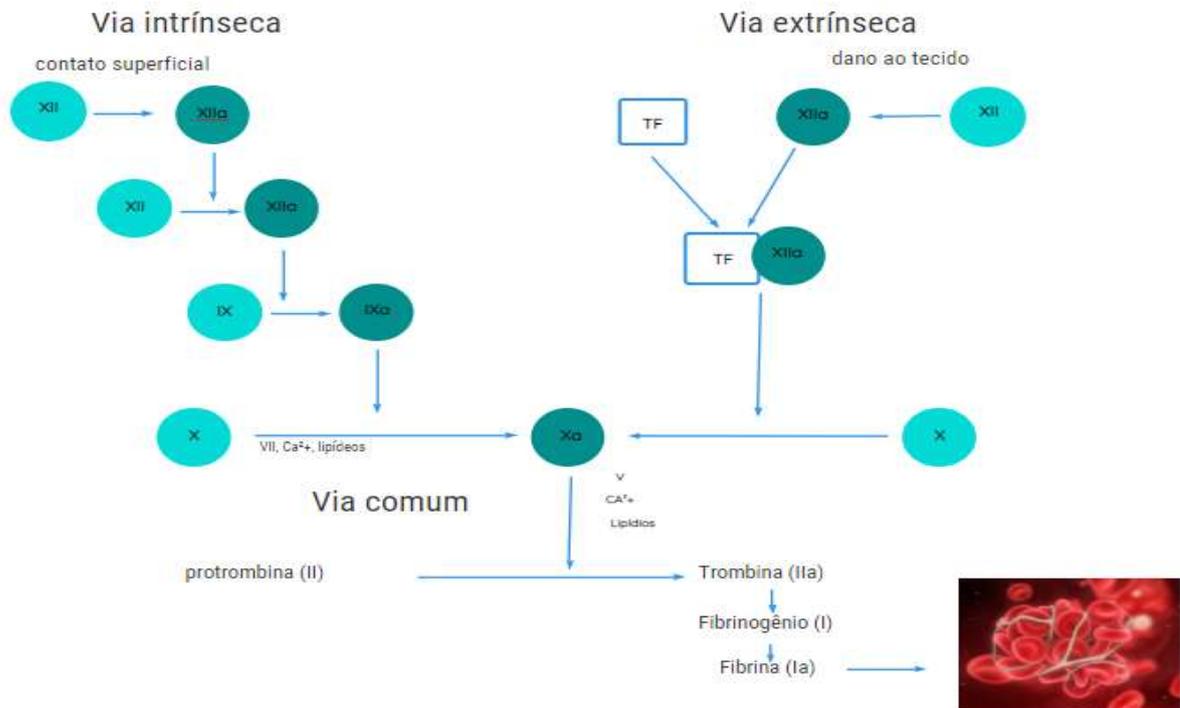
Já a via extrínseca é mais curta e consiste nos fatores I, II, VII (fator estável) e X que é ativada através do fator tecidual (FT), liberado pelas células endoteliais após qualquer dano externo, esse FT por sua vez ativa o fator VII em fator VIIa, que ativa outros fatores até chegar ao fator Xa, este é o momento em que as vias extrínsecas e intrínsecas se tornam uma levam a formação de uma malha de fibrina que estabiliza o tampão plaquetário. Tal fator Xa desempenha um papel central na cascata de coagulação porque constitui o ponto onde as vias intrínseca e extrínseca convergem formando a via comum, essa via comum consiste nos fatores I, II, V, VIII, X, que começa com a ativação do fator X (protrombinase) em XA através da tanase que também facilita a ativação do fator II (protrombina) em IIA (trombina), em seguida o fator II ativa o fibrinogênio em fibrina (Figura 1). Logo as subunidades de fibrina se unem para formar filamentos de fibrina e o fator XIII atua nesses filamentos formando uma malha. Esta malha de fibrina ajuda a estabilizar o tampão de plaquetas e origina o coágulo sanguíneo (CHAUDHRY E BABIKER, 2018).

Como descrito, esse modelo clássico exemplifica a cascata com ativação de cada fator de coagulação é efetuada por outros fatores ativados anteriormente em reações sucessivas que culminam com a formação da fibrina e conseqüentemente, do coágulo. Porém o modelo clássico proposto não é capaz de explicar adequadamente os mecanismos que conduzem o processo hemostático in vivo. Desta forma foi proposto um novo modelo para cascata de coagulação baseado em superfícies celulares (HO E PAVEY, 2017).

O novo modelo de cascata inclui as interações importantes entre as células diretamente envolvidas na hemóstase enfatizando a interação de fatores de coagulação com plaquetas e células portadoras de fator tecidual (Figura 1). Tal modelo representa de forma mais exata a interação entre a atividade celular e as proteínas de coagulação que resultam na formação de um trombo. O modelo celular

ocorre em um processo de três fases que se sucedem: iniciação (I), amplificação (II) e formação da fibrina (Figura 2) (FERREIRA et al., 2010).

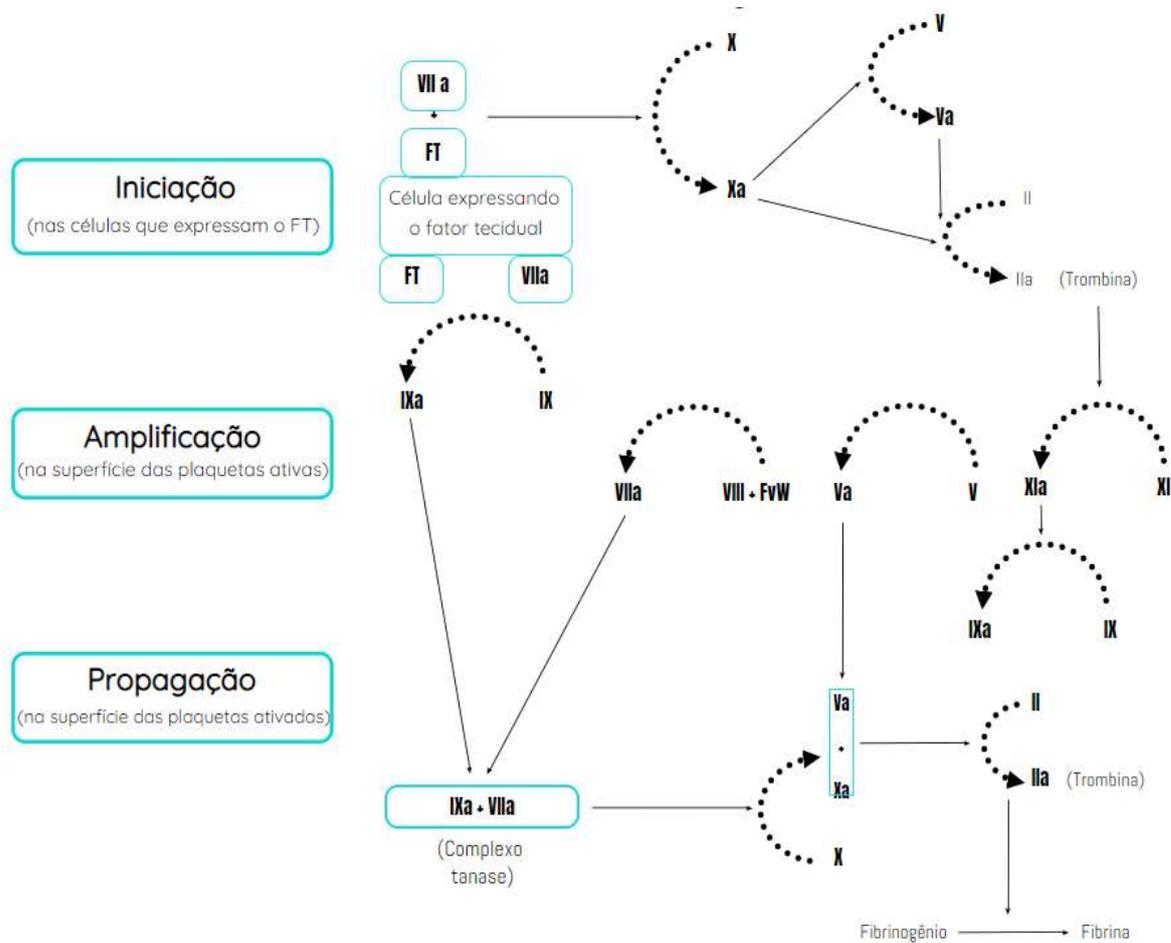
Figura 1- Modelo clássico da cascata de coagulação Fonte: Adaptado de (HOFFBRAND; MOSS, 2018)



No momento em que um vaso é danificado ocorre um sangramento e as plaquetas presentes no fluxo sanguíneo unem-se ao colágeno e outros elementos da matriz extracelular resultando em um tampão plaquetário, nessa fase (I) o fator FVII circulante no sangue é ativado quando entra em contato com células portadoras de fator tecidual (FT), formando o complexo FVIIa/FT, responsável pela ativação de FIX e FX. Por sua vez, o FXa ativa o FV que também pode ser ativado por proteases não coagulantes, resultando em FVa necessário para o complexo (protrombinase). Esse processo é responsável por transformar uma pequena quantidade de protrombina em trombina, uma proteína do tipo serino-protease (EC 3.4.21.5) que age na conversão do fibrinogênio em fibrina (CASTRO et al., 2011). Na fase de amplificação uma pequena quantidade de trombina ativa as plaquetas e o complexo protrombinase provoca um aumento na produção de trombina.

Figura 2- Exemplificação da cascata de coagulação baseada em superfícies celulares

Fonte: Adaptado de (FERREIRA et al., 2010)



A formação de coágulos e sua lise é regulada por homeostase, em qualquer circunstância, se essa homeostase é perturbada, coágulos sanguíneos ou trombos podem circular na corrente sanguínea, mesmo quando um vaso sanguíneo não está danificado. O processo de dissolução dos coágulos denomina-se fibrinólise, e é mediado pela enzima plasmina, que circula na forma de seu zimogênio inativo, o plasminogênio, sendo a principal protease responsável por degradar a fibrina e o fibrinogênio (ARBIND; JAGDEEP, 2011).

2.3.2. Agentes fibrinolíticos

Uma terapia eficaz para o tratamento de doenças trombóticas deve se fundamentar na degradação rápida dos coágulos evitando danos aos tecidos, a fim

de aumentar a taxa de sobrevivência das células. Algumas das estratégias terapêuticas usadas para dissolver os coágulos sanguíneos incluem a utilização de anticoagulantes comerciais como Pradaxa® ou Morevan® (etexilato de dabigatrana), Xarelto® (rivaroxabana) e Eliquis® (apixabana), que agem bloqueando as etapas da cascata de formação de fibrina, sendo amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares (ANDRADE et al., 2018). No entanto, o uso desses anticoagulantes está associado ao risco de sangramento, principalmente em pacientes que sofrem de hemorragia intracerebral (LEITE et al., 2019).

Outras opções incluem a utilização de drogas antiplaquetárias Aspirina®, Clopidogrel® e Ticlopidina® esses agentes agem bloqueando o vaso sanguíneo e inibem a agregação plaquetária e sua ativação, impedindo que a trombose evolua (KOTB, 2014). No entanto esses medicamentos possuem preços elevados, podem ser ineficientes para o tratamento por não agir diretamente no coágulo existente, além de ter o risco comprovado de apresentar efeitos colaterais como: complicações neurológicas, hemorragias, desconforto gastrointestinal, queda de cabelo e fibrinólise sistêmica e a utilização de intervenção cirúrgica para remoção do trombo quando o medicamento falha se torna um procedimento invasivo e arriscado propenso a complicações (MOULA ALI E BAVISETTY, 2020).

Os agentes fibrinolíticos também atuam na dissolução da malha de fibrina, sendo alternativas para o tratamento de doenças. Seu mecanismo de ação pode acontecer de duas formas diferentes para potencializar a lise dos coágulos. Os ativadores do plasminogênio ativam a plasmina para que esta possa exercer sua função e as enzimas semelhantes à plasmina atuam na degradação do trombo. Dentre os trombolíticos disponíveis na clínica, grande parte são ativadores de plasminogênio (APs), sendo a terapia trombolítica com estes agentes uma abordagem padrão no tratamento de doenças cardiovasculares, geralmente aplicada para conter de forma rápida a carga do trombo (KIM et al., 2015).

Atualmente, existem vários agentes fibrinolíticos disponíveis para uso clínico: Streptase® (estreptoquinase-SK), anistreplase (APSAC), Abbokinase® uroquinase de dupla cadeia (tcu-PA), uroquinase de cadeia única (scu-PA), Alteplase® alteplase(t-PA), e seus derivado: Reteplase® reteplase (r-PA) que são responsáveis por ativarem o plasminogênio em plasmina ativa, para que esta atue degradando à fibrina

(REZENDE, SOCCOL E FRANÇA, 2016). No entanto, os agentes trombolíticos não são isentos de riscos, muitos possuem contra indicação, necessitam de altas doses medicamentosas, possuem tempo de meia vida curto e podem apresentar efeitos colaterais. A complicação mais temida da fibrinólise sistêmica é o sangramento grave, que pode ser fatal. Portanto, o uso desses agentes no tratamento de doenças trombóticas requer um risco cuidadoso *versus* análise de benefícios (STEWART e KLINE, 2020).

Já as enzimas do tipo plasmina atuam diretamente na degradação dos trombos, e podem ser obtidas a partir de fontes biológicas como: fungos e bactérias, por métodos econômicos, simples e eficazes. Desta forma, a pesquisa para obtenção de novos agentes fibrinolíticos é importante para propor alternativas eficientes para o tratamento da trombose, logo, as enzimas fibrinolíticas descobertas por uma infinidade de micro-organismos ganham atenção, sendo uma alternativa promissora para a terapia trombolítica (WEINMANN E SALZMAN, 2018).

2.4. Fontes de enzimas fibrinolíticas

A enzima fibrinolítica pode ser obtida a partir de uma diversidade de fontes: alimentos fermentados (DEEPAK et al., 2010), plantas (SILVA et al., 2020), insetos (AHN et al., 2003), algas (SILVA et al., 2018) e micro-organismos principalmente fungos e bactérias (XIAO-LAN et al., (2005), (SALWAN & SHARMA, 2019), que foram estudados por apresentarem propriedades fibrinolíticas. Dentre os micro-organismos, o gênero *Bacillus* foi relatado como um dos principais produtores de enzima fibrinolítica, sendo encontrado principalmente nos alimentos fermentados (MOULA ALI E BAVISETTY, 2020).

Por causa dos benefícios biológicos do consumo de alimentos fermentados as fontes microbianas ganharam importância especial devido as suas propriedades benéficas, como alta especificidade ao substrato e baixo custo de produção, sendo esses alimentos, as primeiras fontes de enzimas fibrinolíticas. Por exemplo o Natto de origem japonesa, fermentado com o auxílio de bactérias da espécie *Bacillus subtilis*, que através da fermentação produz a enzima *nattoquinase*, com um alto poder de dissolução dos coágulos de fibrina (DEEPAK et al., 2010), o *Douche* um alimento tradicional chinês de soja preta e o *Doenjang*, comida tradicional coreana de soja

ambos obtidos através da fermentação por bactérias do gênero *Bacillus* (KUMAR et al., 2014).

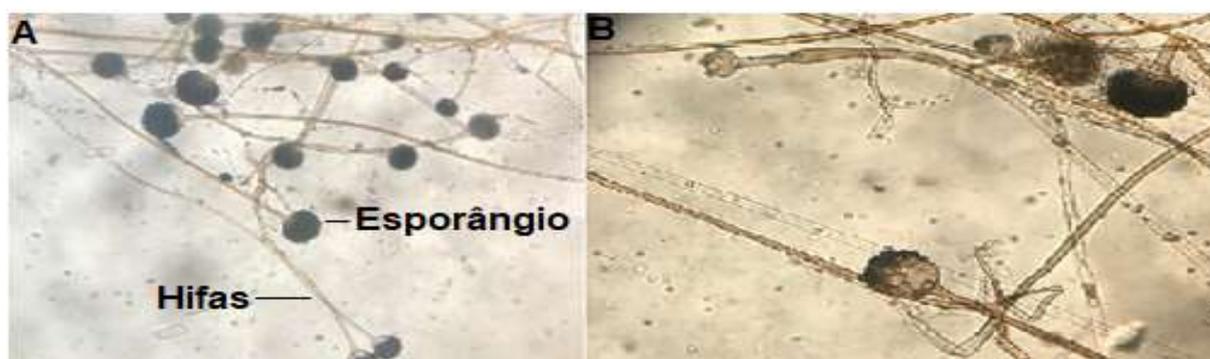
Além disso, outros organismos como as plantas do gênero *Euphorbia hirta* também possuem enzimas capazes de degradar os coágulos sanguíneos (PATEL et al., 2012). As enzimas fibrinolíticas também foram isoladas de animais, a partir do veneno de cobra (VIVAS et al., 2016) e extraída de minhocas (WANG et al., 2011). Já os fungos filamentosos, cianobactérias (Silva-Stenico et al., 2012) e plantas (A. V. DA SILVA et al., 2020) apresentaram excelentes resultados para produção de agentes fibrinolíticos e são utilizados para aplicação nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (THOMAS et al., 2013).

Enzimas fibrinolíticas de origem microbiana ganharam importância considerável devido à sua alta especificidade, facilidade no processamento, além disso apresentam inúmeras vantagens, pois os fungos secretam enzimas em grandes quantidades e possuem crescimento rápido, necessitam de pouco espaço para o cultivo, possuem alta produtividade, baixo custo de produção, um rápido desenvolvimento e é possível fazer manipulação genética e a enzima resultante pode ser modificada e recuperada mais facilmente já que a produção de enzimas ocorre extracelularmente, o que torna particularmente mais fácil recuperar posteriormente (PATYSHAKULIYEVA, 2021).

Dentre os micro-organismos destacam-se os fungos filamentosos em especial os representantes do gênero *Rhizopus* e *Mucor* que possuem grande potencial para produção de diversas moléculas bioativas, inclusive proteases fibrinolíticas (NASCIMENTO et al, 2015).

O gênero *Rhizopus* é composto por micro-organismos sem septos em suas hifas e por isso é descrito como primitivo. As espécies pertencentes a este gênero são filamentosas e saprófitas, que consomem nutrientes orgânicos em decomposição (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019). O fungo *Rhizopus* se desenvolve na superfície de alimentos, apresentando colônias com coloração acinzentada, apresentam micélio extenso composto por estruturas: esporos, esporângio, columela, esporangioforo e hifas (Figura 3) ZHENG et al., 2007).

Figura 3- Microscopia das estruturas morfológicas do micro-organismo *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 nas objetivas de 10x (A) e 40x (B). (Fonte a autora)



As espécies pertencentes ao gênero *Rhizopus* são de considerável interesse para a indústria na produção de enzimas. Com isto, pesquisas buscam desenvolver a produção de diferentes enzimas protease alcalina (Negi et al., 2020), protease aspártica (Hsiao et al., 2014) e enzimas fibrinolíticas (Jia-min et al., 2020), (Zhang et al., 2015). Espécies do gênero *Rhizopus* têm sido utilizadas em processos biotecnológicos e reconhecidas na literatura como produtoras de proteases fibrinolíticas (Tabela 2).

Tabela 2- Utilização de espécies do gênero *Rhizopus* para produção de enzimas e suas condições de cultivo

Micro-organismos	Enzima	Tipo de fermentação	Atividade U/mL	Referências
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	Fibrinolítica	FS	324.7±16.2	(ZHANG et al., 2015)
<i>Rhizopus chinensis</i> 12	Fibrinolítica	NI	17122	(JIA-MIN et al., 2020)
<i>Rhizopus orizae</i> FNCC 6078	Fibrinolítica	FS	NI	(NEGI, JAIN e RAJ, 2020)
<i>Rhizopus chinensis</i> 12	Fibrinolítica	FES	160.000	(XIAO-LAN et al., 2005)
<i>Rhizopus crosporus</i> Var <i>oligosporus</i>	Protease	FS	521.739	(SARAO et al., 2010)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Protease	FES	321.100	(KUMAR et al., 2005)

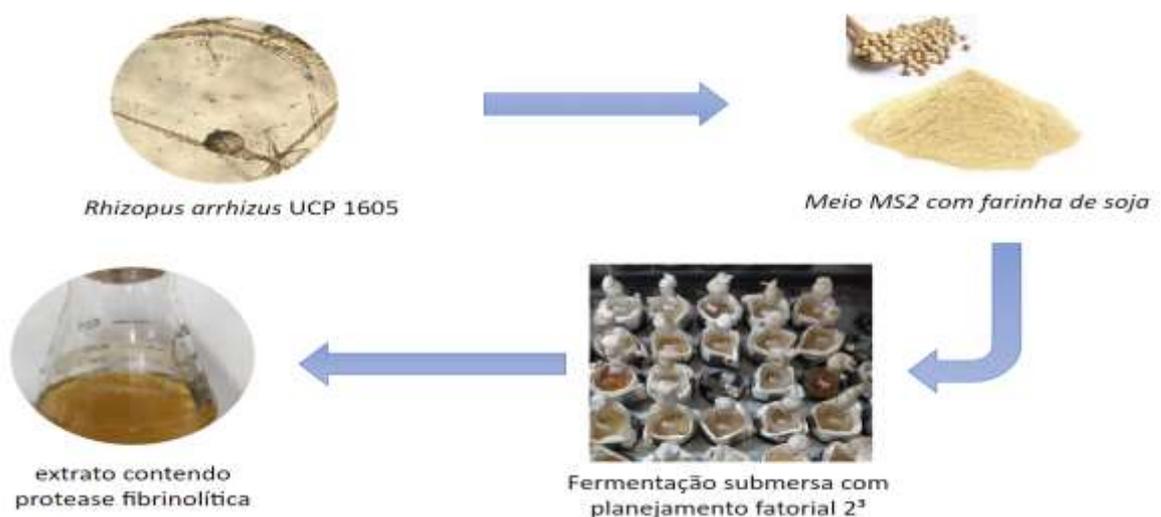
*FS= Fermentação submersa, FES= Fermentação em estado solido, *NI= Não informado

2.5. Fermentação submersa

Existem diferentes tipos de micro-organismos usados no processo de fermentação submersa, incluindo, fungos, leveduras e bactérias. Os gêneros fúngicos mais relatados em FS são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que têm uma extensa lista de espécies para a produção de vários bioprodutos (EL-BAKRY et al., 2015). Esses micro-organismos são os mais utilizados devido à sua diversidade bioquímica conseguindo sintetizar uma variedade de enzimas. Em geral a fermentação líquida tem sido utilizada para aumentar a expressão e síntese comercial de várias enzimas industriais e os processos biotecnológicos para produção têm se mostrado como uma tecnologia promissora (KUMAR, HARIDAS E SABU, 2018).

