



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

THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS
PRODUZIDAS POR *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP 1262 PARA POSSÍVEL
APLICAÇÃO NA TERAPIA TROMBOLÍTICA.**

Recife
2018

Thiago Pajeú Nascimento

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS
PRODUZIDAS POR *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP 1262 PARA POSSÍVEL
APLICAÇÃO NA TERAPIA TROMBOLÍTICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Attilio Converti

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Recife
2018

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Thiago Pajeú

Purificação e caracterização de proteases fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 para possível aplicação trombolítica / Thiago Pajeú Nascimento. – 2018.

66 f. : il.

Orientador: Attilio Converti.

Coorientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Enzimas proteolíticas I. Converti, Attilio (orientador) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (coorientadora) III. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 114

Thiago Pajeú Nascimento

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS
PRODUZIDAS POR *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP 1262 PARA POSSÍVEL
APLICAÇÃO NA TERAPIA TROMBOLÍTICA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada a Saúde.

Aprovada em: 07/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Attilio Converti (Orientador)

Università degli Studi di Genova - UNIGE

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes (Titular)

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Camila Souza Porto (Titular)

Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Campus Arapiraca

Prof^ª. Dr^ª. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Raquel Pedrosa Bezerra (Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

DEDICATÓRIA

*“A minha mãe Maria Odete Ferreira Pajeú, por
todo o amor, ensinamento, valores, dedicação e
exemplo de mulher e de pessoa em minha vida”*

AGRADECIMENTOS

O Deus por sempre iluminar meus caminhos, por me ajudar a nunca desistir dos obstáculos e dificuldades da vida, me fazendo enfrentar com coragem e dedicação e por ter colocado pessoas especiais na minha vida até hoje.

Ao meu orientador, o professor Dr. Attilio Convertei que sempre prestou toda a devida atenção, orientação e confiança no desenvolvimento da minha tese.

A minha Co-orientadora, a professora Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto, por todo o acompanhamento na minha vida científica, desde a iniciação até o presente momento, sendo sempre compreensiva e um exemplo de profissional dedicada e perseverante.

A prof. Dr^a. Tatiana Souza Porto, por todo o aprendizado repassado, as ajudas em determinados momentos da minha vida tanto acadêmica quanto pessoal, serei sempre grato. Aos professores Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão e Dr^a. Camila Souza Porto, por toda a ajuda imprescindível para a realização do presente trabalho, além de todos os conselhos e ensinamentos repassados por todo esse tempo de convivência. A prof. Dr^a. Maria Taciana por ter iniciado meu caminho nesse ramo da pesquisa científica.

Aos meus eternos amigos e colaboradores para o desenvolvimento do presente trabalho: Amanda Sales, Wendell Albuquerque, Juanize Matias, Meire Falcão, Patyanne Correia, Márcia Nieves, Vagne Oliveira e Michelly Ellen pessoas que posso contar além do ramo profissional.

A todos os alunos, professores e técnicos do LABTECBIO e da Universidade Federal Rural de Pernambuco, meu muito obrigado, por tornarem esse ambiente de trabalho um lugar incrível que pude conviver no dia a dia, ao longo desses 10 anos.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao LIKA e a todos os professores, funcionários e estudantes do programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, por terem me acolhido tão bem, especialmente ao prof. Dr. Luiz de Carvalho e ao secretário Fábio Costa, por sempre se apresentarem atenciosos e prestativos.

A todos os meus amigos de graduação do Departamento de Ciências Farmacêuticas especialmente a: Marília Silva, Matheus Marinho, Amanda Correia,

Alice Gabriela, Johnny Victor, Camylla Tenório, Eloiza Marcelle, Arion Tomaz, Samuel Aleixo, Lorena Oliveira, Pedro Martins, Josias Junior, Jéssica Canuto e a todos os outros não aqui citados, mas que sempre me ajudaram nos momentos de conciliação entre o doutorado e a graduação.

Aos meus amigos e companheiro de todas as horas: Cláudio Henrique, Juliana Batista, Kielma Farias, Valquíria Neves, Marcela Araújo, Caroline Fontão, Gabriela Fernandes, Júliet Bertino, João Campos, André Batista, Amanda Souza e Ivson Abreu por sempre me apoiarem e escutarem minhas lamentações e desabafos ao longo desses anos de tese.

E em especial a minha família, que sempre me apoiou nessa caminhada científica especialmente aos meus tios Sônia e Eduardo e aos meus primos Carol, Vanessa e Rodrigo.

A FACEPE por todo o suporte financeiro durante todo o doutorado, ao CNPq pela concessão de verba para o desenvolvimento do projeto.