A fermentação submersa é caracterizada por um processo em que os micro-organismos crescem com presença de água em excesso no meio e que apresenta vantagens notáveis em relação a facilidade no controle e monitoramento dos parâmetros de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e troca de calor do sistema. Também reduz a degradação do produto, em especial enzimas com baixa termo estabilidade, facilita a concentração de nutrientes solúveis em água, a separação da biomassa após a fermentação, além de permitir o controle da fonte de carbono e retirada do produto do meio, evitando a repressão catabólica (Figura 4) (KOTB, 2012)

Figura 4- Produção de enzima fibrinolítica por fermentação submersa. (Fonte a autora)



Para aplicação com sucesso nos setores comerciais e das indústrias de medicamentos, a escolha do melhor meio de cultivo para produção de biomoléculas em larga escala é de suma importância para o desenvolvimento de enzimas eficientes. Sendo a seleção dos componentes desse meio um dos fatores determinantes para uma alta produção das enzimas fibrinolíticas, já que os micro-organismos possuem fisiologia e características diferentes. Além disso, para atender à crescente demanda das indústrias por enzimas, aumentar o rendimento e reduzir os custos é importante para a aplicação comercial de uma enzima economicamente viável (SINGH E BAJAJ, 2016).

As proteases são aplicadas em vários processos industriais, no entanto o custo de produção dessas enzimas e o processo de purificação são os principais fatores que limitam sua utilização na medicina e indústria. Na tentativa de reduzir os custos com o processo de produção e diminuir a poluição ambiental, muitas pesquisas são direcionadas para utilização de agro-resíduos como substratos úteis para a produção de enzimas especificamente na fermentação submersa (FS) (SADH et al., 2018). Portanto, componentes como farelo de soja e amido de mandioca (PAN et al., 2019), esterco de vaca (VIJAYARAGHAVAN et al., 2019), dentre outros (farelo de trigo, casca de arroz, farelo de arroz), foram utilizados para aumentar a produção das enzimas fibrinolíticas (BAJAJ et al., 2014). No entanto para apoiar a utilização desses diferentes substratos é necessário realizar pesquisas, já que vários fatores físico-químicos como: temperatura, pH, aeração, atividade em água, natureza do substrato sólido e seu tamanho de partícula afetam o crescimento, a produção dos micro-organismos e os meios de cultura (PAN et al., 2019).

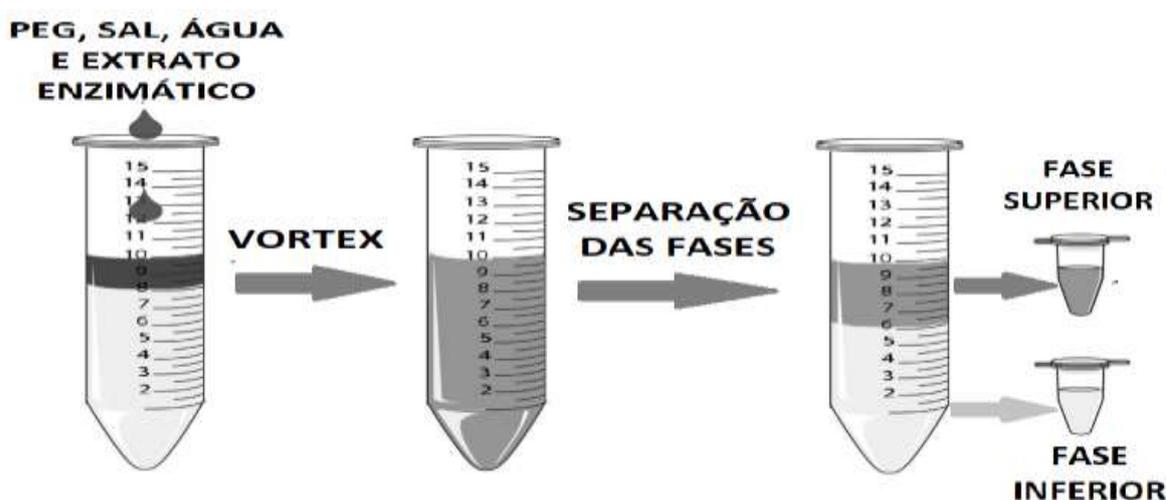
Os fungos da ordem *Mucorales* possuem grande potencial biotecnológico para a produção de proteases fibrinolíticas e visando a produção comercial destacam-se por produzir proteases com atividade fibrinolítica com alto poder de ação e possibilidade de produção em larga escala, facilitando a produção e purificação deste bioproduto. Além de apresentarem vantagens como a produção extracelular, permitindo assim uma redução nos custos operacionais e facilidade na extração e purificação (PAN et al., 2019).

2.6. Sistema de duas fases aquosas

A purificação de uma biomolécula é composta por um processo com diferentes partes ordenadas, sendo necessário pesquisar a técnica mais apropriada para cada etapa da purificação, visando a obtenção de um alto rendimento e pureza (JIANG et al., 2020). Sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma técnica utilizada na extração, separação e purificação de biomoléculas em apenas uma etapa, sendo relatado como um método alternativo e eficaz para concentração e purificação de diversas enzimas com potencial para indústria, fornecendo um ambiente não desnaturante, uma atividade enzimática aprimorada (MOULA ALI; BAVISETTY, 2020).

Martinus Beijerinck em 1896, descreveu a formação do sistema de duas fases aquosas (SDFA) pela primeira vez, quando acidentalmente misturou uma solução aquosa de amido e gelatina, que agitando em certas concentrações formam misturas turvas e quando em repouso apresentaram duas fases (FIGURA 5). A fase inferior era rica em amido e a superior rica em gelatina, tendo a água como componente em maior quantidade nas duas fases. Posteriormente, (ALBERTSSON, 1985) descobriu sua aplicação real e descreveu o uso do SDFA ao misturar polietileno glicol (PEG), dextrana e água na purificação de cloroplastos.

Figura 5- Produção do sistema de duas fases aquosas usando PEG/citrato de sódio. (Fonte a autora).



Essa técnica de separação líquido-líquido, é baseada no fenômeno simples de imiscibilidade de duas soluções aquosas e pode ser formado pela mistura de uma diversidade de componentes em água como: polímero/sal (fosfato, sulfato e citrato)

ou polímero/ polímero (dextrana, amido e derivados de celulose). O alto teor de água presente em ambas as fases do sistema torna o meio propício para extração da molécula de interesse, pois preserva estrutura e confere estabilidade molecular (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

O SDFA proporciona certas vantagens, pois viabiliza o ambiente compatível, tem baixo custo, capacidade de operação contínua, facilidade de escalonamento eficiente para muitos tipos de experimentos, especialmente para a concentração e purificação de biomoléculas (IQBAL et al., 2016). Com isso, a simplicidade da técnica faz do SDFA um processo atrativo e de fácil reprodução em larga escala para extrair enzimas de interesse comercial, já que os componentes do sistema quando se separam favorecem o particionamento do produto biológico para uma das fases e através de planejamento experimental, é possível definir os parâmetros que levam a uma separação ideal (DA SILVA et al., 2019). São diversos fatores que influenciam o comportamento da partição das biomoléculas no SDFA:

2.6.1. Efeitos da massa molar e concentração do polietilenoglicol

Os efeitos da massa molar do polímero e sua concentração influenciam bastante a partição das moléculas. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero frequentemente usado em um SDFA e possui propriedades físicas e químicas favoráveis, que influenciam no comportamento das biomoléculas, sendo um “polidisperso” que, devido à sua distribuição normal de comprimentos de cadeia e moléculas, pode reagir com uma variedade de grupos funcionais localizados nas extremidades terminais de biopolímeros, como as proteínas (ASENJO; ANDREWS, 2011). Outro efeito observado é o efeito de volume de exclusão na fase rica em polímero, o qual sugere que o volume ocupado pelo mesmo aumenta com qualquer concentração de polímero ou massa molar, que empurra as moléculas para partição na fase rica em sal (FERNANDES et al., 2020).

Geralmente em um sistema bifásico, a partição das moléculas diminui com o aumento da concentração do polímero. Por exemplo, as proteínas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com massa molar menor, isso acontece devido ao

aumento da massa molar do polímero reduzindo os grupos hidrofílicos (ASENJO; ANDREWS, 2011).

2.6.2. Hidrofobicidade na partição de biomoléculas

Os efeitos das interações hidrofóbicas têm um papel importante no fracionamento de proteínas na maioria dos SDFAs. Os efeitos *salting-out* e o efeito hidrofóbico da fase estão relacionados com as propriedades químicas dos componentes do sistema. Em um SDFa composto por polímero-sal, a hidrofobicidade da fase pode ser manipulada deslocando a curva binodal, onde altas concentrações de sal alteram o diagrama de fases. Logo, a adição de sal no sistema tem um efeito significativo no coeficiente de partição, pois esses sais contêm íons de diferentes hidrofobicidade e os íons hidrofóbicos forçam a partição da molécula para a fase com maior hidrofobicidade e vice-versa (IQBAL et al., 2016).

2.6.3. Efeitos da adição de sais

O efeito da adição de sal na partição das moléculas em SDFa é outra variável de grande importância. A adição de sais, mesmo que em concentrações milimolares, influencia fortemente a partição de materiais eletricamente carregados. Embora os sais se separem igualmente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição das proteínas em função do tipo de sal, logo diversos íons vão demonstrar afinidade diferente pelas fases (ASENJO; ANDREWS, 2011).

Em sistemas PEG/sal, a adição de outros sais interfere no coeficiente de partição, pois existe uma partição desigual entre eles, formando uma diferença de potencial elétrico. Em baixa concentração de sal é possível observar fenômenos como o do volume excluído, no entanto um aumento na concentração de sais gera uma diminuição desse efeito devido a perda da água ligada ao polímero (HATTI-KAUL, 2001; ASENJO; ANDREWS, 2012)

2.6.4. Efeito da temperatura

A temperatura é outro parâmetro frequentemente estudado que pode variar de acordo com o tipo de sistema utilizado. Maiores temperaturas causam uma maior exposição dos grupos hidrofóbicos das macromoléculas de PEG resultando em áreas bifásicas maiores, as alterações de temperatura também afetam a partição através da viscosidade e densidade (AMID, MANAPA E MUSTAFA, 2013).

Geralmente a separação das fases em um sistema polímero – polímero é obtida em uma temperatura mais baixa, já para o PEG – sal, ocorre o efeito oposto, pois em temperaturas maiores a separação das fases do sistema é facilitada e o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (WALTER; JOHANSSON, 1994).

2.6.5. Efeito do pH

O pH influencia as interações eletroquímicas e em um SDFa pode alterar as propriedades de carga do soluto, o que afeta a partição da biomolécula. Mudanças no pH também podem induzir mudanças conformacionais na estrutura das enzimas, causando mudanças no comportamento da separação alterando a afinidade. O pH do sistema pode ser manipulado, a fim de promover a separação seletiva da biomolécula. Foi relatado que a partição da biomolécula com carga negativa em um sistema de pH alcalino aumenta o coeficiente de partição e a biomolécula alvo tende a se direcionar para a fase superior, a utilização de valores de pH acima do ponto isoelétrico em um sistema de pH alcalino aumenta o coeficiente de partição da proteína e também pode induzir a uma afinidade adicional para a fase rica em PEG (ASENJO; ANDREWS, 2011).

2.7. Fermentação Extrativa

A crescente necessidade de trazer rapidamente para o mercado compostos de alto valor, usados principalmente na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, tem chamado a atenção para novas estratégias de desenvolvimento de bioprocessos. Nesse contexto, uma das tendências para o desenho de processos *downstream* é a integração das operações unitárias (LEONG et al., 2019). Uma etapa importante no projeto de qualquer processo de fermentação bem-sucedido é o desenvolvimento

adequado de um método para o isolamento e purificação do produto desejado. Tal processamento deve garantir que o produto desejado seja separado de dezenas de outros compostos, como produtos metabólicos, precursores, substratos inutilizados, detritos celulares, etc. presentes no caldo de fermentação (BADHWAR, KUMAR E DUBEY, 2019).

Fermentação extrativa com SDFA é uma técnica que permite a recuperação do produto ao longo da fermentação (recuperação *in situ*). Este método tem sido amplamente utilizado em biotecnologia para o crescimento de células microbianas por apresentar alto teor de água e baixa tensão interfacial, sendo também utilizado na extração e purificação de bioprodutos (SALGADO et al., 2014). Esta técnica integra fermentação e extração para superar as limitações de inibição do produto e baixa produtividade volumétrica; então o bioproduto é imediatamente isolado por uma fase após sua biossíntese (SALES et al., 2013).

As duas fases mutuamente imiscíveis são formadas em sistemas bifásicos aquosos (SDFA) pela mistura e incompatibilidade entre dois polímeros ou um sal e um polímero (SILVA, ALVES E PORTO, 2018a). Tal sistema é ideal para a recuperação de produtos hidrofílicos, uma vez que a coexistência de duas permite a pronta separação dos produtos por sistema de particionamento em fases opostas. Em problemas com a inibição por produto, a fermentação extrativa pode ser uma boa solução para o cultivo simultâneo de células e o processamento posterior do produto (SALGADO et al., 2014).

Essa abordagem integrativa não só economiza tempo e custo, mas também reduz o risco de perda de produto durante os processos de separação e purificação individuais. Além disso, as vantagens da fermentação extrativa também incluem a diminuição dos efeitos tóxicos do produto no crescimento microbiano, minimiza os efeitos de desnaturação causados por temperatura e pH e superação de baixa produtividade volumétrica que muitas vezes ocorrem no processo de fermentação submersa. Em ambos os sistemas, a partição da biomolécula é devida à sua afinidade com componentes de fase. Assim, a separação das biomoléculas é influenciada por diversas variáveis como tipo e concentração de sal, massa molar e concentração de polímero, pH e temperatura. (CRUZ FILHO et al., 2020).

Além disso, para produtos como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, organelas celulares, antibióticos, antígenos, etc., a atividade biológica deve ser preservada até a última etapa de purificação. Uma vez que muitas biomoléculas têm limites de tolerância estreitos de pH, temperatura, pressão osmótica, cargas superficiais, etc., um grande desafio é a seleção de uma técnica de extração e isolamento (SILVA, ALVES E PORTO, 2018b). As técnicas de separação de duas fases aquosas possuem as características necessárias para a integração do processo. A fermentação extrativa apoia a exclusão rápida do produto em fases separadas, evitando assim a inibição e degradação do produto em um bioprocessos (BADHWAR, KUMAR e DUBEY, 2019).

2.8. Uso de planejamento experimental em bioprocessos

O desenvolvimento biotecnológico despertou o interesse crescente das indústrias por métodos rápidos, econômicos de produção e purificação de biomoléculas. Esses compostos como enzimas e proteínas são utilizados nos processos de fermentação das indústrias de alimentos, detergentes e na produção de fármacos e existem diferentes tipos de técnicas que podem ser utilizadas para otimizar essas etapas. O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística de grande importância na etapa que precede à execução dos experimentos. Por meio dele é possível avaliar, com um certo nível de confiança se uma ou mais variáveis de um processo são significativas ou não, reduzindo assim o número de ensaios.

Para conseguir produtos com potencial compatível com os de mercado é interessante reduzir os custos de produção, aumentar o rendimento e conseguir um alto fator de purificação. Porém, alguns fatores podem contribuir ou não para a obtenção máxima de recuperação e pureza dessas biomoléculas, dentre eles: selecionar linhagens com potencial, escolher um meio de cultura propício, adotar um método de produção e otimizar as condições de cultivo (CAVALCANTI, 2018).

O processo de purificação costuma ser particularmente desafiador, pois há uma grande variedade de técnicas que podem envolver uma ou mais etapas, modos de operação e condições. Deve-se buscar a técnica mais apropriada para cada estágio da separação, a fim de aumentar o grau de pureza das biomoléculas. Assim, são empregadas técnicas diferentes na remoção de compostos insolúveis ou clarificação,

no isolamento do produto ou captura e na purificação intermediária. Por exemplo, para o isolamento e purificação de enzimas são usadas técnicas como superfície, precipitação, centrifugação, filtração, evaporação, sistema de duas fases aquosas e cromatografia. A utilização do planejamento experimental pode reduzir essas etapas do processo, tornando o experimento mais econômico e direcionado (ZUÑIGA et al., 2003).

O uso de diferentes projetos estatísticos para a otimização do meio tem sido empregado com sucesso, especialmente para a produção de enzimas. Eles provaram ser ferramentas poderosas e úteis, pois o método tradicional de otimização de um fator por vez tem limitações, as variáveis não podem ser contabilizadas durante a sua aplicação, é um método trabalhoso, demorado, além disso, podem ocorrer falhas na detecção de interações entre as variáveis que influenciam a produtividade da enzima. (KUMAR et al., 2018).

Esses métodos permitem selecionar as variáveis controladas por um planejamento fatorial, fornecendo uma série de resultados, incluindo gráficos de probabilidades normais, semi-normais, visualização da superfície de resposta, gráfico de Pareto e avaliação dos pontos ótimos através da função desejada. Esses dados geralmente informam as condições operacionais ideais para desenvolver o experimento (CROWELL et al., 2021).

Uma abordagem alternativa para a otimização são métodos estatísticos que podem estudar vários fatores simultaneamente. Um conjunto adequadamente planejado de experimentos com otimização estatística apresenta diversas vantagens, não apenas reduzindo o tempo e o custo, mas também pode determinar valores ótimos dos fatores. A utilização do método de planejamento fatorial, em estudos que abrangem muitas variáveis, é importante, pois torna possível o planejamento e a realização de maneira organizada de uma quantidade mínima necessária de experimentos, economizando tempo e recursos financeiros. Quando a resposta ou a saída é influenciada por várias variáveis, a otimização pode ser alcançada através de uma coleção de técnicas estatísticas denominadas metodologia de superfície de resposta (MSR) (SINGH E BAJAJ, 2016). A MSR tem sido amplamente utilizada para a produção de várias enzimas, dentre elas, proteases, colagenases e enzimas

fibrinolíticas. Portanto, procurar fontes novas, eficazes e seguras de enzima fibrinolítica é um desafio (KUMAR; HARIDAS; SABU, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Produzir, extrair, purificar *in situ* e caracterizar proteases com atividade fibrinolítica produzida por fungos do gênero *Rhizopus*

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Selecionar linhagens de fungo filamentosos produtor de proteases com atividade fibrinolítica em fermentação submersa;
- ✓ Determinar a melhor condição de cultivo para a produção de proteases fibrinolíticas utilizando planejamento fatorial (2^4);
- ✓ Extrair proteases fibrinolíticas por sistema de duas fases aquosas PEG/ citrato de sódio e estudar a influência de variáveis no processo de extração utilizando um planejamento fatorial (2^4);
- ✓ Produzir proteases fibrinolíticas por fermentação extrativa utilizando PEG/Sal e estudar a influência de variáveis no processo de produção e extração integrada utilizando um planejamento fatorial (2^3);
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a protease fibrinolítica no extrato enzimático e pré-purificado, em relação ao pH e temperatura ótimos, estabilidade ao pH e à temperatura, inibidores e efeito de íons metálicos;

4. REFERÊNCIAS

ABELSON, John N.; SIMON, Melvin I. **Aqueous two-phase systems**. Elsevier, 1994.

ADIVITIYA; KHASA, Yogender Pal. The evolution of recombinant thrombolytics: Current status and future directions. **Bioengineered**, v. 8, n. 4, p. 331-358, 2017.

AHN, Mi Young et al. Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from the dung beetles, *Catharsius molossus*. **Thrombosis research**, v. 112, n. 5-6, p. 339-347, 2003.

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

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

ARBIND, Kumar; MANISHA, Kaur Jagdeep. Fibrinolytic agents in reference to fungi: an overview. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 11, p. 4225-4229, 2011.

ARBITA, Ariestya Arlene et al. Extraction, partial purification and characterization of proteases from the red seaweed *Gracilaria edulis* with similar cleavage sites on κ -casein as calf rennet. **Food chemistry**, v. 330, p. 127324, 2020.

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

BADHWAR, Parul; KUMAR, Punit; DUBEY, Kashyap Kumar. Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

BAJAJ, Bijender Kumar et al. Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 653-662, 2014.

BAWEJA, Mehak et al. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1195, 2016.

BENNETT, J.; KLICH, M. A. Mycotoxins. *Clinical Microbiological Reviews*, 16 (3), 497–516. **Article CAS**, 2003.

BHARATHI, Devaraj; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. ***Biocatalysis and Agricultural Biotechnology***, v. 22, p. 101368, 2019.

BI, Bo et al. Purification and characterisation of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. ***Food chemistry***, v. 126, n. 1, p. 46-53, 2011.