Aos professores Dr. José Antônio Teixeira Couto da Universidade do Minho – (Portugal), a Dr^a. Galba Maria de Campos – Takaki da Universidade Católica de Pernambuco, ao Dr. Uvesky da Universidade da Flórida (EUA), por toda colaboração e ajuda no desenvolvimento do projeto e da tese.

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas
continue em frente de qualquer jeito”
Martin Luther King, 1960

RESUMO

A utilização de enzimas proteolíticas em aplicações terapêuticas tem sido um dos objetivos da indústria farmacêutica nos últimos anos. Entre as várias proteases utilizadas em terapias, destacam-se as proteases fibrinolíticas, que são enzimas capazes de degradar a fibrina, principal componente do coágulo sanguíneo. Há uma crescente busca por metodologias eficazes e de baixo custo para a purificação dessas enzimas, uma vez que qualquer fármaco necessita de um alto grau de pureza e especificidade para evitar reações imunológicas. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi purificar proteases fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 através de sistema de duas fases aquosas e métodos cromatográficos, além de caracterizá-las bioquímica e estruturalmente. Um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 e a metodologia de superfície de resposta foram usados para identificar as condições ótimas para a extração de uma protease fibrinolítica por sistema de duas fases aquosas, enquanto métodos cromatográficos tradicionais foram utilizados para purificar outra protease fibrinolítica. A primeira enzima foi recuperada e purificada parcialmente por sistemas de duas fases aquosas constituídos por polietilenoglicol (PEG) e sulfato de sódio, onde a melhor condição a do sistema formado por 30,0% (m/m) de PEG 6000 g/mol e 13,2% (m/m) de sulfato de sódio, que assegurou um fator de purificação de 10, um coeficiente de partição de 0,2 e uma recuperação de 102,0%. A SDS-PAGE e o zimograma de fibrina revelaram que essa protease fibrinolítica purificada tem uma massa molecular de 97 kDa e um ponto isoelétrico de 5,4 e é uma serino protease semelhante a quimotripsina. A temperatura ótima da enzima foi de 37°C e sua atividade foi estável por 150 minutos. A outra protease fibrinolítica foi pré-purificada inicialmente através de precipitação com sulfato de amônio (40 – 60% de saturação) e posteriormente através de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex A50) e gel filtração (Superdex 75 HR10/300) e igualmente caracterizada como serino protease do tipo quimiotripsina, com uma massa molecular de 20 kDa, um ponto isoelétrico de 4,94, e temperatura e pH ótimos de 40°C e 8,0 respectivamente. Sua atividade proteásica foi aumentada na presença de Cu^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} e sua estrutura secundária mostrou alta composição de α -hélice e nenhuma mudança significativa após exposição à presença de polímeros ou da maioria de agentes desnaturantes. Este estudo demonstra a possibilidade de purificar proteases fibrinolíticas com baixo custo e de considerá-las como potenciais candidatos a agentes trombolíticos.

Palavras chaves: *Mucor subtilissimus*. Protease fibrinolítica. SDFA. Cromatografia.

ABSTRACT

The use of proteolytic enzymes in therapeutic applications has been one of the goals of the pharmaceutical industry in recent years. Among the various proteases used in therapies are fibrinolytic proteases, which are enzymes capable of degrading fibrin, the main component of the blood clot. There is a growing search for efficient and low cost methodologies for the purification of these enzymes, since any drug requires a high degree of purity and specificity to avoid immunological reactions. In this sense, the objective of this work was the purification of fibrinolytic proteases produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 through aqueous two-phase system and chromatographic methods, as well as their biochemical and structural characterization. A full 2^3 type factorial design and response surface methodology were used to identify optimal conditions for the extraction of a fibrinolytic protease by aqueous two-phase system, while traditional chromatographic methods were used to purify another fibrinolytic protease. The former enzyme was recovered and partially purified by aqueous two-phase systems consisting of polyethylene glycol (PEG) and sodium sulfate, the best condition being that of the system consisting of 30.0% (w/w) PEG 6000 g/mol and 13.2% (w/w) sodium sulfate, which ensured a purification factor of 10, a partition coefficient of 0.2 and a recovery of 102.0%. SDS-PAGE and fibrin zymogram revealed that this purified fibrinolytic protease has a molecular mass of 97 kDa and an isoelectric point of 5.4, and is a chymotrypsin-like serine protease. The enzyme optimum temperature was 37°C and its activity was stable for 150 minutes. The other fibrinolytic protease was initially pre-purified by ammonium sulfate precipitation (40-60% saturation) and subsequently by ion exchange chromatography (DEAE-Sephadex A50) and gel filtration (Superdex 75 HR10/300), and equally characterized as chymotrypsin-like serine protease, with a molecular mass of 20 kDa, an isoelectric point of 4.94, and optimum temperature and pH of 40°C and 8.0, respectively. Its protease activity was increased in the presence of Cu^{2+} , Mg^{2+} and Fe^{2+} , and its secondary structure showed high α -helix composition and no significant change after exposition to the presence of polymers or of most of the denaturing agents. This study demonstrates the possibility of purifying fibrinolytic proteases at low cost and considering them as potential candidates as thrombolytic agents.