BORGHESAN, Correa et al. Fisiopatologia da trombose e tromboflebite da veia jugular de eqüinos: revisão. ***Veterinária e Zootecnia***, v. 16, n. 1, p. 26-37, 2012.

BOZIN, T., Berdyshev, I., Chukhontseva, K., Karaseva, M., Konarev, P., Varizhuk, A., Lesovoy, D., Arseniev, A., Kostrov, S., Bocharov, E., & Demidyuk, I. (2023). NMR structure of emfourin, a novel protein metalloprotease inhibitor: Insights into the mechanism of action. ***Journal of Biological Chemistry***, 299(4), 104585.

CASTRO, Helena C. et al. Looking at the proteases from a simple perspective. ***Journal of molecular recognition***, v. 24, n. 2, p. 165-181, 2011.

CHAUDHRY, Raheel; USAMA, Syed Muhammad; BABIKER, Hani M. Physiology, coagulation pathways. 2018.

CHOI, DuBok et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. ***Bioresource technology***, v. 102, n. 3, p. 3279-3285, 2011.

CLEMENTINO, E. L. et al. Integrated production and purification of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. ***Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia***, v. 71, p. 553-562, 2019.

DA SILVA MAGALHÃES, Alessandra Alves et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). ***Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais***, v. 14, n. 3, p. 453-462, 2019.

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

DEEPAK, Venkataraman et al. Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. ***Enzyme and microbial technology***, v. 47, n. 6, p. 297-304, 2010.

E SILVA, Páblo Eugênio da Costa et al. In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p. 524-529, 2018.

FARINAS, Cristiane S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179-188, 2015.

FERREIRA, Cláudia Natália et al. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 416-421, 2010.

HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. Tratado de fisiologia médica. 2011.

HARISH, B. S.; UPPULURI, Kiran Babu. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1373-1387, 2018.

HELLEBREKERS, Bart WJ et al. Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. **Fertility and sterility**, v. 74, n. 2, p. 203-212, 2000.

HO, KWOK M. et al. Detailed assessment of benefits and risks of retrievable inferior vena cava filters on patients with complicated injuries: the da Vinci multicentre randomised controlled trial study protocol. **BMJ open**, v. 7, n. 7, p. e016747, 2017.

HSIAO, Nai-Wan et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89-94, 2014.

HUANG, Shihai et al. Biochemical characteristics of a fibrinolytic enzyme purified from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* HQS-3. **International journal of biological macromolecules**, v. 62, p. 124-130, 2013.

IQBAL, Mujahid et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2016.

KIM, Dae-Won et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1159-1167, 2015.

KOTB, Essam. The biotechnological potential of fibrinolytic enzymes in the dissolution of endogenous blood thrombi. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 3, p. 656-672, 2014.

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

LAN LIU, Xiao et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the food-grade fungus, *Neurospora sitophila*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 98-104, 2016.

LEITE, A. H. P., Telles, A. M. da S., & Porto, A. L. F. Induction of Experimental Tromboses in Animal Model. **American Journal of Cardiology Research and Reviews**, January 2019.

Leong, Y. K., Show, P. L., Lan, J. C. W., Krishnamoorthy, R., Chu, D. T., Nagarajan, D., Yen, H. W., & Chang, J. S. Application of thermo-separating aqueous two-phase system in extractive bioconversion of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16. **Bioresource Technology**, 287, 121474, 2019.

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

LU, Chung-Lun; CHEN, Shiu-Nan. Fibrinolytic enzymes from medicinal mushrooms. **Protein Structure. Intech. Available from <http://www.intechopen.com/books/proteinstructure/fibrinolyticenzymesfrommedicinalmushrooms>**, p. 337-363, 2012.

LU, Fengxia et al. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Thrombosis Research**, v. 126, n. 5, p. e349-e355, 2010.

MATKAWALA, Fatema et al. A novel thiol-dependent serine protease from *Neocosmospora* sp. N1. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02246, 2019.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtillissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, 3, 81-91. 2015.

PAN, Shihan et al. Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: process optimization and kinetic modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 268-277, 2019.

PATEL, Girijesh Kumar; KAWALE, Ashish Ashok; SHARMA, Ashwani Kumar. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic

activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 104-111, 2012.

PATYSHAKULIYEVA, Aleksandrina. Fungal Proteases: Current and Potential Industrial Applications. **Journal: Encyclopedia of Mycology**, p. 348-357, 2021.

PIONTELLI, Eduardo; VIVAR, Valia. Notas micológicas X: *Spicellum ovalisporum* y *Rhizopus lycococcus* dos nuevos aislamientos desde Avena sativa en Chile. **Boletín Micológico**, v. 25, 2010.

PIRES, Claudiane Beatriz Alencar; DA FONSECA, Jennifer Salgado; SERUDO, Ricardo Lima. Proteases produzidas por microorganismos na região amazônica. *Scientia Amazonia*, v. 8, n.1, B15-B33, 2019.

PM DE SOUZA, ML de Assis Bittencourt, CC Caprara, M. de Freitas, RPC de Almeida, D. Silveira, YM Fonseca, EXF Filho, A. Pessoa Jr., PO Magalhães Uma perspectiva da biotecnologia de proteases fúngicas **Bras. J. Microbiol**, 46, 2015.

RESEARCHANDMARKETS, 2022. Specialty Enzymes Market - Global Outlook & Forecast 2022-2027. Disponível em: [ResearchAndMarkets.com](https://www.researchandmarkets.com/) /. Acesso em: 18 janeiro 2023.

SALWAN, Richa; SHARMA, Vivek. Trends in extracellular serine proteases of bacteria as detergent bioadditive: alternate and environmental friendly tool for detergent industry. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 7, p. 863-877, 2019.

SHARMA, Mayuri et al. A review on microbial alkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 69-78, 2019.
STEPHANI, Laurentia et al. Food origin fibrinolytic enzyme with multiple actions. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 3, p. 124-130, 2017.

SILVA, O. S. DA; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. April, p. 209–216, 2018a.

STEWART, Lauren K.; KLINE, Jeffrey A. Fibrinolytics for the treatment of pulmonary embolism. **Translational Research**, v. 225, p. 82-94, 2020.

SUBERU, Yewande et al. Optimization of protease production in indigenous *Bacillus* species isolated from soil samples in Lagos, Nigeria using response surface methodology. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101011, 2019.

SUJITHA, Parthiban et al. Enzymatic dehairing: a comprehensive review on the mechanistic aspects with emphasis on enzyme specificity. **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 168-179, 2018.

SUMI, Hiroyuki et al. Natto Bacillus as an oral fibrinolytic agent: nattokinase activity and the ingestion effect of *Bacillus subtilis* natto. **Food Science and Technology Research**, v. 10, n. 1, p. 17-20, 2004.

SUN, Zhibin et al. A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International journal of biological macromolecules**, v. 85, p. 346-354, 2016.

VIJAYARAGHAVAN, Ponnuswamy et al. Enhanced production of fibrinolytic enzyme by a new *Xanthomonas oryzae* IND3 using low-cost culture medium by response surface methodology. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 217-224, 2019.

VINE, Andrew K. Recent advances in haemostasis and thrombosis. **Retina**, v. 29, n. 1, p. 1-7, 2009.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, Gustavo et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 157-167, 2003.

VIVAS, Jeilyn et al. Purification and characterization of tenerplasminin-1, a serine peptidase inhibitor with antiplasmin activity from the coral snake (*Micrurus tener tener*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 179, p. 107-115, 2016.

WANG, Cheng Tao et al. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 750-758, 2006.

XIN, Xiong et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from a bacterium isolated from soil. **3 Biotech**, v. 8, n. 2, p. 1-8, 2018.

ZAMAN, U., Khan, S. U., Alem, S. F. M., Rehman, K. ur, Almehezia, A. A., Naglah, A. M., Al-Wasidi, A. S., Refat, M. S., Saeed, S., & Zaki, M. E. A. (2023). Purification and thermodynamic characterization of acid protease with novel properties from *Melilotus indicus* leaves. **International Journal of Biological Macromolecules**, 230, 123217.

ZHENG, R. Y; CHEN, G. Q; HUANG, H.; LIU, X. Y. Uma monografia de *Rizopus*. *Sydowia*, [S. I], v. 59, n. 2, p. 273 – 372, 2007.

CAPÍTULO I

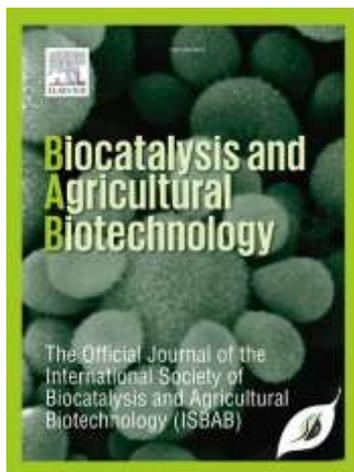
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA USANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Steliane Lima Santos, Marcia Nieves da Cunha, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA. Universidade Federal Rural Pernambuco-UFRPE. Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife – PE, Brasil.

Este artigo será submetido à revista:

Biocatalysis and Agricultural Biotechnology



ISSN: 1878-8181

Cite Score: 6.2 Impact Factor: 3.281

*Corresponding author

Tatiana Souza Porto

Tel: +55 81987876831

E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br

RESUMO

As proteases fibrinolíticas são enzimas importantes no tratamento trombolítico para dissolução de coágulos sanguíneos (trombos), pois possuem a capacidade de degradar a fibrina, principal componente protéico responsável pela coagulação do sangue. O objetivo deste artigo foi selecionar fungos do gênero *Rhizopus* produtores de proteases com atividade fibrinolítica utilizando fermentação submersa, determinar a melhor condição para produção da enzima, e caracterizar bioquimicamente a enzima produzida. Inicialmente foi realizada uma seleção com fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* produtores de protease fibrinolítica utilizando uma fermentação submersa. Em seguida, a influência da composição do meio de cultivo sobre a produção da enzima pelo micro-organismo selecionado foi avaliada através de um planejamento fatorial 2^3 , para tal foram definidas as variáveis independentes: Tipo de substrato (TS) (soja, trigo e soja e trigo), concentração do substrato (CS) (%) e concentração de glicose (CG) (%). Os melhores resultados em termos de produção da protease fibrinolítica foram obtidos a partir da fermentação de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605, incubado a 30°C, sob agitação orbital de 120 rpm, por 96 h, sendo obtida uma atividade proteásica total de 10,37 U/mL e halo de degradação em placa de fibrina de 31 mm correspondendo a 850,60 U/mL em atividade fibrinolítica. O tipo de substrato (soja) em sua maior concentração (3%) e menor concentração de glicose (0,5%) aumentou significativamente a produção da enzima. As condições ótimas para a atividade proteásica foram observadas a 50°C e em pH 8,0, a enzima foi mais estável entre as temperaturas 30 e 40°C. Os parâmetros cinéticos de ativação para hidrólise da azocaseína revelaram maior afinidade pela azocaseína ($K_m = 4,06$ mg/mL) com taxa máxima de catálise de 45,05 mg/mL. Esses resultados demonstram o potencial dos processos de produção das proteases fibrinolíticas e sua possibilidade para ser explorado em aplicações industriais como candidatos a agentes trombolíticos.

Palavra-chave: Protease fibrinolítica, *Rhizopus arrhizus*, processos fermentativos, cinética

ABSTRACT

Proteases are important in the treatment of blood clotting enzymes (thrombi), as they can clot blood, the main protein component responsible for blood clotting. The purpose of this paper was to select fungi of the genus *Rhizopus* to produce proteases with fibrinolytic activity using submerged fermentation and to biochemically characterize the enzyme. The first step was to select micro-organisms producing fibrinolytic protease using a submerged fermentation. Then, the influence of the culture medium composition on the enzyme production by the selected microorganism was evaluated through a 2³-factorial design, for which the independent variables were defined: Substrate type (TS), substrate concentration (CS) (%) and glucose concentration (GC) (%). We found that the type of substrate soy in its highest concentration (3%) significantly increased enzyme production, and the best results in terms of fibrinolytic protease production were obtained from the fermentation of *Rhizopus arrhizus* UCP 1605, incubated at 30°C, under orbital shaking at 120 rpm, for 96 h, obtaining a total protease activity of 10.37 U/mL and a degradation halo in a 31 mm fibrin plate corresponding to 2126.28 U/mL in fibrinolytic activity. The enzyme showed optimal conditions of protease activity at 50°C and pH 8.0, being more stable between temperatures (30 and 40°C) and did not show stability at the tested pHs. Activation kinetic parameters for casein hydrolysis revealed higher affinity for casein ($K_m = 4.06$ mg/mL) with a maximum rate of catalysis of 45.05 U/mL. These results demonstrate the potential of low-cost fibrinolytic protease production processes and their possibility to be explored in industrial applications as candidates for thrombolytic agents.

Key - words: Fibrinolytic protease, *Rhizopus arrhizus*, fermentation processes, kinetics

1. INTRODUÇÃO

As proteases constituem um diverso grupo de enzimas com ampla variedade de aplicações industriais e biotecnológicas, principalmente nas indústrias de alimentos, curtumes, bebidas, formulações de detergentes para roupas, processamento de couro, síntese de peptídeos, produção de cosméticos e produtos farmacêuticos (RAZZAQ et al., 2019; JIANG et al., 2020). Essas enzimas representam 60% do mercado total de enzimas (IBRAHIM et al., 2021).

Algumas dessas enzimas proteolíticas possuem ação fibrinolítica com alta eficácia na degradação da fibrina, um componente presente nos coágulos sanguíneos (LI et al., 2019). Um desequilíbrio homeostático pode resultar na falha da dissolução dos coágulos, causando a progressão das doenças como trombose venosa profunda, infecção miocárdica e outras doenças cardiovasculares (DCV) (MOHAMED ALI et al., 2020). Anticoagulantes comerciais como varfarina, dabigatrana, apixabana ou rivaroxabana são utilizados no tratamento da trombose, no entanto, possuem um alto custo comercial, podem causar efeitos colaterais do tipo sangramento adverso, desconforto gastrointestinal, infarto do miocárdio dentre outros (ADEBOYEJE. G. et al., 2017).

Os micro-organismos são fontes alternativas de enzimas fibrinolíticas e os fungos filamentosos ressaltam-se como produtores de protease fibrinolítica, que devido à dissolução bem-sucedida dos coágulos sanguíneos, tornam essas enzimas uma alternativa promissora na terapia trombolítica e no tratamento de doenças cardiovasculares (KRISHNAMURTHY et al., 2018; CHOI et al, 2014). Os fungos também possuem ampla capacidade de produção, seu micélio pode ser facilmente separado por filtração e algumas espécies são reconhecidas como seguras para aplicações nos setores médico e alimentar (NEGI, JAIN E RAJ., 2020).

Enzimas específicas, estáveis e com baixo custo de produção são obtidas através de processos fermentativos com bactérias, leveduras ou fungos. A fermentação submersa é um dos métodos utilizados para a produção de protease fibrinolítica, sendo possível controlar as condições de cultivo, biomassa, agitação e temperatura (PAN et al., 2019). Portanto, estudos sobre a composição do meio de cultivo e sua influência na produção propõe aumentar o volume e reduzir os custos de

produção reduzindo o tempo e aumentando o rendimento das enzimas fibrinolíticas. Paralelamente, vários pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento sustentável usando resíduos agroindustriais como substratos para melhorar o rendimento e a economia do processo. Nesse sentido, substratos agroindustriais como a soja podem ser usados como fontes de carbono para a produção da enzima fibrinolítica (LEE et al., 2018).

No presente estudo foi realizada a produção e caracterização de uma protease com atividade fibrinolítica a partir de micro-organismos do gênero *Rhizopus* utilizando a fermentação submersa através do planejamento fatorial, bem como a caracterização bioquímica da enzima.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Manutenção dos micro-organismos

As linhagens de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* foram obtidas da Coleção de micro-organismos da UCP (Universidade Católica de Pernambuco) e da micoteca URM (Universidade Federal de Pernambuco), Recife-PE, Brasil. As espécies foram preservadas em óleo mineral (SHERF, 1943), reativados em solução nutritiva contendo 0,5% de extrato de levedura, 3% de glicose e 0,03% Tween 80 durante 96h 120rpm. O meio utilizado para crescimento e manutenção foi batata dextrose ágar (BDA) por 120 horas a 30°C, em seguida transferidos a partir de uma suspensão de esporos coletados após a adição de 5,0 mL de uma solução de NaCl a 0,9% e Tween 80 a 0,01% esterilizada previamente a 121°C por 20 min.

2.2. Seleção da linhagem fúngica produtora de proteases com atividade fibrinolíticas

Para seleção da linhagem produtora de protease com atividade fibrinolítica foi utilizado o meio de cultivo MS-2 (modificado) descrito por Porto et al. (1996), com a seguinte constituição para 100 mL de água destilada: 50mL de filtrado de farinha de soja (4%), cloreto de amônio (0,1%), sulfato de magnésio heptahidratado (0,06%), extrato de levedura (0,1%), glicose (1%), fosfato de potássio bibásico (0,435 %) e 1

mL de solução mineral (100mg de sulfato de ferro; 100mg de cloreto de manganês; 100mg de cloreto de zinco e água destilada q.s.p. 100mL). Erlenmeyers de 125mL contendo 50mL do meio foram inoculados com volume adequado de uma suspensão de esporos para a concentração final de 10^5 esporos/mL e incubados a 30°C, sob agitação orbital 120rpm, por 96 h. Após este tempo o meio fermentado foi filtrado com papel qualitativo 80g 125mm e centrifugado por 10min a 4.000rpm. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e foi utilizado para determinações analíticas.

2.3. Planejamento fatorial 2^3 para produção de proteases com atividade fibrinolíticas por fermentação submersa

Para avaliação das variáveis que influenciaram a produção enzimática, a composição do meio de cultura MS-2 variou de acordo com um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1).

Tabela 1 Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2^3 para produção de proteases com atividade fibrinolítica.

Variáveis		Níveis		
		inferior (-1)	central (0)	superior (+1)
Tipo de substrato -TS		Farinha de soja	Farinha de soja e Farelo de trigo	Farelo de trigo
Concentração do Substrato (%) -CS	do	1,0	2,0	3,0
Concentração de glicose (%) - CG	de	0,5	1,0	1,5

2.4 Determinações analíticas

O experimento foi composto por 8 ensaios e quatro repetições do ponto central, utilizadas para o cálculo do erro experimental. A influência das variáveis independentes: tipo de substrato (TS), concentração do substrato (CS) e concentração de glicose (CG) foi avaliada sobre a produção de proteases fibrinolíticas pelo micro-organismo selecionado. Os pontos centrais foram compostos de 50% farinha de soja e 50% farelo de trigo. Os ensaios foram incubados a 30°C, sob

agitação orbital de 120rpm, por 96h de acordo com uma curva de produção (dados não mostrados). Após o período de cultivo, o extrato enzimático foi obtido como descrito no item 2.2. Os efeitos e as possíveis interações das condições estudadas foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%. A análise estatística do planejamento fatorial, incluindo os diagramas, foram realizados utilizando o Software Statistica 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

O método para a determinação da atividade proteásica foi descrito por Leigton et al. (1973). O teor de proteínas totais dos extratos enzimático foi determinado em U/mL através do método de Bradford (1976). A atividade fibrinolítica foi obtida através do ensaio de degradação de fibrina em placa, descrito por Astrup e Mullertz (1952), utilizando curva de plasmina como padrão de halos para quantificação da atividade durante 24h de incubação. Uma unidade de atividade fibrinolítica corresponde à correlação entre o diâmetro dos halos de degradação na placa de fibrina (em milímetros) e a curva padrão feita com plasmina de plasma humano. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mililitro.

2.5. Caracterização bioquímica

2.5.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A atividade da protease foi determinada em triplicata pela incubação da enzima presente no extrato enzimático com 10mg/mL de solução de azocaseína preparadas em diferentes tampões 0,2M, ou seja, citrato fosfato (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0, 8,0, 9,0) e glicina-NaOH (pH 10,0,11,0,12,0). As amostras foram analisadas de acordo com a seção 2.4. Tal atividade foi então expressa como porcentagem de atividade relativa comparada com o valor máximo e os resultados foram expressos como médias e desvios padrão. A estabilidade da protease foi determinada incubando as amostras contendo enzima nos tampões acima sem azocaseína na proporção de 1:10, avaliando a atividade da enzima em diferentes tempos (0, 4, 8, e 24h) expressando como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial.

2.5.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

O efeito da temperatura na atividade inicial foi determinado incubando o extrato em temperaturas variadas entre 30°C e 80°C usando uma solução de 10 mg/mL de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4). A atividade relativa foi calculada (%) com base no maior valor de atividade proteásica. A estabilidade da protease foi determinada incubando o extrato enzimático no tampão Tris-HCl sem azocaseína, avaliando a atividade da enzima entre 30°C e 80°C em diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 min) expressando-a como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor da atividade inicial (100%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em média e desvio padrão.

2.5.3. Efeito dos íons metálicos na atividade de protease

A atividade proteásica do extrato enzimático foi avaliada na presença de íons metálicos a 25°C por 60min em solução de íons. O efeito das soluções iônicas foi avaliado na concentração de 5mM e 2,5mM. As amostras foram expostas aos íons: sulfato de ferro, cloreto de ferro, sulfato de zinco, cloreto de zinco, cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de cobre em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,4. A atividade da enzima sem íons foi considerada como controle (100%).

2.5.4. Efeito de inibidores na atividade de protease

Para avaliar o efeito dos inibidores na atividade enzimática, o extrato enzimático foi exposto aos seguintes inibidores: inibidor de serino-proteases: fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), inibidor de metalo-proteases: 2-mercaptoetanol, ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA) e inibidor de cisteíno-protease: ácido iodoacético. As incubações foram feitas por 60 min a 25 °C; os inibidores foram dissolvidos de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A atividade da enzima sem inibidores, substituindo o volume por tampão foi considerada como controle (100%).

2.5.5. Cinética da enzima

A atividade da protease foi avaliada variando a concentração inicial de azocaseína de 2 a 40mg/mL a 25°C. A atividade proteásica foi realizada conforme descrito no item 2.4.

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram estimadas ajustando os dados experimentais no software Microsoft Excel usando a equação do gráfico de Lineweaver-Burk. (Eq 1)

$$\left(\frac{1}{V_0}\right) = \left(\frac{K_m}{V_{max} [S]}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \quad (1)$$

[V₀] é a velocidade inicial

[S] é a concentração do substrato azocaseína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção do micro-organismo produtor de protease com atividade fibrinolítica

Para seleção dos micro-organismos produtores de protease com atividade fibrinolítica foram utilizadas seis cepas de fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* (Tabela 2). O extrato produzido por *Rhizopus arrizus* UCP 1605 apresentou maiores valores de atividade proteásica 10,37 U/mL, após 96h de cultivo, como pode ser observado na Tabela 2. Existem relatos na literatura que comprovaram a efetividade de micro-organismos do gênero *Rhizopus* para produção de proteases. Nascimento et al. (2015) utilizaram a espécie de fungo *Rhizopus arrizus* var. *arrizus* UCP 1295 e *Mucor subullissimus* UCP 1262 para produção de uma protease utilizando soja como substrato por fermentação em estado sólido (FES), e após 72h de cultivo obtiveram valores em atividade de 23,87U/mL e 27,06U/mL, respectivamente. A fermentação submersa é bastante utilizada, devido ao fácil controle de processos que possibilita a sua utilização em escalas industriais (PAN et al., 2019, AL-DHABI et al., 2020).

Outras pesquisas também demonstraram a eficiência do gênero *Rhizopus* para produção de protease. Negi, Jain e Raj. (2020) produziram uma protease alcalina de

Rhizopus oryzae por FES, obtendo 422,66U/mL através de um planejamento fatorial e Sarao et al., (2010) obtiveram 521,74U/mL ao produzirem uma protease por fermentação submersa utilizando uma cepa de *Rhizopus microsporus var oligosporus*.

Tabela 2- Produção de proteases por fungos filamentosos do gênero *Rhizopus* por fermentação submersa

Micro-organismo	Tempo e atividade proteásica (U/mL)			
	24h	48h	72h	96h
<i>Rhizophus. arrizus var. arrizus</i> UCP 1295	1,43	1,33	1,53	1,53
<i>Rhizophus. microsporus var. chinensis</i> UCP 1606	1,50	1,87	1,63	2,07
<i>Rhizophus microsporus</i> URM 7652	1,33	1,60	1,97	2,37
<i>Rhizophus arrhizus</i> URM 7654	1,13	1,53	1,37	3,73
<i>Rhizophus microsporus</i> URM 7656	1,67	1,63	1,77	2,10
<i>Rhizophus arrhizus</i> UCP 1605	1,53	1,30	5,90	10,37



Figura 1- Atividade fibrinolítica por degradação do halo de fibrina pelo *fungo Rhizophus arrhizus* UCP 1605 após 96h de incubação (em triplicata).

De acordo com os resultados obtidos, o extrato enzimático produzido por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 foi selecionado para o teste de atividade fibrinolítica em placa de fibrina. Observa-se na Figura 1, diferenças nas áreas degradadas, sendo constatado um halo medindo 31 mm de diâmetro e área de 754,38 mm² equivalente a atividade de 850,60 U/mL para o extrato produzido por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 após 96h de fermentação (Figura 1). Este resultado confirma que o micro-organismo selecionado produziu proteases com atividade fibrinolítica.

Mohamed Ali et al., (2014) na análise da atividade de uma enzima fibrinolítica obtiveram um halo de degradação de 13 mm de diâmetro em placa de fibrina para o extrato produzido por *Auricularia polytricha*. Para avaliar a atividade da enzima fibrinolítica produzida por *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus* Zhang et al. (2015) também utilizaram a metodologia de placa de fibrina obtendo um halo de degradação 18,32 mm, estes resultados demonstram que a enzima fibrinolítica pode ativar o plasminogênio em plasmina para degradar a fibrina. Após um estudo com 43 cepas de *Bacillus*, Souza et al. (2016) selecionaram o micro-organismo *Bacillus* sp. UFPEDA 485 que apresentou em placa de fibrina um halo de degradação com 29 mm de diâmetro correspondendo a 720 U/mL em atividade fibrinolítica.

3.2. Planejamento fatorial para a produção de protease com atividade fibrinolítica

A influência da composição do meio de cultivo para produção da protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 por fermentação submersa foi analisada através de um planejamento fatorial 2³. Na Tabela 3 encontram-se a matriz do planejamento e os resultados obtidos para o estudo da influência dos parâmetros: tipo de substrato (TS), concentração de substrato (CS) e a concentração de glicose (CG) sobre a produção enzimática. Os efeitos das variáveis independentes e suas interações foram interpretados pela análise de variância (ANOVA). O uso de planejamento fatorial permitiu avaliar a melhor composição do meio de cultivo para uma maior produção enzimática tornando o estudo mais econômico, pois esta técnica fornece várias informações em um curto tempo com um número menor de execuções experimentais.

Como observado na Tabela 3, a melhor condição para produção da protease com atividade fibrinolítica foi obtida no ensaio 3 do planejamento fatorial 2³, utilizando o tipo de substrato soja, na concentração de 3% com 0,5% de glicose, a 30°C por 96h

de fermentação, tendo como resultado 13,2U/mL de atividade e um halo de degradação em placa de fibrina medindo 31mm e atividade fibrinolítica de 850,60U/mL.

Tabela 3- Resultados da atividade proteásica produzida por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 em fermentação submersa realizada de acordo com o planejamento fatorial completo 2³.

Ensaio	TS	CS (%)	CG (%)	AP(U/mL)
1	soja	1	0,5	2,033
2	trigo	1	0,5	2,433
3	soja	3	0,5	13,267
4	trigo	3	0,5	3,167
5	soja	1	1,5	2,467
6	trigo	1	1,5	1,267
7	soja	3	1,5	1,267
8	trigo	3	1,5	4,167
9 (C)	S+T	2	1	2,733
10 (C)	S+T	2	1	2,367
11 (C)	S+T	2	1	2,633
12 (C)	S+T	2	1	3,467

TS-Tipo de substrato. CS- Concentração do substrato. CG-Concentração de Glicose. AP-Atividade proteásica. (C)-Ponto central.

A Figura 2 (A), apresenta o gráfico de Pareto com a influência das variáveis independentes e de suas interações sob a produção de proteases por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 em fermentação submersa. A análise estatística mostrou que todas as variáveis estudadas foram significativas ao nível de 95%. A influência negativa do tipo de substrato indicou que a soja favoreceu a produção enzimática pelo micro-organismo. A concentração de substrato apresentou efeito positivo indicando que a concentração de 3% de soja potencializou a produção da protease por

Rhizopus arrhizus UCP 1605. Em seus estudos Xie et al., (2022) utilizaram uma cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* para produzir duas proteases em meio de soja como principal componente, atingindo uma atividade máxima de 16.992 U/mL. Souza et al. (2016) através de uma fermentação submersa utilizando 2% de soja como substrato, produziram uma protease fibrinolítica de *Bacillus amyloliquefaciens*. Nascimento et al. (2015) testaram diversos tipos de substrato para produzir uma protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus var. arrhizus* UCP 1295 e *Mucor subtilissimus* UCP 1262, obtendo 27,06 U/mL e 23,87 U/mL de atividade proteolítica ao utilizar soja como substrato. Observa-se as vantagens da utilização de soja como substrato, pois além de apresentar baixo custo, alta disponibilidade no comércio, favorece a produção de proteases devido a sua riqueza de nutrientes.

Na Figura 2(A) ainda é possível observar que a variável concentração de glicose teve efeito negativo apresentando melhores resultados na menor concentração estudada 0,5%, tal efeito pode ser explicado por Saxena et al., (2007) que estudaram os efeitos de diferentes fontes de carbono sobre a produção da enzima α -amilase e afirmaram que a glicose e a frutose mostraram um efeito de repressão na produção da enzima, pois em altas concentrações de glicose a atividade enzimática diminui. Os resultados obtidos sugerem que altas concentrações de carbono podem inibir a síntese da protease causando uma repressão catabólica e a baixa concentração de glicose aumentou a produção de enzima. Em seus estudos para produção de uma enzima fibrinolítica a partir de substratos de baixo custo (Pó de *Porfira dentata*, óleo de amendoim, Farinha de milho, pó de soja, amido de mandioca, glicose). Pan et al. (2019) também constataram que a menor atividade fibrinolítica e a maior produção de biomassa foram observadas ao produzir com glicose, que favoreceu o crescimento microbiano, mas inibiu a síntese da enzima fibrinolítica. A interação entre as variáveis TS e CG apresentou um efeito sinérgico negativo em que ambas as variáveis em seus níveis mais baixos aumentaram a atividade da enzima.

Já a interação entre as três variáveis TS, CS e CG (1x2x3) foi o efeito mais significativo demonstrando a dependência entre as variáveis estudadas para a produção de protease fibrinolítica (Figura 2A). O efeito desta interação foi negativo, sendo melhor interpretado através gráfico cúbico na Figura 2(B), essa interação demonstra que o tipo de substrato soja em sua maior concentração combinado com o

menor nível de concentração de glicose aumentou significativamente a produção da enzima.

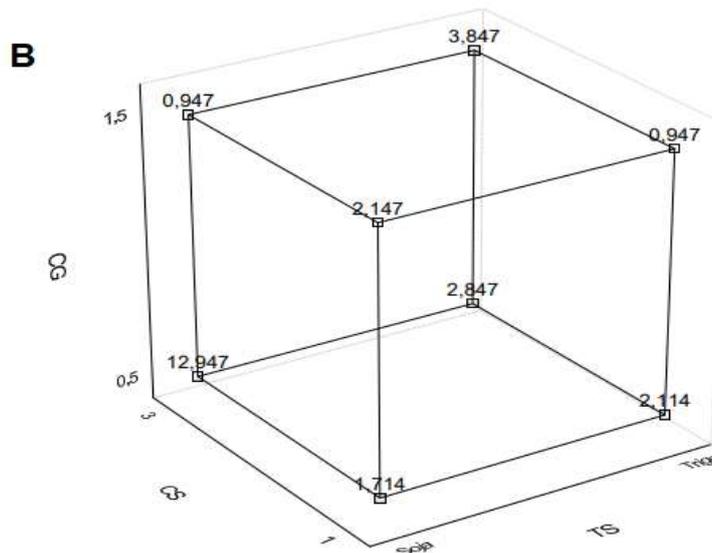
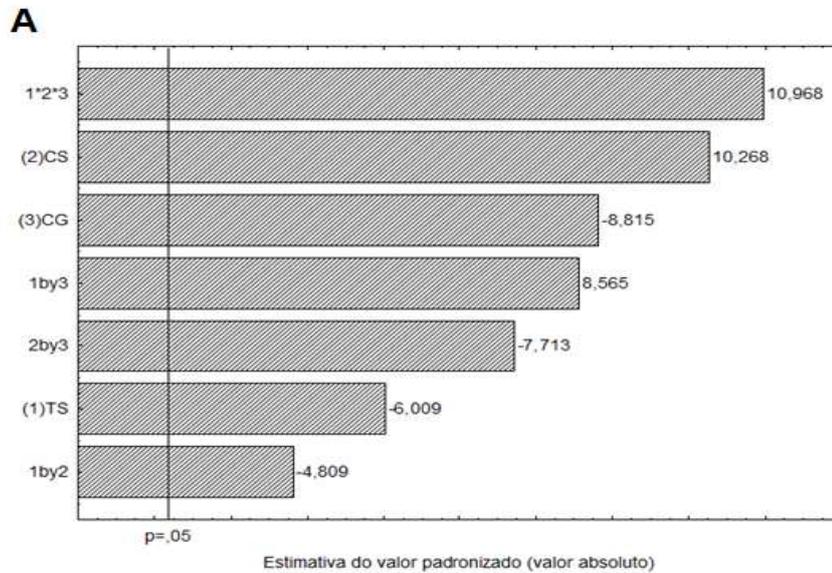


Figura 2- (A) Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis para produção de protease por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605; (B) Gráfico cúbico de interação das variáveis na produção de protease fibrinolítica. TS - Tipo de substrato, CS - Concentração do substrato, CG --Concentração de glicose.

3.3. Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica

Os fatores que alteram a estrutura de uma proteína podem ser diversificados, incluindo alteração na temperatura e no pH do meio, todavia a estabilidade é um dos parâmetros utilizados para aumentar a vida útil de uma enzima, caracterizando as condições ideais de catálise. A protease com atividade fibrinolítica produzida por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 presente no extrato bruto foi caracterizada bioquimicamente utilizando atividade proteásica como referência.

3.3.1. Efeitos de pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease

Ao analisar a temperatura, a enzima exibiu sua atividade máxima a 50°C (Figura 3 A), no entanto apresentou estabilidade entre as temperaturas de 30 e 40 °C, ideal para o corpo humano. Aos 50°C apenas 62,36% da atividade inicial presente no extrato enzimático foi mantida após 180 min de incubação. A protease apenas apresentou estabilidade térmica em temperaturas entre 30°C a 40°C, Silva et al. (2015) explicam que em baixas temperaturas, as enzimas apresentam maior estabilidade, pois as moléculas apresentam menor vibração.

Resultados semelhantes também foram observados por Silva et al. (2020) em que enzima de *Gliricidia sepium* foi ativa em temperaturas variando entre 30°C e 60°C, exibindo atividade máxima a 60°C. Tanto a atividade da enzima quanto a estabilidade térmica diminuíram rapidamente em temperaturas acima de 60°C, e a enzima foi inativada em temperaturas acima de 80°C. Assim como observado por Nascimento et al. (2020) para uma enzima fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 mostrou uma atividade enzimática ótima a 40°C. Yao et al. (2018) observou uma atividade ótima a 40°C de uma protease fibrinolítica por *Bacillus subtilis* JS2. A enzima tornou-se menos ativa quando a temperatura foi elevada para 70°C.

A protease fibrinolítica presente no extrato enzimático apresentou pH ótimo 8,0 (Figura 3 B), porém não apresentou estabilidade aos pH testados. Isso acontece devido à baixa afinidade da enzima protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 ao substrato azocaseína. Al Ferraj et al. (2020) produziram uma enzima fibrinolítica de *Bacillus flexus* isolado de ambiente marinho, a enzima obtida alcançou

melhores resultados no pH 8 e foi estável na faixa de pH 7,0 a 10. Esses resultados indicaram que esta enzima pode ser útil em aplicações que requerem operação em ambientes neutros e alcalinos.

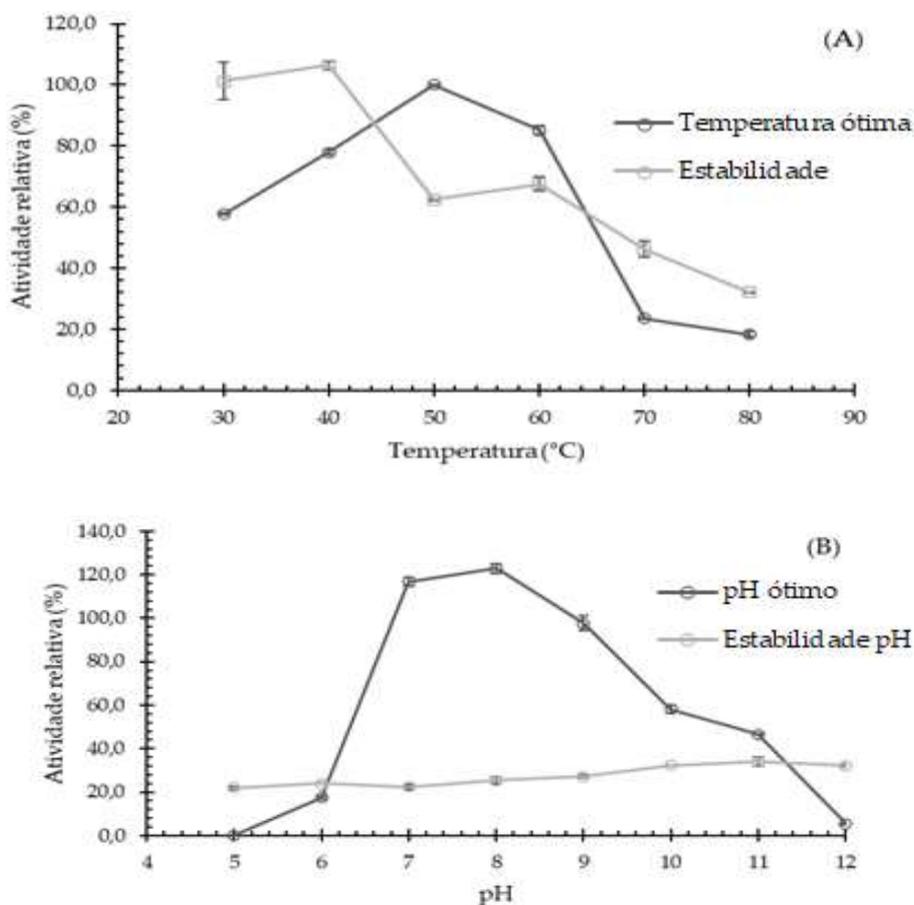


Figura 3- Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 (A) Temperatura ótima e estabilidade da enzima presente no extrato enzimático, (B) pH ótimo e estabilidade da enzima presente no extrato enzimático.

3.3.2. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade enzimática

Alguns íons metálicos que ativam enzimas podem inibir ou ativar proteases fibrinolíticas estabilizando a conformação do seu sítio ativo. Como é possível ver na Tabela 4 as atividades enzimáticas foram ativadas na presença de FeSO_4 , FeCl_3 , NaCl , KCl e MgSO_4 , enquanto que ZnCl e CuSO_4 tiveram um efeito negativo sobre a atividade enzimática apresentando uma ligeira inibição. De acordo com Mohamed Ali

(2020) os íons Mg^{2+} influenciaram a atividade da maioria das enzimas fibrinolíticas, independentemente da sua fonte ou classe.

Tabela 4- Efeitos de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica obtida do extrato enzimático de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605.

		Atividade residual (%)	
<i>Íons</i>	5,0 mM		
Controle	100,00		
FeSO₄	122,64		
ZnCl	94,35		
NaCl	117,20		
KCL	116,09		
MgSO₄	112,82		
CuSO₄	77,40		

			Atividade residual (%)	
<i>Inibidores</i>	5,0 mM		2,5 mM	
Controle	100,00		100,00	
Ácido iodoacético	112,64		182,18	
EDTA	118,58		186,16	
PMSF	15,96		30,76	
β- Mercaptoetanol	93,37		154,40	

Clementino (2019) verificou um comportamento parecido no aumento da atividade enzimática ao testar os íons Mg^{2+} , Fe^{2+} , Ca^{2+} , K^+ e Na^+ e o efeito inibitório na atividade enzimática residual foi verificado em presença dos íons Zn^{2+} e Cu^{2+} . O

aumento da atividade da protease pode ser devido aos íons metálicos que ligam o substrato e a enzima, e esse íon mantém o substrato no sítio ativo da enzima.

Na Tabela 4 também estão presentes os efeitos dos inibidores. O fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) foi o composto que mais inibiu a atividade da protease. Tal inibição cerca de 84% foi mais pronunciada em concentração mais alta (10 mM), o que é característico de uma serino-protease. Perfil de inibição por PMSF semelhante foi observado por Y. Hu et al., (2019), visto que, na presença deste inibidor houve total inibição da atividade de uma protease de *Bacillus subtilis* DC27 utilizada na produção de Douchi um alimento fermentado de soja.

Assim, neste trabalho, a protease produzida por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 pode ser considerada uma protease do tipo serino. Clementino et al., 2019 também produziram e purificaram uma protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 sugerindo que a protease avaliada seja pertencente à classe das serino-proteases, pois o inibidor e o substrato utilizados caracterizam o mecanismo de ação da enzima.

3.3.3. Cinética da ativação de proteases

Os valores da constante de Michaelis menten (K_m) e a velocidade máxima de reação (V_{max}) foram de 15,34mg/mL, 42,19U/mL, respectivamente o gráfico foi utilizado para o cálculo dos parâmetros cinéticos (Figura 4). O valor de K_m e de V_{max} para a protease fibrinolítica presente no extrato enzimático foram maiores do que o relatado por Silva et al. (2016) que obtiveram um K_m e V_{max} de 18,7 mg/mL e 28,57 mg/mL/min, respectivamente, ao produzir e caracterizar uma protease de *Aspergillus tamarii* URM 4634. Vale salientar que a baixa afinidade da enzima em questão foi para o substrato azocaseína, e como trata-se de uma protease com atividade fibrinolítica, uma baixa afinidade para um substrato que não é a fibrina não seria um problema.

Matkawala et al., (2019) que obtiveram um K_m de 0,015 mg/ml e um V_{max} de 454,45 U/ml ao produzir uma serino-protease de *Neocosmospora* sp. Quando o valor de K_m é alto, significa que esta enzima possui baixa afinidade pelo substrato (YILDIRIM et al., 2017).