Key words: *Mucor subtilissimus*. Fibrinolytic protease. ATPS. Chromatography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Utilização de proteases industriais, terapêuticas e acadêmicas. (Fonte: LI et al., 2013).....	20
Figura 2 –	Diagrama esquemático da cascata de coagulação, iniciando logo após a lesão vascular e consequente à exposição do Fator Tecidual (FT) ao sangue circulante. A trombina exerce uma retro-alimentação positiva (linhas pontilhadas) pela ativação de plaquetas e outras proteínas pró-coagulantes. A plaqueta ativada fornece o Fosfolípídeo de Membrana (FM), aumentando a formação de complexos enzimáticos. As plaquetas ativadas são fixadas ao endotélio lesado por meio do Fator de Von Willebrand (FVW) (fonte: Barbosa et al., 2009).....	22
Figura 3 –	Degradação do coagulo de fibrina pelo extrato bruto contendo a protease fibrinolítica produzida pelo <i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262 através da fermentação em estado sólido. A- 0 min, b- 20 min, c – 40 min, d – 60 min (foto do acervo pessoal).....	24
Figura 4 –	<i>Mucor subtilissimus</i> (a) <i>M. Subtilissimus</i> crescido em meio czapek. (b) <i>M. Subtillissimus</i> crescidos através da FES utilizando farelo de trigo como substrato. (Foto pessoal).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Principais enzimas utilizadas em aplicações médicas.....	20
Tabela 2 –	Enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos e algumas de suas características bioquímicas.....	27
Tabela 3 –	Composição nutricional em 100g de farelo de trigo.....	32
Tabela 4 –	Purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por diferentes micro-organismos por sistema de duas fases aquosas.....	36
Tabela 5 –	Enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos e purificadas por métodos cromatográficos.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
MDIC	Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
FT	Fator Tecidual
FvW	Fator de Von Willebrand
IM	Infarto do Miocárdio
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CTI	Cromatografia de Troca iônica
DCP	Doença Vascular Periférica
DCV	Doença Cardíaca Valvular
BSA	Bovino Soro Albumina
DCVs	Doenças Cardiovasculares.
DX	Dextrana
EC	Comissão Internacional de Enzimas.
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.
FS	Fermentação Submersa
FES	Fermentação em Estado Sólido
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PPG	Polipropilenoglicol
K	Coeficiente de Partição
kDa	Quilodaltons.
MEROPS	Banco de dados online sobre proteases.
OMS	Organização Mundial de Saúde.
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogênionico.
PMSF	Fluoreto de Metilfenilsulfonil.
RPM	Rotações por minuto.
SDFA	Sistema de Duas Fases Aquosas
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio.
t-PA	Ativador Tecidual do Plasminogênio.
UCP	Universidade Católica de Pernambuco
UK	Uroquinase.
°C	Grau Celsius

Ve	Volume espacial
Mm	Micrometro
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
PCC	Planejamento de Central Composto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ENZIMAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO	19
2.2 PROTEASES	19
2.3 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	21
2.3.1 Mecanismo de ação	21
2.3.2 Agentes trombolíticos	23
2.4 O GÊNERO <i>MUCOR</i>	26
2.5 PROCESSO FERMENTATIVO	30
2.5.1 Fermentação em estado sólido (FES)	30
2.5.2 Uso do farelo de trigo como substrato	32
2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E TRATAMENTO FINAIS DE ENZIMAS	32
2.6.1 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)	34
2.6.2 Métodos cromatográficos	37
2.6.2.1 Cromatografia de Troca Iônica	37
2.6.2.2 Cromatografia de gel filtração	38
2.7 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E DICROÍSMO CIRCULAR	40
3 ARTIGOS PUBLICADOS	42
3.1 CAPÍTULO I – PURIFICATION OF A FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM <i>MUCOR SUBTILISSIMUS</i> UCP 1262 BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS (PEG/SULFATE)	42
3.2 CAPÍTULO II – PURIFICATION, BIOCHEMICAL, AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL FIBRINOLYTIC ENZYME FROM <i>MUCOR SUBTILISSIMUS</i> UCP 1262	44
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXO	62