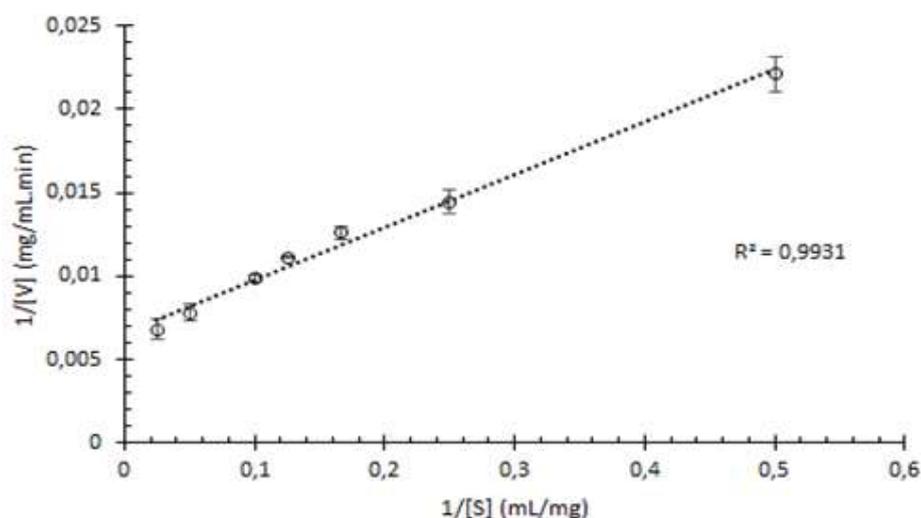


Figura 4- Gráfico de cinética enzimática da protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 presente no extrato enzimático. A linha pontilhada representa a curva de ajuste desenhada de acordo com a equação de Lineweaver-Burk

4. CONCLUSÃO

Considerando as potenciais aplicações biotecnológicas, o microrganismo *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 foi selecionado como o melhor produtor de protease com atividade fibrinolítica. É possível produzir uma enzima fibrinolítica com alto poder de degradação por diferentes processos e considerável rapidez quando associado a planejamento fatorial. A protease fibrinolítica foi ativa em pH ótimo 8,0 e temperatura ótima de 50°C. A atividade da enzima foi completamente inibida pelo PMSF, indicando que se trata de uma protease do tipo serina. A protease com atividade fibrinolítica deve ainda ser estudada para uma possível aplicação biomédica, mas os resultados apresentados indicam uma fonte potencial desta enzima.

5. AGRADECIMENTOS

À FACEPE (Fundação para a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) pela bolsa de doutorado - processo:IBPG-0622-5.05/17, e todos os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e

Tecnológico, Brasil) - processo 471773/2013-1 e CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento do Ensino Superior, Brasil) - processo 88881062200/2014-01 pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

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

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

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

BADHWAR, Parul; KUMAR, Punit; DUBEY, Kashyap Kumar. Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

CHAUDHRY, R.; BABIKER, H. M. **Physiology, Coagulation Pathways**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2018.

CHEN, Shanquan et al. Barriers of effective health insurance coverage for rural-to-urban migrant workers in China: a systematic review and policy gap analysis. **BMC Public Health**, v. 20, n. 1, p. 1-16, 2020.

CRUZ FILHO, R. F. DA *et al.* Comparison of conventional and extractive fermentation using aqueous two-phase system to extract fibrinolytic proteases produced by *Bacillus stearothermophilus* DPUA 1729. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020.

FARINAS, C. S. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 52, p. 179–188, 2015.

FERREIRA, L. A et al. Effect of NaCl additive on properties of aqueous PEG-sodium sulfate two-phase system. **Journal of chromatography. A**, v. 1220, p. 14–20, jan. 2012.

IBRAHIM, Abdelnasser SS et al. Stabilization and improved properties of *Salipaludibacillus agaradhaerens* alkaline protease by immobilization onto double mesoporous core-shell nanospheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 557-566, 2021.

JIANG, Qiu et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Whitmania pigra* Whitman. **Protein Expression and Purification**, v. 174, p. 105680, 2020.

K. Li, M. Ye, X. Lin Estudo clínico sobre cápsulas de Naoxuekang combinadas com alteplase no tratamento de infarto cerebral agudo. **Drugs Clinic**, 34, 2019

KRISHNAMURTHY, PD Belur, SB Subramanya Métodos disponíveis para avaliar o potencial terapêutico de enzimas fibrinolíticas de origem microbiana: uma revisão **J. Anal. Sci. Technol.**, 9 (1), 2018.

KUMAR, S. S.; HARIDAS, M.; SABU, A. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Process optimization for production of a fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KU1. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, n. December 2017, p. 33–39, 2018.

LEFKOWITZ, Jerry B. Coagulation pathway and physiology. **An algorithmic approach to hemostasis testing**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2008.

LEONG, Y. K. *et al.* Application of thermo-separating aqueous two-phase system in extractive bioconversion of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16. **Bioresource Technology**, v. 287, p. 121474, 1 set. 2019.

MACIEL, M. DE H. C. *et al.* Purification of polygalacturonases produced by *Aspergillus niger* using an aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 371, n. June 2014, p. 125–130, 2014.

MENSAH, G. A.; ROTH, G. A.; FUSTER, V. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 74, n. 20, p. 2529–2532, 19 nov. 2019.

PAN, Shihan et al. Fibrinolytic enzyme production from low-cost substrates by marine *Bacillus subtilis*: process optimization and kinetic modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 268-277, 2019.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1996.

RAZZAQ, Abdul et al. Microbiais proteases applications. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 7, p. 110, 2019.

RIBEIRO, Itana Naiara Costa et al. Os novos anticoagulantes orais na profilaxia de acidente vascular cerebral em pacientes com fibrilação atrial não valvar. **Revista Científica Hospital Santa Izabel**, v. 1, n. 4, p. 21-31, 2017.

RODRIGUEZ, Elliott L. et al. Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. **Journal of Chromatography B**, v. 1157, p. 122332, 2020.

SALES, A. E. *et al.* Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus sp.* UFPEDA 485. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1676–1688, 2013.

SALGADO, J. M. *et al.* Bioproduction of 4-vinylphenol from corn cob alkaline hydrolyzate in two-phase extractive fermentation using free or immobilized recombinant *E. coli* expressing pad gene. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 58–59, p. 22–28, 10 maio 2014.

SAXENA, R. K. *et al.* A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus sp.* PN5. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 260–265, 1 jan. 2007.

SHERF, Arden F. A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer. **Phytopathology**, v. 33, n. 4, p. 330-332, 1943.

SILVA, O. S. DA; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. April, p. 209–216, 2018a.

VIJAYARAGHAVAN, P. *et al.* Enhanced production of fibrinolytic enzyme by a new *Xanthomonas oryzae* IND3 using low-cost culture medium by response surface methodology. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 2, p. 217–224, 2019.

YILDIRIM, Vildan *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable serine alkaline protease from *Aeribacillus pallidus* C10: a potential additive for detergents. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 468-477, 2017.

CAPÍTULO II

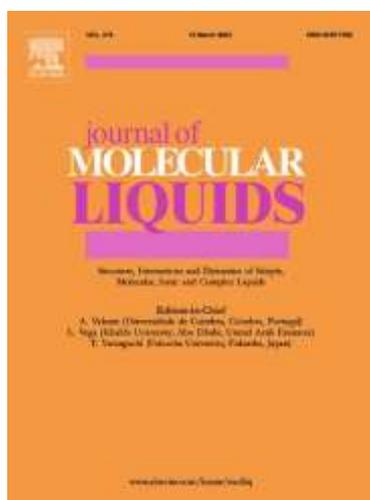
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 EXTRAÍDA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/CITRATO)

Steliane Lima Santos, Marcia Nieves da Cunha, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA. Universidade Federal Rural Pernambuco-UFRPE. Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife – PE, Brasil.

Este artigo será submetido à revista:

Journal of Molecular Liquids



ISSN: 0167-7322

Cite Score: 9 Impact Factor: 6.633

*Corresponding author

Tatiana Souza Porto

Tel: +55 81987876831

E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br

RESUMO

Um sistema de duas fases aquosas PEG/citrato (SDFA) foi utilizado para selecionar a condição de extração ideal de uma protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605. A enzima foi caracterizada bioquimicamente quanto ao pH e temperatura, bem como aos parâmetros cinéticos. As condições da purificação foram determinadas através de um planejamento fatorial 2^4 que avaliou a influência simultânea das variáveis independentes: massa molar do PEG (MPEG), concentração do PEG (CPEG), concentração do citrato de sódio (Ccit), pH sobre a recuperação enzimática (Y), o coeficiente de partição (K) e o fator de purificação (FP). A enzima fibrinolítica particionou preferencialmente para a fase superior rica em PEG, apresentando melhores resultados no ensaio formado por 24% (m/m) de PEG 8000 (g/mol), 15% (m/m) de citrato de sódio e pH 8, o que proporcionou um FP = 4,07, um K = 1,58, um Y = 97,06% e uma atividade fibrinolítica com um halo de 16mm, correspondendo a uma atividade de 44,39 U/mL. A atividade ótima enzimática foi observada a 50°C e pH 8,0, a enzima foi mais estável entre as temperaturas de 30 e 60°C, apresentando estabilidade apenas nos pHs 8 e 12. Os parâmetros cinéticos da hidrólise da azocaseína revelaram pouca afinidade pela azocaseína ($K_m = 88,73\text{mg/mL}$) com velocidade máxima de catálise de 526,3mg/mL. Os resultados obtidos demonstram o potencial deste método de extração para obtenção de enzimas fibrinolíticas para ser explorado em aplicações industriais.

Palavra-chave: Protease fibrinolítica, otimização, *Rhizopus arrhizus*, SDFA, cinética

ABSTRACT

An aqueous two-phase systems PEG/citrate was used to select an ideal condition of a fibrinous protease from *Rhizopus arrhizus* UCP 1605. As the purification conditions were determined through a 2^4 factorial that evaluated the simultaneous influence of the independent variables: mass molar PEG (MPEG), PEG concentration (CPEG), design citrate concentration (Ccit), pH on enzymatic recovery The division coefficient (K) and the purification factor (PF). The fibrinolytic enzyme partitioned to the upper PEG-rich phase, showing the best results in the assay formed by 24.0% (m/m) of PEG 80000 (g/mol), 15% (m/m) of citrate in preferential and pH 8, which, a Y, a FP = 97, a K1.58%. The optimum enzyme was observed at 50°C and pH 8, the enzyme was more stable between temperatures of 30 and 30°C and stability was only observed at 50°C and pH 8.00, the enzyme was more stable between temperatures 30° and 12°C. Km = 88.73 mg/mL) with a maximum catalysis rate of 526.3 mg/mL. The results obtained for the potential of this fiber selection method to be applied in industrial applications.

Key - words: Fibrinolytic protease, optimization, *Rhizopus arrhizus*, ATPS, kinetics

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas hidrolíticas, algumas delas ganham destaque por apresentarem atividade fibrinolítica, sendo consideradas um grupo de enzimas de grande relevância devido à sua aplicabilidade no campo médico e industrial (JIANG et al., 2020). Proteases fibrinolíticas são enzimas importantes no tratamento de doenças cardiovasculares, atuam na degradação de coágulos e na conservação do trânsito sanguíneo em locais com lesão vascular e são uma alternativa promissora na terapia trombolítica (CHOI et al, 2014).

Enzimas fibrinolíticas foram purificadas de várias fontes, como alimentos fermentados, minhocas, cogumelos, veneno de cobra e fontes microbianas, tais como: actinomicetos, fungos e algas (KIM et al., 2015). Os micro-organismos são importantes fontes de agentes trombolíticos que têm sido utilizados efetivamente para a produção destas biomoléculas (LU et al., 2010). As enzimas microbianas são uma alternativa promissora para a indústria biotecnológica devido a sua alta seletividade dos substratos utilizados e produtos gerados. Também apresentam menor custo de produção, capacidade de manipulação genética, operações em condições controláveis e representam uma alternativa de recurso renovável (ADRIO e DEMAIN, 2014). Dentre os micro-organismos destacam-se os fungos filamentosos em especial os representantes do gênero *Rhizopus* e *Mucor* que possuem grande potencial para produção de diversas moléculas bioativas, inclusive proteases fibrinolíticas (NASCIMENTO et al, 2015).

Todavia, o processo de purificação das enzimas microbianas ainda é um desafio para indústria biotecnológica, pois há uma necessidade de empregar um procedimento de fácil utilização, alto fator de purificação e de baixo custo. Porém, como uma das alternativas sugere-se o sistema de duas fases aquosas (SDFA) formado por polietileno glicol (PEG) e um sal ou polímero/polímero, este método tem se destacado por ser econômico e eficiente. Esta técnica aplicada na pré-purificação de biomoléculas pode atingir altos graus de pureza e recuperação (FERREIRA et al., 2012; MACIEL et al., 2014).

Desta forma, este trabalho apresenta como objetivos particionar e purificar a protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 utilizando o sistema de duas fases aquosas PEG/citrato e caracterizá-la bioquimicamente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

Rhizopus arrhizus UCP 1605 foi obtido da coleção de culturas UCP Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil. Foi mantido em meio de cultura ágar batata dextrose a 30°C por 5 dias para induzir a esporulação. Os esporos foram então coletados após adição de solução de NaCl 0,9% e Tween 80 0,01% previamente esterilizada a 121°C por 20min.

2.2. Produção da protease fibrinolítica

A fermentação submersa (SF) foi conduzida em Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL do meio MS-2 descrito por Porto et al. (1996), com uma suspensão de esporos para a concentração final de 10^5 esporos/mL, incubados a 30°C, sob agitação orbital 120rpm, por 96h. O extrato enzimático foi filtrado com papel qualitativo 80g, 125mm e centrifugado por 10min a 4000rpm. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático bruto e foi utilizado para extração em S DFA.

2.3. Atividade proteolítica, proteínas totais e atividade fibrinolítica

O método para a determinação da atividade proteásica foi o descrito por Leighton et al. (1973) sem adição de cloreto de cálcio. O volume de 0,15 mL do extrato enzimático foi misturado com 0,25mL de azocaseína a 10mg/mL (dissolvido em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,4) por 60min a 25°C. A reação foi parada pela adição de 1,2mL de ácido tricloroacético a 10%. As amostras foram centrifugadas a 8000rpm, por 15min a 4°C. Depois, 0,8mL do sobrenadante foi adicionado a 1,4mL de NaOH 1,0M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de

enzima que produziu um aumento na densidade óptica de 1,0 após 1h no comprimento de onda de 440nm.

O teor de proteínas totais do extrato bruto foi determinado através do método de Bradford (1976), utilizando uma curva padrão de albumina de soro bovino. A atividade fibrinolítica foi obtida através do ensaio de degradação de fibrina em placa, descrito por Astrup e Mullertz (1952), utilizando curva de plasmina como padrão de halos para quantificação da atividade (dados não mostrados).

2.4. Sistemas de duas fases aquosas

A extração da enzima protease fibrinolítica por sistema de duas fases aquosas PEG/Citrato foi realizada de acordo com um planejamento fatorial 2^4 com quatro repetições do ponto central (Tabela 1). Onde foram analisadas as variáveis independentes: massa molar do PEG (MPEG), concentração do PEG (CPEG), concentração do citrato de sódio (Ccit) e pH. O sistema foi pesado em tubos graduados cônicos de 15mL a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo composto por diferentes concentrações dos componentes: polietileno glicol (PEG), citrato de sódio e ácido cítrico. Foram adicionados ao sistema 20% de extrato enzimático bruto.

Todos os componentes do sistema foram adicionados em diferentes proporções aos tubos calibrados, Em seguida o tubo foi vedado com parafilme e homogeneizados em vórtex. Após 24 horas, foi adicionado 20% do sistema, (2g do extrato enzimático) a os tubos para completar as 10g do SDFA, agitando-os em vórtex por 1 minuto. Em seguida os tubos permaneceram em repouso durante 60 minutos, ocorrendo separação das fases. O branco do sistema foi realizado seguindo as mesmas condições, porém ao final no lugar do extrato enzimático, colocou-se água destilada. O volume de cada fase foi medido e amostras de ambas as fases, superior (rica em PEG) e inferior (rica em sal), foram coletadas para análise de proteína total e atividade proteásica.

Tabela 1- Níveis das variáveis usadas no planejamento fatorial 2^4 para extração da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrizus* UCP 1605 através do SDFa (PEG/Citrato).

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
Massa molar PEG (g/mol)	400	3.350	8.000
Concentração PEG (%)	20	22	24
Concentração citrato de sódio (%)	15	17.5	20
pH	6	7	8

2.5. Parâmetros a serem avaliados K, Y e FT

O coeficiente de partição da protease fibrinolítica foi calculado como a razão entre a atividade proteásica (U/mL) das fases superior (A_s) e inferior (A_i). (Eq 1)

$$K = \left(\frac{A_s}{A_i} \right) \quad (1)$$

A recuperação em atividade Y na fase superior (rica em PEG) do sistema foi determinada pela razão entre a atividade proteásica da fase superior (A_s) e a atividade proteásica do extrato enzimático (A_e), ambas multiplicadas pelo seu volume da fase superior (V_s) e do extrato enzimático (V_e), em mL expressa em porcentagem. (Eq 2)

$$Y = \left(\frac{A_s V_s}{A_e V_e} \right) \times 100 \quad (2)$$

O fator de purificação foi definido pela razão das atividades específicas da fase superior (A_s/C_s) e no extrato enzimático antes da extração (A_i/C_i): (Eq 3)

$$FP = \left(\frac{A_s/C_s}{A_i/C_i} \right) \quad (3)$$

Onde: onde C_s e C_i são as concentrações de proteína total (mg/mL) na fase superior e no extrato enzimático, respectivamente.

Os resultados do planejamento fatorial foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 95%, utilizando o Software *Statistica* 8.0 (Statsoft Inc, 2008).

2.6. Caracterização bioquímica da protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

2.6.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A atividade da protease foi determinada em triplicata pela incubação da enzima extraída em SDFa com 10mg/mL de soluções de azocaseína preparadas em diferentes tampões 0,2 M, ou seja, citrato fosfato (pH 5,0 e 6,0), Tris-HCl (pH 7,0; 8,0 e 9,0) e glicina-NaOH (pH 10,0;11,0 e12,0). As amostras foram mantidas nas mesmas condições descritas na Seção 2.3. Tal atividade foi então expressa como porcentagem de atividade relativa comparada com o valor máximo e os resultados foram expressos como médias e desvios padrão. A estabilidade da protease foi determinada incubando as amostras contendo enzima nos tampões acima sem azocaseína, na proporção de 1:10, avaliando a atividade da enzima em diferentes tempos (0, 4, 8, 12 e 24h) expressando como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em média e desvio padrão.

2.6.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

O efeito da temperatura na atividade inicial foi determinado incubando a enzima extraída por SDFa nas temperaturas variadas entre 30°C e 80°C usando uma solução de 10 mg/mL de azocaseína em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4). A atividade relativa foi calculada (%) com base no maior valor de atividade proteásica. A estabilidade da protease foi determinada incubando as amostras contendo enzima no tampão Tris-HCl sem azocaseína, avaliando a atividade da enzima entre 30°C e 80°C em diferentes tempos (0, 60, 120 e 180min) expressando-a como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor da atividade inicial (100%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e os resultados expressos em média e desvio padrão.

2.6.3. Efeito dos íons metálicos na atividade de protease

A atividade proteásica da amostra pré-purificada em SFA foi avaliada na presença de íons metálicos a 25°C por 60 min em solução de íons. O efeito das soluções iônicas foi avaliado na concentração de 5mM e 2,5mM. As amostras foram expostas aos íons: sulfato de ferro, cloreto de ferro, sulfato de zinco, cloreto de zinco, cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de cobre em tampão Tris-HCl 0,2M, pH 7,4. A atividade da enzima sem íons foi considerada como controle (100%).

2.6.4. Efeito de inibidores na atividade de protease

Para avaliar o efeito dos inibidores na atividade enzimática, o pré-purificado foi exposto aos seguintes inibidores: inibidor de serino-proteases: fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), de metalo-proteases: 2-mercaptoetanol, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA) e de cisteíno-protease: ácido iodoacético. As incubações foram feitas por 60 min a 25°C; os inibidores foram dissolvidos em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) nas concentrações de 5 mM e 2,5 mM. A atividade da enzima sem inibidores foi considerada como controle (100%).

2.6.5. Cinética da enzima

A atividade da protease foi avaliada variando a concentração inicial de azocaseína de 2 a 40 mg/mL a 25°C. A constante de Michaelis-Menten (K_m mg/ml) e a velocidade máxima de reação (V_{max} mg/ml/min) foram estimadas ajustando os dados experimentais no software Microsoft Excel usando a equação do gráfico de Lineweaver-Burk (Eq. 4).

$$\left(\frac{1}{V_0}\right) = \left(\frac{K_m}{V_{max} [S]}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \quad (4)$$

[V₀] é a velocidade inicial

[S] é a concentração do substrato azocaseína.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Coeficiente de partição (K)

A matriz do planejamento e suas respectivas respostas estão apresentadas na Tabela 2. Os ensaios 1, 3, 9 e 11 não apresentaram formação de fases, Porto et al. (2008) enfatizaram que esse efeito acontece porque esses ensaios encontram-se abaixo da curva binodal, indicando que as concentrações de PEG e citrato de sódio não foram suficientes para formar a separação das fases.

Os resultados apresentados mostraram que a protease produzida de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 particionou preferencialmente para fase rica em PEG, já que em quase todos os ensaios os valores do coeficiente de partição (K) obtidos foram maiores que 1 ($K > 1$), com exceção apenas dos ensaios 2 e 4, ambos obtidos nas condições PEG 8000. Ccit 15% e pH 6. Silva et al. (2018) relata que tanto a concentração de sal quanto a modificação do pH podem alterar a interação proteína-proteína ou proteína-polímero ou modificar a concentração do polímero, ganhando ou perdendo grupos funcionais, o que pode causar repulsão, atração, expansão da enzima.