1 INTRODUÇÃO

Dentre as proteases com utilização terapêutica destacam-se as proteases fibrinolíticas, enzimas que degradam a fibrina, principal componente proteico dos coágulos sanguíneos formados a partir da ativação do fibrinogênio pela trombina (EC 3.4.21.5) (DEEPAK et al., 2010; JIN et al., 2013; STEPHANI et al., 2017). Essa formação do coágulo sanguíneo é caracterizada como um fenômeno de proteção do corpo humano que bloqueia o excesso de saída dos fluidos corporais durante lesões vasculares podendo bloquear o vaso sanguíneo ocasionando a trombose (CHOI et al., 2011), uma das doenças mais prevalentes na vida moderna dificultando o fluxo sanguíneo e promovendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como o infarto agudo do miocárdio (AGREBI et al., 2009; WANG et al., 2011; SHIRASAKA et al., 2012).

Enzimas fibrinolíticas têm sido produzidas por micro-organismos isolados de alimentos fermentados tradicionais orientais, como o “Natto” japonês (SUMI et al., 2004), minhocas, serpentes (WANG et al., 2011; VIVAS et al., 2016), cogumelos comestíveis ou medicinais (LEE et al., 2006), além de bactérias dos gêneros *Bacillus* sp (SOUZA et al., 2016) e *Streptomyces* sp (MEDEIROS E SILVA et al., 2016), cianobactérias (BANERJEE et al., 2013) e fungos (CHANG et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2016). Os fungos filamentosos é uma boa alternativa para a produção de enzimas fibrinolíticas, uma vez que se têm destacado por produzirem proteases de forma extracelular (GERMANO et al., 2003) destacando-se excelentes produtores (NASCIMENTO et al., 2016).

Entretanto para o seu uso, estas enzimas fibrinolíticas necessitam de um alto grau de pureza, especificidade para evitar reações imunológicas e serem estáveis em condições fisiológicas (MUSSATTO et al., 2007). O desenvolvimento eficiente de bioprocessos para a recuperação e purificação dessas enzimas representa uma das principais preocupações para a indústria biotecnológica (YEGIN et al., 2012). Nesse sentido, o sistema de duas fases aquosas vem sendo utilizado como um método alternativo para ser utilizado como uma pré-purificação, principalmente nas áreas de biomoléculas, sendo amplamente usado para biosseparação de enzimas e proteínas por conta do seu baixo custo em relação a outros processos de separação (JARA & PILOSOFF, 2011; ELBERT, D.L., 2011). Outra possibilidade têm sido os métodos cromatográficos que permitem alta resolução em apenas um passo, e têm sido a base

para a separação de proteínas, em particular na indústria biofarmacêutica, onde são requeridos elevados graus de pureza (RAYMOND, 2003; SHANMUGAPRAKASH et al., 2015).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Purificar e caracterizar proteases fibrinolíticas produzidas pelo fungo filamentosso *Mucor subullissimus* UCP 1262 para possível aplicação na terapia trombolítica.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Purificar uma protease fibrinolítica utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Polietilenoglicol/sulfato de sódio) determinando as condições mais adequadas por meio de planejamento fatorial para obter maior purificação da enzima e analisando a influência das variáveis (massa molar e concentração do PEG, e concentração de sulfato de sódio) sobre a extração da protease fibrinolítica e as respostas do processo de purificação (coeficiente de partição, recuperação e fator de purificação);
- b) Determinar as condições mais adequadas para obtenção da protease fibrinolítica por métodos cromatográficos;
- c) Determinar proteínas totais, atividade proteásica e a atividade fibrinolítica da enzima purificada por SDFA e métodos cromatográficos;
- d) Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada pelo SDFA e métodos cromatográficos quanto: ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e a temperatura, inibidores, efeito de íons, efeito de surfactantes e substratos cromogênicos;
- e) Caracterizar o perfil eletroforético da protease fibrinolítica purificada por SDFA e métodos cromatográficos utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), eletroforese bidimensional (2D) e zimograma de fibrina;

- f) Caracterizar estruturalmente a enzima purificada por métodos cromatográficos através de espectroscopia de dicroísmo circular no UV distante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENZIMAS DE INTERESSE FARMACÊUTICO

Estima-se que os custos com enzimas especiais (são aquelas destinadas ao uso terapêutico, diagnóstico, analítico, química fina e pesquisa) sejam em torno de 1,8 bilhões de dólares (POLITZER & BOM, 2006; ZIMMER et al., 2009), sendo que o mercado global de enzimas movimentou em 2015, cerca de US\$3,74 bilhões (<http://www.companiesandmarkets.com>).

Enzimas de uso farmacêutico somam 39% do mercado mundial de enzimas (POLITZER & BOM, 2006), das enzimas terapêuticas e kits de diagnóstico que contenham enzima como base utilizadas no Brasil, cerca de 86% são importadas, o que se torna uma desvantagem tecnológica no uso destes catalisadores no país (POLITZER & BOM, 2006). Durante o período de 1998-2005, o Brasil importou o equivalente a US\$ 85 milhões com estas enzimas terapêuticas (AEHLE, 2007).

Algumas enzimas que têm propriedades para aplicações médicas são descritas na Tabela 1, entretanto para o uso dessas enzimas, elas devem apresentar características fundamentais como: alto grau de pureza e especificidade, antigenicidade baixa (para evitar reações imunológicas) e estabilidade em condições fisiológicas (MUSSATTO et al., 2007). Muitas das enzimas utilizadas atualmente para aplicações terapêuticas são proteases (MORYA et al., 2012).

2.2 PROTEASES

Proteases (EC 3.4.21-24) são o grupo mais importante de enzimas, as quais desempenham um relevante papel em diversos mecanismos bioquímicos e metabólicos nos organismos (SIRITAPETAWE et al., 2012; HARISH & UPPULURI, 2018). Podem ser classificadas de acordo com sua capacidade de clivagem na ligação peptídica, podendo ser do tipo exopeptidases (atuam nas regiões finais da cadeia) ou endopeptidases (agem preferencialmente nas porções mais internas da cadeia polipeptídica) (YEGIN et al., 2011). As enzimas proteolíticas são classificadas com base no intervalo de pH da sua atividade ótima em: ácidas, neutras e alcalinas (SANDHYA et al., 2005).

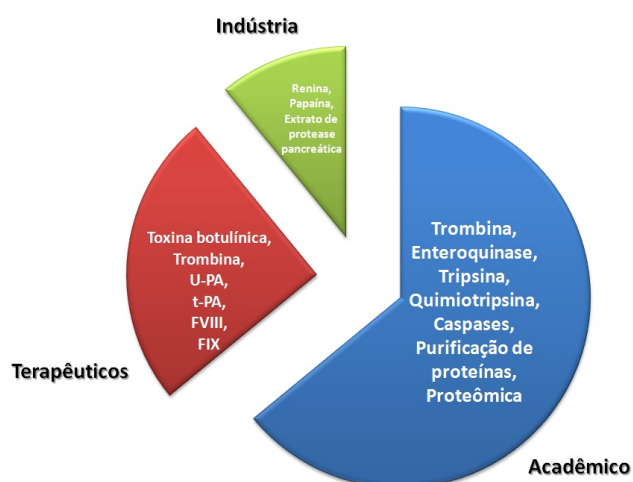
As proteases microbianas representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais (MUKHERJEE & RAI, 2011; OSMOLOVSKIY et al., 2016), e tem aplicações nas indústrias de detergentes, alimentos, couros, têxteis, processos de

biorremediação, bem como produtos farmacêuticos (Figura 1) (LASSOUED et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Tabela 1 - Principais enzimas utilizadas em aplicações médicas.

Enzima	Fonte	Aplicação médica	Referencia
Lisozima	<i>Micrococcus luteus</i>	Ação antibiótica ou anti- inflamatória	SILVA et al., 1999.
Bromelina	<i>Casca de abacaxi</i>	Ação antibiótica ou anti- inflamatória, facilitam a digestão	KETNAWA et al., 2010.
L-asparaginase	<i>Escherichia coli</i>	Terapia da leucemia	JIANG & ZHAO, 1999.
Papaína	<i>Carica papaya</i>	Facilita a digestão	ZIMMER et al., 2009
Colagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	Debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas	AEHLE, 2007
Galactosidase	<i>Streptomyces griseolobus</i>	Melhora a digestibilidade do leite e derivados lácteos, ideais para consumidores intolerantes à lactose	ANISHA & PREMA, 2008
Urato oxidase	<i>Aspergillus flavus</i>	Terapia da Gota	ZIMMER et al., 2009
Estreptoquinase	<i>Streptococcus β-hemolítico</i>	Coágulo sanguíneo	AEHLE, 2007
Lipase	<i>Rhizopus arrhizu</i>	Indicada nos casos de deficiência em enzimas pancreáticas e indigestão.	MONTEIRO & SILVA, 2009.
Serrapeptidase	<i>Serratia E15</i>	Inflamação	CRUZ et al., 2008

Figura 1 - Utilização de proteases industriais, terapêuticos e acadêmico.