Os maiores valores para o coeficiente de partição foram obtidos nos ensaios 7 e 13, sendo estes de 7,93 e 7,8, respectivamente (Tabela 2), ambos obtidos nas condições de maior concentração de citrato (20%), com massa molar do PEG (400g/mol). A concentração de citrato teve o maior efeito positivo, o que significa que o maior nível de CCit proporcionou os maiores valores de K. Salmon et al. (2014) relatam que os sais podem alterar a carga eletrostática em um SDFA e influenciar a distribuição de aminoácidos ou proteínas carregadas. Com o aumento da concentração de citrato, as proteínas carregadas negativamente preferem a fase rica em PEG por causa das forças de repulsão causadas pelos ânions do sal.

Alguns resultados corroboram com os obtidos por outros autores quando realizaram a partição de proteases em sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato e obtiveram maiores valores nos coeficientes de partição na condição citada, Amaral et al. (2020) quando extraíram uma protease de *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 obtiveram um K de 4,6. Do mesmo modo, Fernandes et al. (2020) na purificação de

uma protease de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 obtiveram um K de 61.6 no ensaio formado por 20% de concentração de citrato e por PEG com massa molar de 400 g/mol.

Tabela 2 Matriz do Planejamento Fatorial 2⁴ e resultados da purificação parcial da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 utilizando sistema de duas fases aquosas.

Ensaio	MPEG (g/mol)	CPEG% (m/m)	Ccit% (m/m)	pH	K	Y PEG (%)	FP
1	400	20	15	6	---	---	---
2	8000	20	15	6	0,76	36,59	1,19
3	400	24	15	6	---	---	---
4	8000	24	15	6	0,92	39,75	0,62
5	400	20	20	6	2,95	46,36	0,52
6	8000	20	20	6	1,51	32,64	0,66
7	400	24	20	6	7,93	76,21	1,81
8	8000	24	20	6	4,13	155,73	1,76
9	400	20	15	8	---	---	---
10	8000	20	15	8	1,16	75,49	3,07
11	400	24	15	8	---	---	---
12	8000	24	15	8	1,58	97,06	4,07
13	400	20	20	8	7,80	84,60	2,14
14	8000	20	20	8	2,74	94,15	1,65
15	400	24	20	8	3,32	96,81	2,52
16	8000	24	20	8	1,94	63,63	1,07
17 ^c	3350	22	17,5	7	2,61	206,83	2,72
18 ^c	3350	22	17,5	7	2,89	213,47	3,29
19 ^c	3350	22	17,5	7	2,82	214,21	3,00
20 ^c	3350	22	17,5	7	2,56	209,03	3,09

MPEG = Massa molar PEG; CPEG = Concentração PEG; Ccit = Concentração citrato de sódio; K = Coeficiente de partição; YPEG=Recuperação na fase superior U/ml; FP=

Fator de purificação na fase superior; (C) = Ponto central; *** = Não houve formação de fases.

Observa-se na Tabela 3 os efeitos das variáveis independentes de primeira ordem massa molar do PEG, concentração de PEG, concentração de citrato e pH, bem como as interações entre elas, sob as variáveis respostas coeficiente de partição (K), recuperação em atividade na fase rica em PEG (Y) e o fator de purificação (FP).

Tabela 3- Efeitos e interações das variáveis do planejamento fatorial 2^4 para extração de proteases fibrinolíticas de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 por sistemas de duas fases aquosas (PEG/Citrato).

Variáveis e interações	Efeitos		
	K	Y PEG	FP
(1) MPEG	-11,248*	19,042*	7,488*
(2) CPEG	4,509*	9,737*	2,753
(3) Ccit	43,385*	29,878*	3,374*
(4) pH	0,510	7,271*	8,355*
1x2	2,941	3,792*	-0,753
1x3	-25,006*	-13,084*	-11,368*
1x4	-0,229	0,479	3,455*
2x3	2,694	7,766*	1,860
2x4	-19,582*	-10,799*	-1,077
3x4	-2,764	-4,802*	-2,753
1x2x3	1,125	1,821	-1,647
1x2x4	9,767*	-8,306*	-0,857
1x3x4	-3,504*	-13,118*	-7,73384*
2x3x4	-20,387	-13,401*	-4,38854*

MPEG = Massa molar PEG; CPEG = Concentração PEG; Ccit = Concentração citrato de sódio; K = Coeficiente de partição; Y = Recuperação em atividade na fase PEG; FP= Fator de purificação do PEG. * ensaios significativos.

Dentre as variáveis independentes avaliadas, apenas o pH não apresentou efeito significativo sobre o K. A concentração de citrato foi a variável que teve maior influência significativa sob a partição da protease para a fase rica em PEG, seu efeito foi positivo (Tabela 3), indicando que, nos ensaios formados pela maior concentração desta variável houve uma maior partição enzimática para fase PEG (efeito *salting out*). Silva et al (2020), observaram efeitos semelhantes quando realizaram a extração de uma protease produzida por *Gliricidia sepium* utilizando SDFA PEG/fosfato de sódio, e obtiveram K igual a 1,32. Os autores explicaram que quando o efeito da concentração salina sob o K é positivo, significa que a alta concentração de sal fez a protease migrar para a fase rica em PEG. Kirsch et al. (2012) também observaram que o aumento na concentração de sal promoveu a migração das proteases de *L. citrinus* para a fase superior rica em polímero.

Porto et al. (2008) elucida que na partição de proteínas em SDFA podem ocorrer dois efeitos chamados de *salting out* e de volume de exclusão. O efeito *salting out* ocorre quando a concentração de salina da fase inferior aumenta, e as proteínas são forçadas a particionar para a fase superior (rica em PEG), enquanto que, o efeito de volume de exclusão está relacionado com o aumento da massa molar e da concentração do PEG, visto que, nestas condições o volume ocupado pelo polímero na fase aumenta e favorece a partição das moléculas em solução para a fase rica em sal. No presente estudo, os efeitos das variáveis independentes indicaram que houve predominância do efeito *salting out*. Já a massa molar do PEG (MPEG) teve efeito significativo e negativo indicando que menores massas molares de PEG favoreceram o aumento do K, ou seja, a enzima particionou preferencialmente para a fase PEG, como discutido anteriormente.

O efeito de segunda ordem da interação entre as variáveis independentes MPEG e Ccit pode ser melhor analisado observando o diagrama de interpretação geométrica apresentado na Figura 1. Nota-se que estas variáveis exerceram um efeito antagônico sob o K, visto que, o maior valor de efeito calculado do K foi obtido com a MPEG no menor nível (PEG 400 g/mol) combinado com a Ccit no maior nível (Ccit

20% (m/m)), sendo a interação entre essas variáveis o segundo efeito que mais influenciou a partição da enzima (Tabela 3).

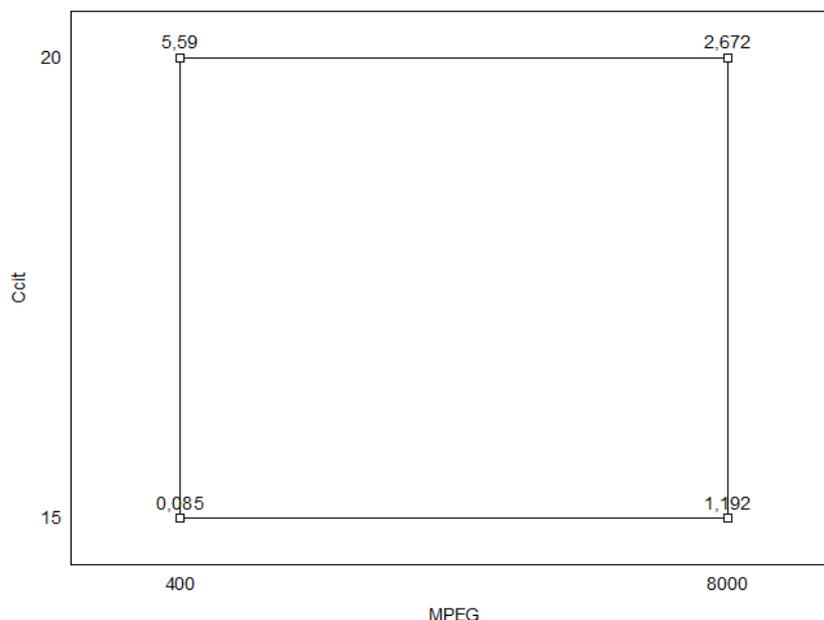


Figura 1- Diagrama geométrico dos efeitos da massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio, tendo como variável resposta o coeficiente de partição da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 (K)

3.2. Determinação da Recuperação (Y)

Os resultados obtidos da recuperação em atividade enzimática na fase PEG (Y) variaram de 32,6 a 214,2%, entretanto, a condição ótima para Y_{PEG} foi obtida nos ensaios do ponto central (ensaios de 17 a 20) compostos por MPEG 3350 (g/mol), CPEG 22%, C_{cit} 17,5%, e pH 7,0 (Tabela 3). Os valores de recuperação maiores que 100% podem estar associados à remoção de contaminantes e inibidores para fase oposta, conseqüentemente, aumentando a atividade enzimática na fase de maior concentração desta biomolécula (NASCIMENTO et al., 2016). Podem ainda ocorrer alterações no sítio ativo da enzima devido a interações moleculares entre o polímero e a enzima, levando a um aumento da atividade enzimática (SIQUEIRA et al., 2020).

Em seu estudo, Mohamed Ali et al. (2014) realizaram a pré-purificação de uma enzima fibrinolítica de *Auricularia polytricha* por (SDFA PEG/fosfato de sódio), a enzima foi extraída na fase superior (rica em PEG), com uma recuperação enzimática de 78%. Silva et al. (2020) também extraíram uma protease de *Aspergillus tamaritii*

URM 4634 por SDFa PEG/citrato, em seu melhor ensaio obtiveram $Y=106.1\%$ Os resultados obtidos no melhor ensaio para recuperação da enzima fibrinolítica extraída de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 por SDFa foram de 214,21% sendo superiores aos encontrados por estes autores (Tabela 3).

A análise estatística dos resultados demonstrou que todas as variáveis independentes analisadas tiveram efeito significativo positivo sobre a recuperação. Entretanto, se destacaram os efeitos de primeira ordem das variáveis C_{cit} e M_{PEG} que mais influenciaram a recuperação da enzima. A concentração de citrato teve efeito positivo sobre a recuperação indicando que o aumento da concentração do sal favoreceu a recuperação da atividade enzimática na fase rica em PEG (efeito *salting out*). Estes resultados corroboram com os obtidos por Fernandes et al. (2020) ao extrair uma enzima proteolítica por SDFa/PEG citrato, indicando uma possível característica hidrofóbica da superfície enzimática

Da mesma forma, com aumento da massa molar do polímero houve um aumento da recuperação em atividade enzimática na fase polimérica. De acordo com Grilo et al. (2016) o aumento da MPEG aumenta a hidrofobicidade da fase polimérica, favorecendo possíveis interações entre o polímero e resíduos hidrofóbicos presentes na molécula a ser extraída. Apesar desses efeitos apresentarem sinais positivos, sua interação foi negativa e esta mesma tendência foi observada para a resposta coeficiente de partição.

3.3. Fator de purificação (FP)

A enzima obtida de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 foi parcialmente purificada na fase rica em PEG. Considerando a variável FP como a resposta mais importante para o objetivo deste estudo, foi ela que determinou a melhor condição para extração enzimática. O ensaio 12 composto por MPEG 8000 (g/mol), CPEG 24%, C_{cit} 15% e pH 8,0 foi a condição mais favorável encontrada para extração (Figura 2), nesta condição foram obtidos fator de purificação de 4,072 com recuperação de 97,06% (Tabela 2).

Diversos autores também determinaram a melhor condição de extração utilizando SDFa a partir do fator de purificação. Oliveira et al., (2020) ao purificar uma protease colagenolítica de *Cichla ocellaris* obtiveram os maiores valores para FP=

8,24 e $Y = 116\%$ nas condições de pH 8,0, PEG 8000 em SDFA PEG/fosfato de sódio. Silva et al., (2018) purificaram uma protease de *Aspergillus aculeatus* URM4953, obtendo fator de purificação 1,8 com uma recuperação de 85,2%. em PEG/Citrato. Nalinanon et al. (2009) purificaram uma protease de *Thunnus alalunga* por SDFA obtendo um aumento de pureza em 7,2 vezes e uma recuperação de 85,7%.

As variáveis independentes pH, MPEG e Ccit apresentaram efeito estatisticamente significativo positivo para o fator de purificação (FP), indicando que nos ensaios formados pelos maiores níveis destas variáveis foram obtidos melhores valores para o FP (Tabela 3).

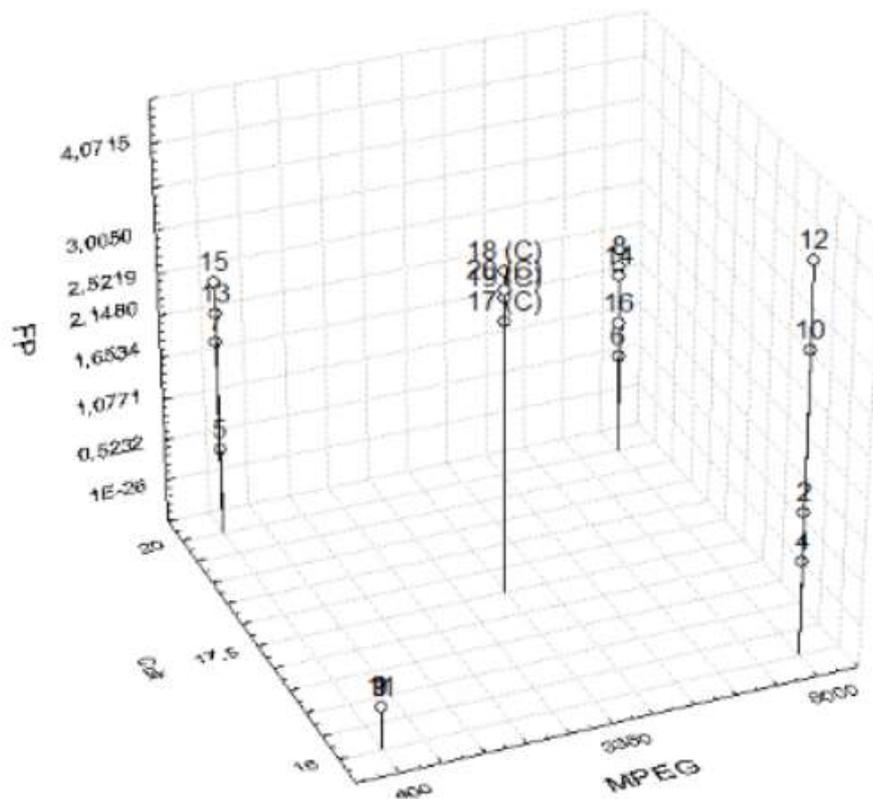


Figura 2- Gráfico cúbico mostra o resultado da interação entre as variáveis: concentração do citrato de sódio e concentração do PEG para resposta fator de purificação da protease fibrinolítica.

O efeito positivo do pH e da MPEG demonstraram que ocorreu uma interação maior entre a enzima e o polímero no nível mais alto estudado PEG 8000 (g/mol) e em pH 8, ou seja, neste pH a partição da proteína é preferencialmente alinhada à fase

superior rica em PEG que também pode ser devido às interações eletrostáticas entre a proteína e as unidades PEG (OLIVEIRA et al., 2020). O pH do sistema influencia os grupos ionizáveis de uma proteína, alterando as cargas superficiais e também o ponto isoelétrico (ALVES et al., 2021).

A interação de segunda ordem entre MPEG e o Ccit (1x3) (Tabela 3) tiveram efeito negativo. Nota-se que estas variáveis exerceram um efeito antagônico sob o FP, visto que, o maior valor calculado desta resposta foi obtido com a MPEG no maior nível (PEG 8000 g/mol) concomitantemente com a Ccit no menor nível (Ccit 15% (m/m)).

3.4. Caracterização bioquímica da protease extraída de *Rhizopus arrhizus*

A protease produzida por *R. arrhizus* UCP 1605 extraída por SDFA na condição de 24% (m/m) de PEG 8000 (g/mol), 15% (m/m) de citrato de sódio e pH 8, foi caracterizada bioquimicamente utilizando atividade proteásica como referência.

3.4.1. Efeitos de pH e temperatura na atividade e estabilidade da protease

A temperatura tem um efeito importante na atividade da enzima, onde a velocidade das reações pode ser acelerada ou diminuída acentuadamente, levando à inativação da enzima (SHOW et al., 2012). Os resultados do efeito da temperatura estão descritos na Figura 3, onde a atividade da protease atingiu sua temperatura ótima em 50°C (Figura 3A), estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Alhelli et al., (2016) ao utilizar extração por SDFA para melhor produção de uma Protease de *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) que apresentou atividade ótima na temperatura de 50°C.

A enzima foi submetida a uma variação de temperatura, para verificar sua estabilidade. A protease mostrou-se estável na faixa de 30 a 60°C durante 60 min com atividade residual de 122,61%, em razão do aumento de temperatura, a protease sofreu uma inativação térmica devido à desnaturação (Figura 3A).

O pH ótimo para a atividade da protease foi de 8,0 e a enzima não foi estável aos pHs testados. Entretanto, vale ressaltar que a enzima extraída se trata de uma protease com atividade fibrinolítica e o substrato testado (azocaseína) não é específico para tal atividade (Figura 3B). Couto et al. (2022) também caracterizaram uma serino-protease com atividade fibrinolítica obtida de *Paenibacillus graminis*, utilizando a azocaseína como substrato e observaram pH ótimo igual a 8.

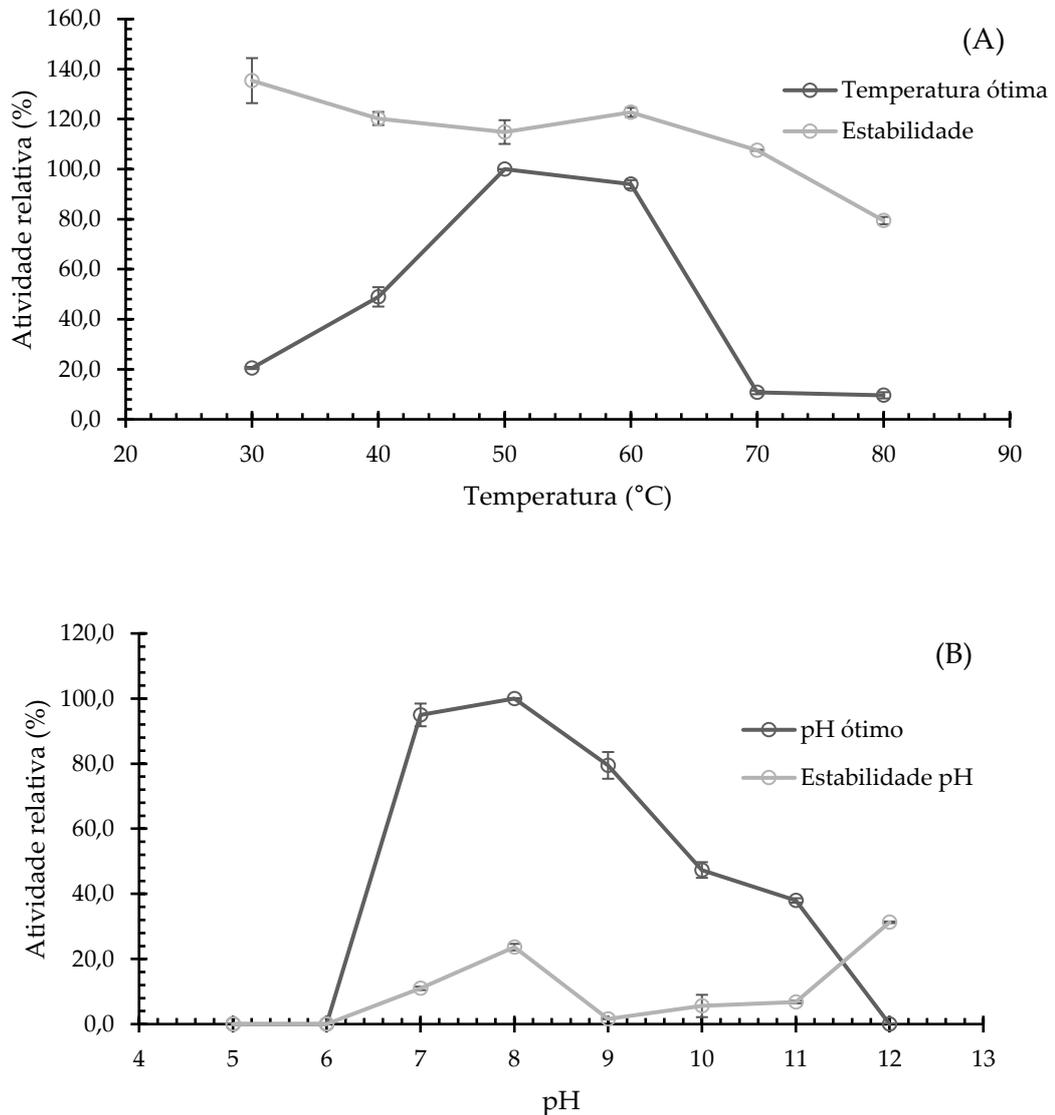


Figura 3- Caracterização bioquímica da protease fibrinolítica de *Rhizopus arrizus* UCP 1605 pré-purificada em SDFA PEGcit (A) Estabilidade a temperatura em SDFA e perfil de atividade relativa versus temperatura, (B) pH ótimo e estabilidade ao pH da amostra e SDFA

Kim et al. (2015), ao utilizarem uma protease fibrinolítica produzida por *Petasites japonicus*, obtiveram pH ótimo em torno de 7,0, sendo estável entre o pH 5,0 e o 8,0. Em relação à temperatura, conseguiram máxima eficiência com 60°C e estabilidade entre 30°C e 60°C. Tais características físico-químicas se assemelham às apresentadas pela protease com atividade fibrinolítica extraída de *R. arrhizus* UCP 1605 por SDFA PEG/citrato.