Fonte: adaptado de LI et al., 2013.

No entanto, a produção de proteases ainda não é o suficiente para atender a crescente demanda do mercado mundial (SUNDARARAJAN et al., 2011). A tendência é aos poucos substituir as enzimas produzidas por vegetais e animais pelas de origem microbiana, pois além de ser sua maior fonte, devido à sua ampla diversidade bioquímica (SANDHYA et al., 2005), as enzimas podem ser produzidas em um menor tempo (RAO; NARASU, 2007; RAVIKUMAR et al., 2012; ABO-ELMAGD & HOUSSEINY, 2012) e esses micro-organismos podem ser modificados geneticamente, para que forneçam qualquer enzima de nosso interesse (MUSSATTO et al., 2007).

2.3 ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

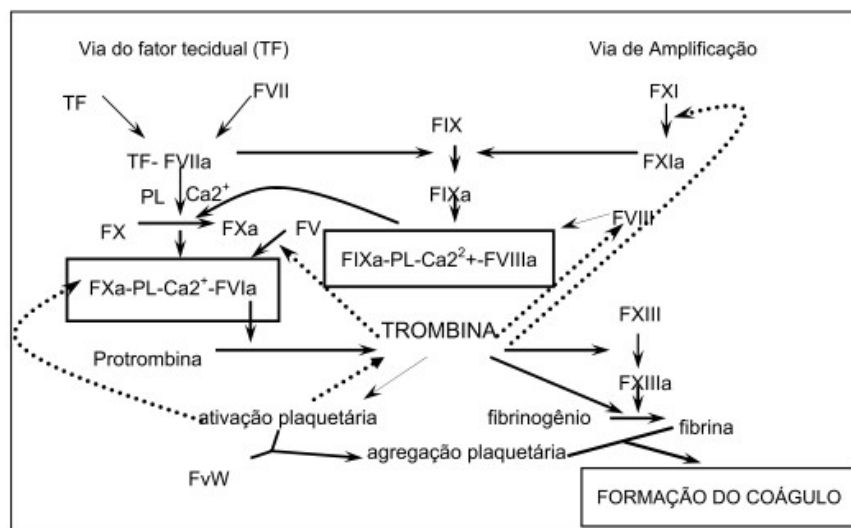
2.3.1 Mecanismo de ação

Proteases com atividade fibrinolítica possuem a capacidade de degradar a fibrina, que é o principal componente proteico dos coágulos sanguíneos formados a partir da ativação do fibrinogênio pela trombina (CE 3.4.21.5) (DEEPAK et al., 2010). Normalmente a fibrina encontra-se equilibrada em sistemas biológicos, já que a hemostase é obtida através de um equilíbrio ideal entre o sangramento e a formação de coágulos sanguíneos (KIM et al., 2008; PANDEE et al., 2008; VIVAS et al., 2016).

No processo de coagulação, a trombina converte o fibrinogênio em fibrina, resultando na formação de coágulos (CASTRO et al., 2011). O fibrinogênio é uma glicoproteína que contém dois conjuntos de três cadeias polipeptídicas, α , β e γ , durante o processo de coagulação: Os dois conjuntos de α e os dois de β são clivados por trombina e os resultantes chamados de fibrinopeptídeos ou resíduos de fibrina; α e β são posteriormente liberados (KIM et al., 2011; PATEL et al., 2012; PARK et al., 2013).

A trombina (EC 3.4.21.5) é uma serino-protease mencionada geralmente na cascata como fatores de coagulação, gerada a partir da protrombina por ação de um complexo de fatores Xa e V. Ela está envolvida em muitos processos, tais como a sinalização celular, memória e hemostasia, além de ser conhecida por ser uma enzima chave na coagulação ligando ambas as vias intrínsecas e extrínsecas da cascata (BARBOSA et al., 2009; OSIPOV et al., 2010; CASTRO et al., 2011). O modelo atual da cascata está representado na Figura 2 proposta por Barbosa et al. (2009), que apresenta uma via única chamada de mono via, formada por uma via do fator tecidual (antigamente chamada de via extrínseca) e a via de amplificação (antiga via intrínseca).

Figura 2 - Diagrama esquemático da cascata de coagulação, iniciando logo após a lesão vascular e consequente à exposição do Fator Tecidual (FT) ao sangue circulante. A trombina exerce uma retro-alimentação positiva (linhas pontilhadas) pela ativação de plaquetas e outras proteínas pró-coagulantes. A plaqueta ativada fornece o fosfolipídeo de membrana (PL), aumentando a formação de complexos enzimáticos. As plaquetas ativadas são fixadas ao endotélio lesado por meio do Fator de von Willebrand (FvW).



Fonte: BARBOSA et al., 2009.

A presença do trombo (do grego *thrómbos* que significa coágulo sanguíneo) no sistema cardiovascular representa um processo crítico para a manutenção da integridade vascular podendo ocasionar um bloqueio da passagem sanguínea, levando a consequências graves como: infarto do miocárdio (IM), acidente vascular cerebral (AVC), embolia pulmonar (BARBOSA et al., 2009; CASTRO et al., 2011; VAIDYA et al., 2011; SHIRASAKA et al., 2012) e outras doenças cardiovasculares, sendo que a trombose vascular ou o tromboembolismo venoso pode inclusive levar a uma incapacidade do paciente e até mesmo ao óbito (KIM & CHOI, 2000; MINE et al., 2005; CHANG et al., 2012; MAJAHAN et al., 2012). Esse problema clínico e o aumento de doenças cardiovasculares têm sido cada vez mais frequentes, sobretudo nos países ocidentais em desenvolvimento (TIBAZARWA & DAMASCENO, 2014).

A prevalência de doenças cardiovasculares vem impondo um impacto cada vez maior em nossa sociedade tanto emocional, quanto social e financeiramente (KIM et al., 2011; DEVI et al., 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCVs) assim como a pressão alta se apresentaram como a causa

número um de mortes globais nos últimos anos, onde cerca de 17 milhões de pessoas são acometidas de doenças cardiovasculares (MANDER et al., 2011; BAJAJ et al., 2013). Estima-se que no ano de 2030, o índice de óbitos aumentará de 29 para 38,11% (JOSHI et al., 2008).

2.3.2 Agentes trombolíticos

Devido ao tromboembolismo ser uma complicação médica letal com uma incidência elevada é utilizado atualmente alguns medicamentos chamados de agentes trombolíticos (ZHANG et al., 2007; VIJAYARAGHAVAN et al., 2016). Embora o nome “trombolítico” seja frequentemente utilizado, é um engano nomear esses agentes desta forma, uma vez que um dos mecanismos de ação deles é ativarem o plasminogênio em plasmina, e esta sim possui a capacidade degradar a fibrina (OLIVEIRA, 2001). Dessa forma os “agentes fibrinolíticos” podem ser divididos de acordo com o seu mecanismo de ação em:

- a) Ativadores do plasminogênio – São responsáveis por ativarem o plasminogênio em plasmina ativa, para que esta atue degradando a fibrina (LU et al., 2010). Entre estes ativadores, se destacam: o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) (EC 3.4.21.68) (PENNICA et al., 1983), streptokinase (EC 3.4.24.29) (MEDVED et al., 1966; LIJNEN et al., 1992), staphylokinase (EC3.2.1.35) (LIJNEN et al., 1992; ARAI et al., 1995), uroquinase (u-PA, 3.4.21.73) (MUKHAMETOVA et al., 2002; BLANN et al., 2002; ZHANG et al., 2007).
- b) *Plasmina – like* - Enzimas que assim como a plasmina atuam diretamente degradando a fibrina (LU et al., 2010). Como exemplos podem citar: a lumbroquinase (LU & CHEN, 2010) e a nattoquinase (YIN et al., 2010; NI et al., 2016).

Embora se tenha uma grande diversidade de agentes fibrinolíticos, muitos apresentam inúmeros efeitos colaterais como: podem proporcionar alergias, são termolábeis (ou seja, se decompõe durante o aquecimento), há uma limitação da especificidade da fibrina (MURRAY et al., 2010), necessitam de grandes doses terapêuticas (MURRAY et al., 2010), apresentam um tempo de meia vida curto, dentro do organismo, propiciar uma dissecação aórtica (OLIVEIRA, 2001), além de poderem propiciar hemorragias (estima-se que cerca de 20% dos pacientes tratados com

ativadores do plasminogênio apresentem algum efeito adverso de sangramento) (CHITTE e DEY, 2000; CHUNG et al., 2008). Além disso, um dos maiores problemas desses agentes têm sido os elevados preços em virtude do seu alto custo de produção (LU et al., 2010).

Portanto, tem-se buscado novas fontes de enzimas fibrinolíticas, principalmente do tipo *plasmina-like* isto é que atuam diretamente na degradação da fibrina (Figura 3), sem necessidade da ativação do plasminogênio em plasmina, ou seja, fármacos trombolíticos que atuem apenas no local necessário, evitando os efeitos colaterais já citados (UESUGI et al., 2010; NAVEENA & GOPINATH et al., 2012).