3.4.2. Efeito dos inibidores na atividade enzimática

Tabela 4- Efeitos de inibidores na atividade proteolítica.

<i>Inibidores</i>	Atividade residual (%)	
	5,0 mM	2,5 mM
Controle	100,00	100,00
Ácido iodoacético	52,92	106,43
EDTA	29,76	62,36
PMSF	9,96	13,57
β - Mercaptoetanol	28,03	38,50

O efeito das diferentes concentrações de inibidores como ácido iodoacético e β -mercaptoetanol inibidores de cisteína protease, EDTA um quelante de íons bivalentes (metalo-protease) e PMSF um inibidor de serino-protease clássico foram examinados em atividade de protease.

O fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) foi o composto que mais inibiu a atividade da protease. Tal inibição foi pronunciada em concentração mais alta (5 mM), o que é característico de uma serina protease. Perfil semelhante foi observado por Matkawala et al., (2020), uma inibição total de uma protease de *Neocosmospora sp.* N1, talvez pela sulfonação de resíduos de serina presentes no sítio ativo, sugerindo que a enzima pertence à família das serino-proteases. O PMSF também foi o composto que mais inibiu a atividade da protease de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 extraída por SDFA PEG/citrato, tal inibição foi mais pronunciada na

concentração de 10 mM, caracterizando uma serina protease (FERNANDES et al., 2020).

3.4.3. Cinética enzimática

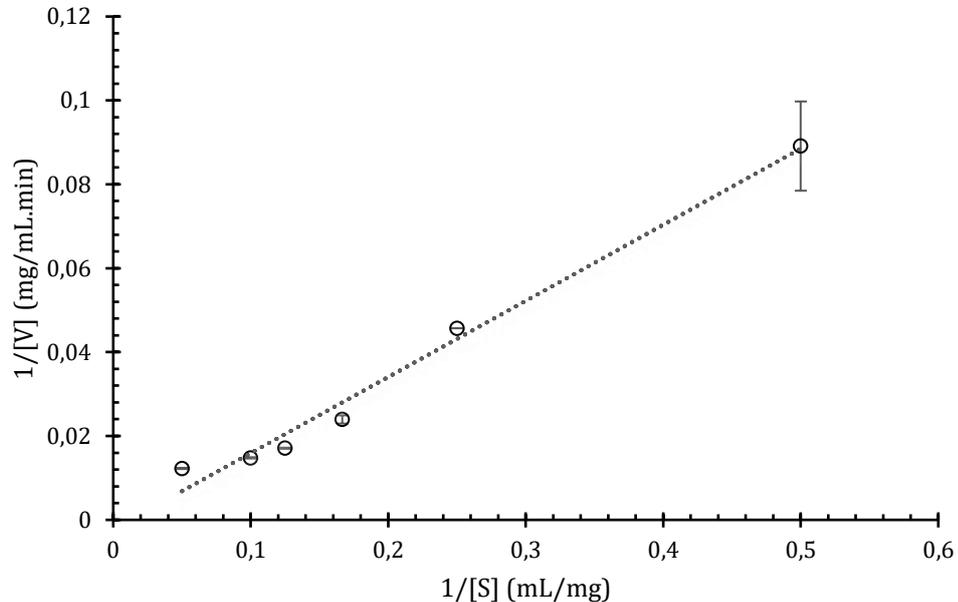


Figura 4- Gráfico de Lineweaver-Burk para protease fibrinolítica pré-purificada em S DFA PEG CIT de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

A partir do gráfico recíproco de Lineweaver-Burk foi possível calcular os parâmetros cinéticos de K_m 88,73mg/mL e V_{max} foi de 526,31 mg/mL/min protease extraída de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 (Figura 4). O valor de K_m elevado indica baixa afinidade da enzima ao substrato específico azocaseína. Destaca-se que a atividade testada é específica para enzimas proteolíticas, entretanto, por mais que a enzima extraída seja uma protease, sua maior especificidade é pelo substrato fibrina, visto que a mesma apresenta maior atividade fibrinolítica do que proteolítica.

Omolara e colaboradores (2015) também obtiveram um alto valor de K_m 40,13 mg/mL para protease obtida de *Aspergillus niger* e Silva et al. (2016) também relataram um valor alto de K_m de 18,7mg/mL e de V_{max} de 28,57mg/mL/min.

4. CONCLUSÃO

O sistema de duas fases aquosas foi utilizado para extrair a enzima fibrinolítica em um processo rápido quando comparado a outras técnicas de purificação. A enzima foi pré-purificada na fase rica em polímero com alta recuperação da atividade inicial 97,06% e fator de purificação de 4,07. A protease fibrinolítica é ativa e estável em pH 8 e temperatura ótima 50°C caracterizando-se como uma A atividade da enzima foi completamente inibida pelo PMSF, indicando que se trata de uma protease do tipo serina. A enzima extraída apresentou bons resultados para degradação da fibrina, estes resultados permitirão futuras aplicações nas indústrias farmacêuticas e para fins fitoterápicos.

5. AGRADECIMENTOS

Steliane Lima Santos agradece à FACEPE (Fundação para a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) pela bolsa de doutorado - processo:IBPG-0622-5.05/17 pela bolsa de doutorado, e todos os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) - processo 471773/2013-1 e CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento do Ensino Superior, Brasil) - processo 88881062200/2014-01 pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, Mohamed A. et al. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 265-271, 2017.

AJIT, Azilah; SULAIMAN, Ahmad Ziad; CHISTI, Yusuf. Production of bioethanol by *Zymomonas mobilis* in high-gravity extractive fermentations. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 123-135, 2017.

ALHELLI, Amaal M. et al. Response surface methodology modelling of an aqueous two-phase system for purification of protease from *Penicillium candidum* (PCA

1/TT031) under solid state fermentation and its biochemical characterization. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, p. 1872, 2016.

ANTOV, Mirjana G.; PERIČIN, Draginja M.; DAŠIĆ, Milica G. Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. **Process biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 232-235, 2006.

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

BALAJI, S. et al. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2741-2745, 2008.

BARROS, Kleber Vânio Gomes et al. PEG/NaPA aqueous two-phase systems for the purification of proteases expressed by *Penicillium restrictum* from Brazilian Savanna. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2305-2312, 2014.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CORRÊA, Ana Paula F.; DAROIT, Daniel J.; BRANDELLI, Adriano. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1-6, 2010.

CURTIS, R. A. et al. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 367-380, 2002.

DA SILVA, Osmar Soares et al. Novel protease from *Aspergillus tamaris* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 04, p. 125, 2016.

DA SILVA, Osmar Soares et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

DAROIT, Daniel J.; CORREA, Ana Paula F.; BRANDELLI, Adriano. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

GAO, Xiong et al. Preparation, physicochemical characterization, and anti-proliferation of selenium nanoparticles stabilized by *Polyporus umbellatus* polysaccharide. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 605-615, 2020.

GINTHER, Charles L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 522-526, 1979.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

IQBAL, Mujahid et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2016.

KIKANI, B. A.; SINGH, S. P. Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 450-460, 2015.

L. de S. Kirsch, AC dos S. Pinto, MFS Teixeira, TS Porto, ALF Porto Partição de proteases de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 pelo sistema bifásico aquoso peg/fosfato Quim. **Nova**, 35, 2012.

MELIKOGLU, Mehmet; LIN, Carol Sze Ki; WEBB, Colin. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76-82, 2013.

OOI, Chien Wei et al. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 68-73, 2011.

P.-A. Albertson Partition of Cell Particles and Macromolecules (3rd ed), Wiley-Interscience. **Wiley-Interscience** (1986).

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource technology**, v. 102, n. 5, p. 4226-4231, 2011.

PERIČIN, Draginja M.; MAĐAREV-POPOVIĆ, Senka Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, Ljiljana M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1996.

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

REH, Georgina et al. Partition features and renaturation enhancement of chymosin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 860, n. 1, p. 98-105, 2007.

ROSA, P. A. J. et al. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296-2305, 2010.

SALES, Amanda Emmanuelle et al. Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus sp.* UFPEDA 485. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1676-1688, 2013.

SALMON, Denise Naomi Xavier et al. Aqueous two-phase extraction for partial purification of *Schizophyllum commune* phytase produced under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 45-52, 2014.

SHOW, Pau Loke et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource technology**, v. 116, p. 226-233, 2012.

SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 476-486, 2000.

Stasoft, I., 2008. STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Version 8.0.

VIANA MARQUES, D. A. et al. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 1, p. 95-103, 2011.

WAZIRI, Saidu M.; ABU-SHARKH, Basel F.; ALI, Sk Asrof. Protein partitioning in aqueous two-phase systems composed of a pH-responsive copolymer and poly (ethylene glycol). **Biotechnology progress**, v. 20, n. 2, p. 526-532, 2004.

YADAV, Santosh Kumar et al. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667-677, 2015.

CAPÍTULO III

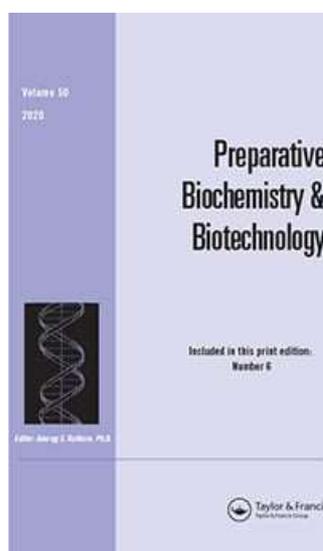
PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO INTEGRADA EM FERMENTAÇÃO EXTRATIVA POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/CITRATO DE UMA PROTEASE DE *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

Steliane Lima Santos, Márcia Nieves da Cunha, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA. Universidade Federal de Pernambuco-UFRPE. Rua Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife – PE, Brasil.

Este artigo será submetido à revista:

Preparative Biochemistry & Biotechnology



Cite Score: 3.4 Impact Factor: 2.16

*Corresponding author

Tatiana Souza Porto

Tel: +55 81987876831

E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br

RESUMO

Enzimas fibrinolíticas podem ser obtidas por processos *in situ* que permitem a fermentação e concentração simultânea. Este artigo avaliou por meio de um planejamento fatorial 2^4 a influência das variáveis massa molar de polietilenoglicol (PEG), pH, concentração de PEG e concentração de citrato de sódio na produção integrada da protease fibrinolítica *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 por fermentação extrativa com sistemas de duas fases aquosas PEG/Citrato, obtendo como resposta o coeficiente de partição (K) e a recuperação em atividade (Y). A enzima foi obtida no sistema que utilizou massa molar de 8000 g/mol de PEG, concentração de PEG 20%, concentração de citrato de sódio 15% e pH 8,0, apresentando um coeficiente de partição (K) de 2,4 recuperação de atividade (Y = 71,5%) e 3,83 U/mL de atividade protease. Estes resultados mostram o potencial da protease produzida por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605, extraída e pré-purificada por fermentação extrativa possibilitando várias aplicações nos setores industriais e biotecnológicos, principalmente, para a indústria farmacêutica.

Palavra-chave: Fermentação extrativa, fermentação *in situ*, sistema de duas fases aquosas, *Rhizopus*, enzima fibrinolítica

ABSTRACT

Fibrinolytic enzymes can be obtained by in situ processes that allow for simultaneous fermentation and concentration. This article evaluated, through a 2⁴-factorial design, the influence of the variables molar mass of polyethylene glycol (PEG), pH, PEG concentration and sodium citrate concentration on the integrated production of the fibrinolytic protease *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 by extractive fermentation with two-stage systems. aqueous phases PEG/Citrate, obtaining as a response the partition coefficient (K) and recovery in activity (Y). The enzyme was obtained in the system that used a molar mass of 8000 g/mol of PEG, concentration of PEG 20%, concentration of sodium citrate 15% and pH 8.0, presenting a partition coefficient (K) of 2.4 recovery of activity (Y = 71.5%) and 3.83 U/mL of protease activity. The protease presented characteristics that allow future industrial applications, mainly for industry.

Key - words: Extractive fermentation, in situ fermentation, aqueous two-phase system, *Rhizopus arrhizus*, fibrinolytic protease

1. INTRODUÇÃO

A crescente busca por compostos bioativos, usados principalmente na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética, tem chamado a atenção para novas estratégias e desenvolvimento de processos eficientes de isolamento, recuperação e purificação de biomoléculas (LEONG et al., 2019). A tendência na elaboração de um bioprocesso econômico é a integração de várias operações unitárias em uma única etapa. A fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) é uma das técnicas que permitem a recuperação do produto ao longo da fermentação (SILVA, ALVES e PORTO, 2018). O conceito deste processo de fermentação envolve a integração de uma única etapa de produção e outra extrativa para sintetizar e remover simultaneamente contaminantes, mas também aumenta a taxa de formação das biomoléculas, minimizando a inibição durante a fermentação. Essa técnica também fornece uma solução tecnológica científica que supera os problemas de baixa produtividade volumétrica característicos das operações biotecnológicas devido à inibição do produto. Além disso, o SDFA fornece um ambiente não desnaturado para compostos bioativos (SHOW et al, 2012).

O SDFA é uma técnica de fracionamento líquido-líquido, baseada no fenômeno simples de imiscibilidade de duas soluções aquosas, como polímero-polímero ou com polímero e sais (por exemplo, fosfato, citrato, sulfato). A fermentação extrativa suporta a rápida exclusão das biomoléculas em uma fase separada, tem ampla prática na separação de metais preciosos, tratamento de águas residuais, em extração, separação e purificação de enzimas (BADHWAR; KUMAR E DUBEY, 2019).

O uso desse método de fermentação extrativo pode ser direcionado para os segmentos de produção e purificação de enzimas como as proteases fibrinolíticas que possuem a capacidade de dissolver a fibrina presente nos coágulos sanguíneos (trombos), mantendo assim o fluxo uniforme nos vasos (CRUZ FILHO et al., 2020).

Na produção dessas enzimas os micro-organismos destacam-se nesse processo, sendo distribuídos mundialmente. As vantagens das enzimas microbianas são a produção em larga escala com controle de temperatura e pH, independência da sazonalidade, e o uso de substratos de baixo custo como resíduos agrícolas (PAN et al., 2019).

Essa abordagem integrativa não só economiza tempo e custo, mas também reduz o risco de perda de produto durante os processos de separação e purificação individuais. Além disso, as vantagens da fermentação extrativa também incluem a diminuição dos efeitos tóxicos do produto no crescimento microbiano, minimiza os efeitos de degradação causados por temperatura e pH e superação de baixa produtividade volumétrica que muitas vezes ocorrem no processo de fermentação convencional. Na fermentação extrativa a partição da biomolécula é devida à sua afinidade com componentes de fase, assim, a separação das biomoléculas é influenciada por diversas variáveis como tipo e concentração de sal, massa molar e concentração de polímero, pH, temperatura e propriedades do bioativo (CRUZ FILHO et al., 2020).

Este trabalho teve como objetivo avaliar as condições ótimas para a produção e purificação integrada da protease por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 na fermentação extrativa com polietilenoglicol PEG/citrato de sódio, como compostos formadores de fase, e a caracterização bioquímica dessa enzima.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O fungo *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 utilizado foi obtido na coleção de culturas UCP Universidade Católica de Pernambuco, Recife-PE, Brasil. O isolado foi preservado em óleo mineral, reativados em solução nutritiva contendo 0,5% de extrato de levedura, 3% de glicose e 0,03% de Tween 80 durante 96h e mantido para crescimento em meio de manutenção Czapek Dox Agar medium por 5 dias a 30°C, em seguida transferidos a partir de uma suspensão de esporos coletados após a adição de 5,0mL de uma solução de NaCl a 0,9%) e Tween 80 a 0,01% esterilizada previamente a 121°C por 20 min.

2.2. Produção de protease por fermentação submersa

O meio utilizado para produção da protease foi o MS-2 descrito por Porto et al. (1996). A fermentação ocorreu em Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL do meio. Os

frascos foram inoculados com volume adequado de uma suspensão de esporos para a concentração final de 10^5 esporos/mL e incubados a 30°C , sob agitação orbital 120rpm, por 96h. Após este tempo o fermentado foi filtrado e centrifugado por 10min a 4000rpm. O sobrenadante foi denominado extrato enzimático e foi utilizado para determinações analíticas. Esta fermentação foi realizada para comparação com a fermentação extrativa. Dados não mostrados.

2.3. Produção e extração simultânea de protease por fermentação extrativa

A protease foi produzida utilizando fermentação extrativa por sistemas de duas fases aquosas (SDFA) em frascos Erlenmeyer de 125mL, utilizando as soluções de polietilenoglicol (PEG) e citrato de sódio com concentrações variadas de acordo com um planejamento fatorial (Tabela 1), adicionados de meio de cultivo com o substrato farinha de soja, meio MS-2, descrito por Porto et al. (1996), com a seguinte constituição: filtrado de soja (3%), Cloreto de Amônio (0,1%), Sulfato de Magnésio heptahidratado (0,06%), extrato de levedura (0,1%), glicose (1,5%), Fosfato de Potássio Bibásico (0,435%) e 1 mL de solução mineral (100mg de Sulfato de Ferro; 100mg de Cloreto de Manganês; 100mg de Cloreto de Zinco e água destilada q.s.p. 100mL).

A fermentação extrativa foi inoculada com uma suspensão de esporos para uma concentração final de 10^5 esporos/mL e mantida a 30°C e 120 rpm por até 96h. No final do processo, os frascos foram deixados em repouso por 1h e posteriormente centrifugados a 10.000rpm por 10min para separar as fases rica em PEG e rica em sal. Em seguida, as fases foram submetidas à medição do volume e às determinações analíticas (teor de proteína e atividade de protease).

Para avaliar a influência da massa molar do polietilenoglicol (MPEG), concentração de PEG (CPEG), concentração de citrato de sódio (Ccit) e o pH, foi realizado um planejamento fatorial 2^4 (Tabela 1), obtendo como resposta o coeficiente de partição (K), recuperação em atividade (Y). As análises estatísticas para o planejamento experimental foram realizadas no pacote de software Statistica 8.0 (Stasoft, 2008).

Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^4 para a fermentação extrativa SDFA PEG/citrato de uma protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605.

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
MPEG (g/mol)	400	3350	8000
CPEG (% m/m)	20,0	22,0	24,0
Ccit (% m/m)	15,0	17,5	20,0
pH	6,0	7,0	8,0

MPEG-Massa molar do PEG, CPEG-Concentração do PEG, Ccit-Concentração do citrato.

2.4. Determinações analíticas

A concentração total de proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976). A atividade proteásica foi realizada de acordo com Leighton et al. (1973) modificado. Resumidamente, 0,15mL de extrato enzimático foi misturado com 0,25mL de solução de azocaseína (10mg/mL de caseína impregnada com corante azo dissolvido em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4) durante 60min a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2mL de ácido tricloroacético a 10%. As amostras foram centrifugadas a 8000rpm (Z326K - HERMLE Labortechnik GmbH) durante 15min a 4°C. Posteriormente, 0,8mL do sobrenadante foi adicionado a 1,4mL de NaOH 1,0M. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz de levar a um aumento de 0,1 na absorbância a 420nm em 1h.

2.5. Determinação da razão de volume, coeficiente de partição e recuperação

Os valores relativos da atividade da protease foram determinados como a razão entre a atividade da enzima (U/mL) na solução da amostra e no sistema de controle (fermentação submersa sem componentes SDFA).

A razão do volume (V_P) representa a proporção do volume da fase superior (V_S) para o volume da fase inferior (V_B) (Eq.1):

$$V_P = \frac{V_S}{V_I} \quad (1)$$

Os coeficientes de partição da protease (K) foi calculada como a razão entre a atividade de protease na fase superior (A_s) para a fase inferior (A_i), respectivamente (Eq.2):

$$K = \frac{A_S}{A_I} \quad (2)$$

A recuperação da atividade (Y%) foi determinada usando a Eq. (3) (Sinha et al., 2000):

$$Y = \frac{100}{1+(V_R) \cdot (\frac{1}{K})} \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Fermentação extrativa usando SDFa para produção de protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605

Foi realizado uma produção e extração usando SDFa da protease fibrinolítica por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605. A matriz do planejamento fatorial para produção e extração *in situ* da enzima, bem como, os resultados das respostas: coeficiente de partição (K) e recuperação enzimática (Y) das fases Sal e PEG são apresentados na Tabela 2.

A baixa concentração de sal e de polímero nos ensaios 1, 3, 9 e 11 formados por PEG 400 (g/mol) não formaram fases. A curva binodal separa o sistema entre bifásico e monofásico, quando os componentes do sistema possuem concentrações acima da curva ocorre a formação de um sistema bifásico e abaixo da curva não ocorre formação de fases. Os componentes presentes nesses ensaios não foram suficientes para atingir o ponto crítico, estando abaixo da curva binodal (PORTO et al., 2007). A não formação de fases é um fenômeno observado no processo integrado de fermentação extrativa as interações entre os componentes do meio de cultivo podem influenciar na formação de fase, pois os sais que compõem o meio de cultura

MS-2 deslocaram a curva binodal aumentando a concentração de sal para o SDFA PEG-citrato de sódio, da mesma forma que outros autores também observaram o mesmo fenômeno (IQBAL et al., 2016, DA SILVA et al., 2018)

Tabela 2- Matriz do Planejamento Fatorial completo 2⁴ com resultados da extração de protease usando fermentação extrativa

Ensaio	MPEG (g/mol)	CPEG% (m/m)	Ccit% (m/m)	pH	K	Y%	AT _{SAL}	AT _{PEG}
1	400	20	15	6	---	---	---	---
2	8000	20	15	6	1,43	50,99	1,93	2,76
3	400	24	15	6	---	---	---	---
4	8000	24	15	6	0,62	39,68	2,66	1,66
5	400	20	20	6	0,78	46,39	2,50	1,96
6	8000	20	20	6	0,75	35,80	3,53	2,66
7	400	24	20	8	1,50	66,66	1,20	1,80
8	8000	24	20	8	0,83	33,29	3,56	2,96
9	400	20	15	8	---	---	---	---
10	8000	20	15	8	2,39	71,50	1,60	3,83
11	400	24	15	8	---	---	---	---
12	8000	24	15	8	1,23	58,86	2,96	3,66
13	400	20	20	8	1,67	62,65	2,06	3,46
14	8000	20	20	8	0,45	25,28	3,56	1,63
15	400	24	20	8	1,10	54,80	1,30	1,43
16	8000	24	20	8	0,37	26,11	3,23	1,20
17	3325	22	17,5	7	0,94	55,73	2,40	2,26
18	3325	22	17,5	7	0,92	55,59	2,23	2,06
19	3325	22	17,5	7	0,97	52,91	2,26	2,20
20	3325	22	17,5	7	0,98	49,58	1,96	2,00

MPEG = Massa molar do PEG. CPEG = Concentração do PEG. Ccit = Concentração de citrato de sódio. K = Coeficiente de partição. Y= Recuperação em atividade. AT_{SAL}

= Atividade proteásica na fase inferior. AT_{PEG} = Atividade proteásica na fase superior.
---= não houve formação de sistema bifásico.

A protease com atividade fibrinolítica obtida por fermentação submersa e fermentação extrativa usando SDFa foram comparadas. O melhor resultado para atividade da enzima na fermentação submersa foi de 10,37 U/mL para atividade proteásica e atividade fibrinolítica com halo de degradação em placa de fibrina de 31 mm correspondendo a 850,60 U/mL. Nas mesmas condições de cultivo, mas na fermentação extrativa (SDFa), a atividade proteolítica foi de 3,83 U/mL. Para esta situação, a recuperação enzimática obtida foi de 71,50%. Esses resultados demonstram que apesar do menor valor da atividade proteolítica, o processo integrado apresentou vantagens, pois com o uso da fermentação extrativa, foi possível obter uma recuperação satisfatório da enzima alvo.

3.2. Efeitos no coeficiente de partição (K)

A protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 obtida por fermentação extrativa, particionou tanto para a fase rica em PEG quanto para a fase rica em sal, enquanto as células foram particionadas na interface. O maior valor de $K = 2,39$ foi obtido nas condições presentes no ensaio 10 formado por MPEG 8000 (g/mol) na concentração de 20% (m/m), com concentração de citrato de 15% (m/m) e pH 8 respectivamente (Tabela 2). A partição enzimática no SDFa depende da concentração da fase, que deve ser otimizada para máxima produção e purificação das enzimas (BARROS et al., 2014). ALVES et al., (2021) ao produzirem e extraírem simultaneamente uma protease de *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279 utilizando SDFa PEG/citrato, obtiveram K de 16,03 no ensaio composto por Ccit 20%

Após análise estatística dos resultados, observou-se na Tabela 3 os efeitos das variáveis independentes de primeira ordem massa molar do PEG (MPEG), concentração de PEG (CPEG), concentração de citrato (Ccit) e pH, bem como as interações entre elas sobre as variáveis respostas coeficiente de partição (K) e recuperação da atividade (Y).

Tabela 3- Efeitos das variáveis independentes e de suas interações sob a produção de protease de *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 por fermentação extrativa em Sistema de duas fases aquosas (SDFA) formado por PEG/citrato utilizando planejamento fatorial 2⁴.

Variáveis e interações	Efeitos	
	K	Y
(1) MPEG	29,17*	9,59*
(2) CPEG	-17,65*	-1,14
(3) Ccit	17,24*	11,23*
(4) pH	12,60*	-2,28
1x2	-20,31*	-3,29*
1x3	-80,11*	-28,61*
1x4	3,12	1,52
2x3	20,12*	2,99
2x4	-17,35*	-2,25
3x4	-17,68*	-4,58*
1x2x3	17,46*	0,85
1x2x4	7,40*	2,60
1x3x4	-27,15*	-5,34*
2x3x4	-10,55*	-2,03

MPEG = Massa molar PEG. CPEG = Concentração PEG. Ccit = Concentração citrato de sódio. K = Coeficiente de partição. Y=Recuperação em atividade na fase superior.

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 3 observamos que, todas as variáveis independentes apresentaram efeitos significativos sobre o K. As variáveis independentes massa molar do PEG e concentração de citrato apresentaram os maiores efeitos sendo eles positivos. Através do diagrama de interpretação geométrica apresentado na Figura 1A podemos observar que a interação entre as variáveis (1x3) apresentou efeito antagônico sob o K, visto que, o maior valor de K foi obtido com a maior MPEG (8000g/mol) combinado com a menor concentração de

citrato (15%*m/m*), sendo a interação entre essas variáveis o efeito que mais influenciou a partição da enzima.

As interações entre as variáveis (1x2 e 2x3) também demonstraram o mesmo efeito antagônico, onde a menor concentração de PEG (C_{PEG}) combinadas tanto com a maior massa molar PEG 8000 ou com a maior concentração de citrato (C_{cit}) favoreceram a partição da enzima para a fase rica em polímero (Tabela 3).

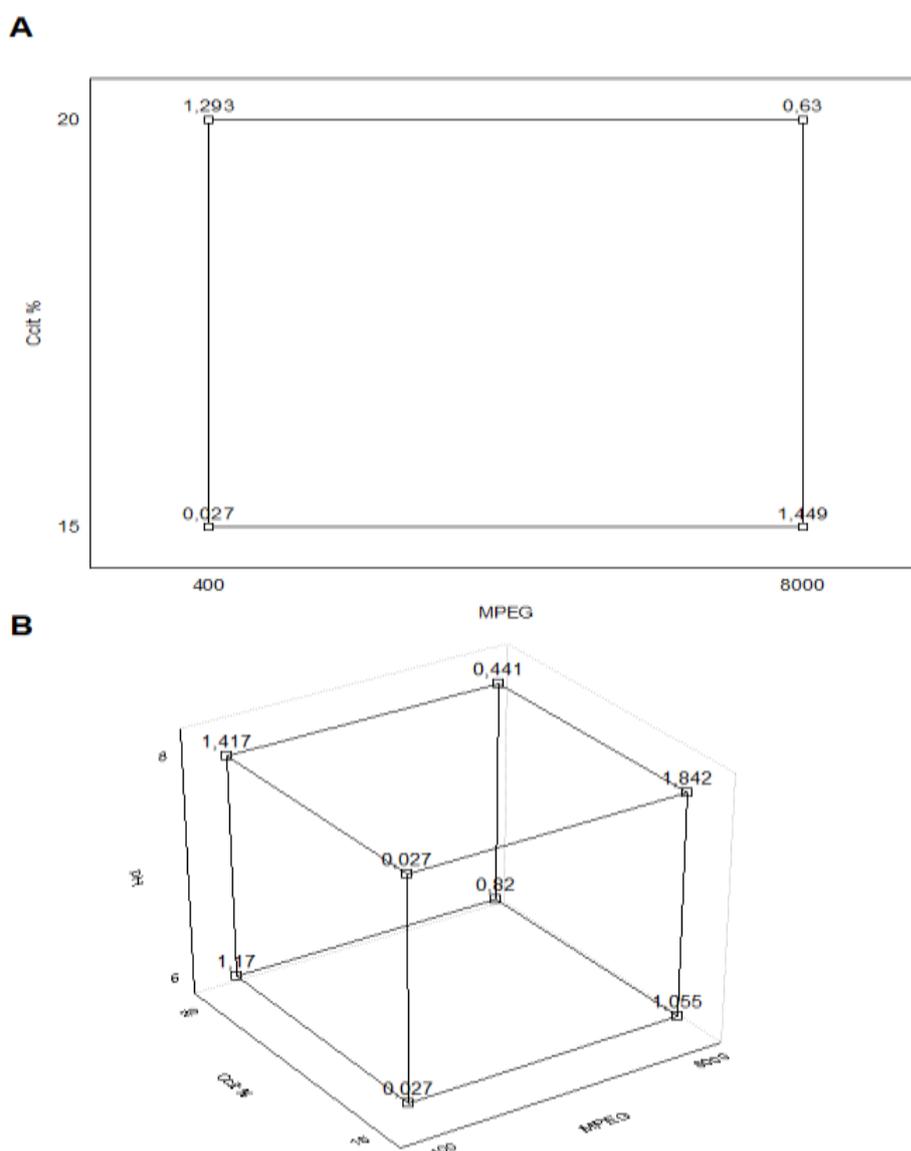


Figura 1- Diagrama de interpretação geométrica da interação entre os efeitos massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio e (B) Gráfico cúbico dos efeitos do pH, concentração de citrato e massa molar do PEG (MPEG) tendo como variável resposta o coeficiente de partição (K)

A interação significativa entre as variáveis massa molar do PEG, concentração de citrato e pH (1x3x4) apresentou efeito negativo e demonstra que interdependência entre as diferentes variáveis envolvidas no processo de fermentação extrativa (Figura 1B). O pH mesmo não apresentando efeito significativo isoladamente, quando analisado dentro das interações, demonstrou sua importância. Show et al (2012) relataram que a modificação do pH pode alterar a interação proteína-proteína ou proteína-polímero, da mesma forma, modificar a concentração do polímero, favorecendo ou não os grupos funcionais, pode causar a repulsão ou atração da biomolécula.

3.3. Efeitos na recuperação em atividade (Y)

A recuperação na fermentação extrativa é uma variável importante já que se trata de uma produção e extração simultânea, desta forma refletindo no sucesso do processo biotecnológico. Na fermentação extrativa o meio de produção e o SDFA podem alterar a fisiologia celular do micro-organismo, além disso, os componentes do SDFA podem modificar a viscosidade do meio devido aos polímeros inseridos e, conseqüentemente, modificar a produção da biomolécula e sua partição (SILVA et al. 2018).

A maioria das pesquisas apresenta uma faixa de valores de recuperação para a enzima proteásica que é considerada adequada variando entre 63% a 99% aproximadamente (RATHNASAMY et al., 2020, DA SILVA et al., 2018). A melhor recuperação em atividade ($Y=71,5\%$) foi alcançada nas seguintes condições: menor massa molar PEG (8000 g/mol), maior concentração de PEG 20%, concentração de citrato 15% e pH 8 (Tabela 2, ensaio 10).

A Tabela 3 apresenta os efeitos das variáveis independentes e de suas interações para a variável resposta recuperação da atividade (Y), dentre as quais as tiveram efeito estatisticamente significativo, pois os valores dos efeitos estimados estão acima do nível de significância estatística ($p=0,05$). Dentre as variáveis independentes, a concentração de citrato (C_{cit}) foi a variável com maior efeito significativo, seguida da massa molar do PEG (MPEG), ambas com efeito positivo.

Estes efeitos indicaram que nos níveis mais altos estudados (20% de citrato de sódio e PEG 8000 g/mol) a enzima apresentou melhores resultados de recuperação.

Os efeitos de interação foram significativos e negativos, destacam-se a MPEG e Ccit (1x3) e MPEG e CPEG (1x2) sobre a recuperação da atividade de protease (Tabela 3). No diagrama de interpretação geométrica presente na Figura 2 observa-se a interação 1x3. Nota-se que as variáveis exerceram um efeito antagônico sobre a recuperação da atividade proteolítica, mas em ambas interações a concentração é positiva, logo o aumento da concentração de citrato melhora a recuperação da enzima, configurando assim o efeito *salting out*. Iqbal et al. (2016) explicaram que o efeito *salting out* move a biomolécula da fase rica em sal para a fase rica em polímero. Alves et al., (2021) na extração *in situ* de uma protease de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 obtiveram recuperação de 92,53% e Silva et al., (2018) também extraíram *in situ* uma protease de *Aspergillus tamarii* URM 4634 e observaram formação de fase e na condição citadas acima com recuperação de 79,3%.

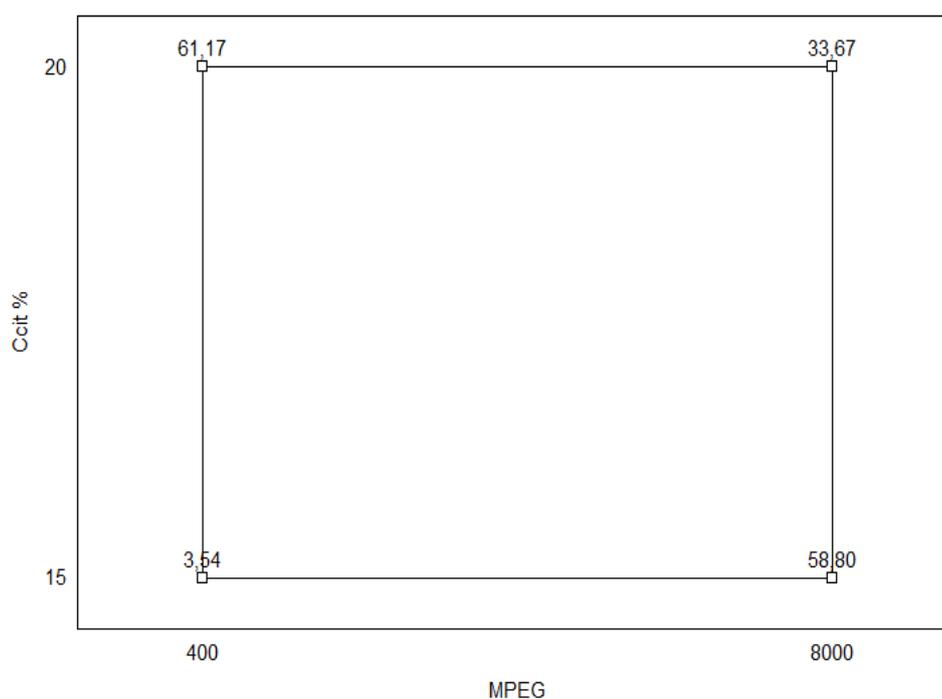


Figura 2- Diagrama de interpretação geométrica da interação entre os efeitos massa molar do PEG e concentração de citrato de sódio tendo como variável resposta recuperação enzimática (Y).

4. CONCLUSÃO

A fermentação extrativa SDFA/citrato de sódio foi realizada para concentrar proteases produzidas por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605. O ensaio 10 composto por PEG 8000, CPEG 20%, Ccit 15% e pH 8 apresentou as melhores condições para extração da protease. Na fermentação extrativa com SDFA PEG/citrato de sódio, a recuperação em atividade foi de 71,5% com coeficiente de partição na fase rica em PEG $K= 2,9$. Nessas condições, seus contaminantes foram particionados na fase inferior rica em sal, enquanto a enzima de interesse foi concentrada na fase superior rica em polímero, sendo parcialmente purificada.

5. AGRADECIMENTOS

Steliane Lima Santos agradece à FACEPE (Fundação para a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) pela bolsa de doutorado - processo:IBPG-0622-5.05/17 pela bolsa de doutorado, e todos os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) - processo 471773/2013-1 e CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento do Ensino Superior, Brasil) - processo 88881062200/2014-01 pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

ABDEL-NABY, Mohamed A. et al. Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 265-271, 2017.

AJIT, Azilah; SULAIMAN, Ahmad Ziad; CHISTI, Yusuf. Production of bioethanol by *Zymomonas mobilis* in high-gravity extractive fermentations. **Food and Bioproducts Processing**, v. 102, p. 123-135, 2017.

ALHELLI, Amaal M. et al. Response surface methodology modelling of an aqueous two-phase system for purification of protease from *Penicillium candidum* (PCA 1/TT031) under solid state fermentation and its biochemical characterization. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 11, p. 1872, 2016.

ANTOV, Mirjana G.; PERIČIN, Draginja M.; DAŠIĆ, Milica G. Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. **Process biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 232-235, 2006.

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

BADHWAR, Parul; KUMAR, Punit; DUBEY, Kashyap Kumar. Extractive Fermentation for Process integration and amplified pullulan production by *A. pullulans* in Aqueous Two Phase Systems. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019.

BALAJI, S. et al. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2741-2745, 2008.

BARROS, Kleber Vânio Gomes et al. PEG/NaPA aqueous two-phase systems for the purification of proteases expressed by *Penicillium restrictum* from Brazilian Savanna. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 12, p. 2305-2312, 2014.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CORRÊA, Ana Paula F.; DAROIT, Daniel J.; BRANDELLI, Adriano. Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 64, n. 1, p. 1-6, 2010.

CRUZ FILHO, Raimundo Felipe da et al. Comparison of conventional and extractive fermentation using aqueous two-phase system to extract fibrinolytic proteases produced by *Bacillus stearothermophilus* DPUA 1729. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 191-200, 2021.

CURTIS, R. A. et al. Protein-protein interactions in concentrated electrolyte solutions. **Biotechnology and bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 367-380, 2002.

DA SILVA, Osmar Soares et al. Novel protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 04, p. 125, 2016.

DA SILVA, Osmar Soares et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

DAROIT, Daniel J.; CORREA, Ana Paula F.; BRANDELLI, Adriano. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009.

GAO, Xiong et al. Preparation, physicochemical characterization, and anti-proliferation of selenium nanoparticles stabilized by *Polyporus umbellatus* polysaccharide. **International journal of biological macromolecules**, v. 152, p. 605-615, 2020.

GINTHER, Charles L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 522-526, 1979.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

IQBAL, Mujahid et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 1-18, 2016.

KIKANI, B. A.; SINGH, S. P. Enzyme stability, thermodynamics and secondary structures of α -amylase as probed by the CD spectroscopy. **International journal of biological macromolecules**, v. 81, p. 450-460, 2015.

LEONG, Yoong Kit et al. Application of thermo-separating aqueous two-phase system in extractive bioconversion of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16. **Bioresource technology**, v. 287, p. 121474, 2019.

MELIKOGLU, Mehmet; LIN, Carol Sze Ki; WEBB, Colin. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76-82, 2013.

OOI, Chien Wei et al. Extractive fermentation using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 68-73, 2011.

PANDEY, S. K.; BANIK, R. M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresource technology**, v. 102, n. 5, p. 4226-4231, 2011.

PERIČIN, Draginja M.; MAĐAREV-POPOVIĆ, Senka Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, Ljiljana M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009.

PETERS, T. J. Partition of cell particles and macromolecules: Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. P-A. Albertsson. 1986, John Wiley and Sons, Chichester, £ 61.35 pages 346. 1987.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1996.

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

PORTO, Tatiana Souza et al. Removal of proteases from *Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 547-552, 2007.

REH, Georgina et al. Partition features and renaturation enhancement of chymosin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, v. 860, n. 1, p. 98-105, 2007.

ROSA, P. A. J. et al. Aqueous two-phase systems: a viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2296-2305, 2010.

SALES, Amanda Emmanuelle et al. Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus sp.* UFPEDA 485. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1676-1688, 2013.

SHOW, Pau Loke et al. Extractive fermentation for improved production and recovery of lipase derived from *Burkholderia cepacia* using a thermoseparating polymer in aqueous two-phase systems. **Bioresource technology**, v. 116, p. 226-233, 2012.

SINHA, J.; DEY, P. K.; PANDA, T. Aqueous two-phase: the system of choice for extractive fermentation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 54, n. 4, p. 476-486, 2000.

Stasoft, I., 2008. STATISTICA (Data Analysis Software Systems) Version 8.0.

VIANA MARQUES, D. A. et al. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. **Biotechnology progress**, v. 27, n. 1, p. 95-103, 2011.

WAZIRI, Saidu M.; ABU-SHARKH, Basel F.; ALI, Sk Asrof. Protein partitioning in aqueous two-phase systems composed of a pH-responsive copolymer and poly (ethylene glycol). **Biotechnology progress**, v. 20, n. 2, p. 526-532, 2004.

YADAV, Santosh Kumar et al. Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667-677, 2015.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma nova protease fibrinolítica foi produzida pelo fungo filamentosso *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 através de fermentação submersa, utilizando farinha de soja como substrato, com uso de planejamento fatorial. A enzima extraída por sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Citrato é uma protease fibrinolítica alcalina que apresenta recuperação em atividade de 97 % e um fator de purificação 4. A enzima presente no extrato enzimático e no SDFA apresentaram temperatura ótima de 50°C e pH 8 como ótimo. A enzima presente no extrato enzimático e no pré-purificado apresentam especificidade para degradação de fibrina e suas características bioquímicas foram descritas e relevantes para possíveis aplicações, sendo obtidas por processos que propõem reduzir etapas e proporcionar uma maior rapidez no processo de purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos filamentosos. A protease também foi produzida por fermentação extrativa em sistema de duas fases aquosas PEG/citrato, que mostrou ser uma técnica com potencial, obtendo resultados consideráveis para sua utilização. Verificou-se que nas condições ideais a enzima produzida por *Rhizopus arrhizus* UCP 1605 obteve o valor máximo para atividade fibrinolítica. Nessas condições, seus contaminantes foram particionados na fase rica em sal enquanto a enzima de interesse se concentrou na fase rica em polímero, sendo parcialmente purificada. Quanto a recuperação, os resultados obtidos são considerados relevantes, atingindo valor de recuperação entre 71% e 97% na maioria dos testes. Os métodos de produção e extração da protease fibrinolítica propõem reduzir etapas, a enzima obtida demonstrou uma alta especificidade para degradação de fibrina suas e características bioquímicas e estruturais foram descritas como relevantes para possíveis aplicações.