Com isso, a busca por enzimas fibrinolíticas que tenham um custo de produção mais barato e que sejam obtidas a partir de metodologias simples e eficazes são de extrema importância do ponto de vista industrial (WANG et al., 2011).

Como já mencionado muitos agentes fibrinolíticos apresentam desvantagens, devido a reações alérgicas, baixa eficácia e efeitos colaterais (KIM et al., 2011; HUANG et al., 2013; ZHANG et al., 2013) por isso, a busca por novas fontes dessas enzimas que sejam mais eficazes, seguras e economicamente viáveis é necessária (NAVEENA & GOPINATH et al., 2012).

Figura 3 - Degradação do coagulo de fibrina pelo extrato bruto contendo a protease fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 através da fermentação em estado sólido. A- 0 min, B- 20 min, C – 40 min, D – 60 min .

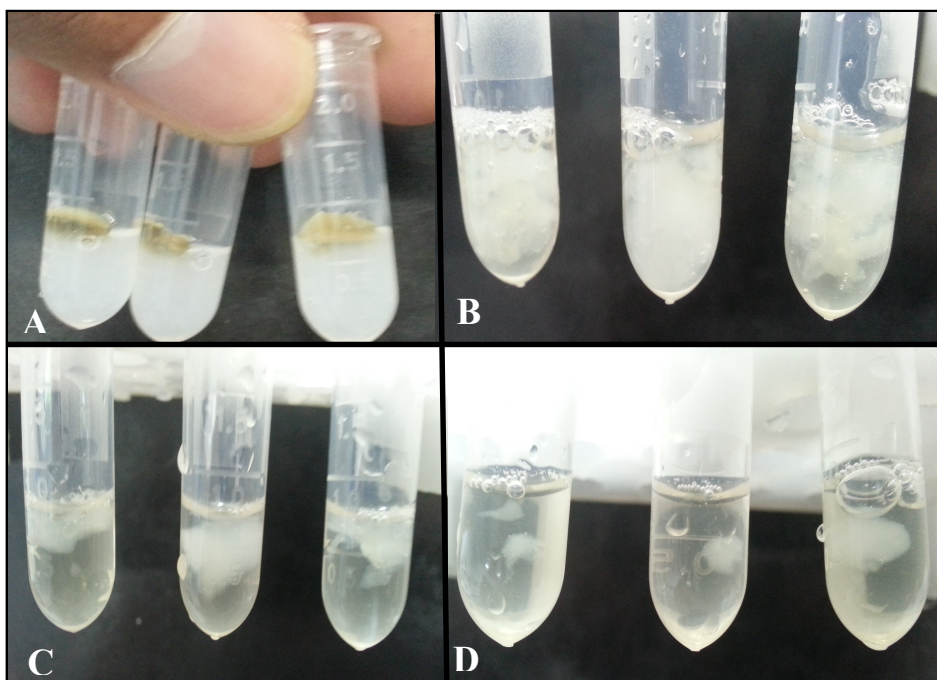


Foto do acervo pessoal

Dentre as primeiras fontes de enzimas fibrinolíticas descobertas destacam-se os alimentos fermentados de soja: *Douch* de origem chinesa (WANG et al, 2006), o *Cheong Guk Jang* de origem coreana e o *Natto* de origem japonesa, ambos consumidos a mais de 2000 anos e fermentados com o auxílio de bactérias da espécie *Bacillus* (DUBEY et al., 2011; YOON & HYE, 2010). Esta bactéria é uma das principais produtoras de diferentes tipos de enzimas fibrinolíticas, sendo o *Bacillus subtilis natto*, uma bactéria isolada a partir do *Natto*, e que produz a nattoquinase, uma enzima fibrinolítica descrita pela primeira vez em 1987 e que tem sido investigada e utilizada no uso clínico, devido a sua capacidade de reduzir a formação de coágulos sanguíneos (OMURA et al., 2005; RADNAAABAZAR et al., 2011; ZHANG et al., 2013).

Alguns animais também têm sido fontes de isolamento de enzimas fibrinolíticas sendo isoladas principalmente a partir de veneno de serpente, como exemplos têm as espécies: *Bothrops pirajai* (MENALDO et al., 2012), *Bothrops atrox* (CINTRA et al., 2012); *Agkistrodon saxatilis* (KOH et al., 2011) *Lapemis hardwickii* (HE et al., 2007) e *Bothrops colombiensis* (VBC) esta última espécie está envolvida na maioria dos acidentes ofídicos da Venezuela e têm demonstrado além de uma ação de degradar diretamente à fibrina, não possuir uma ação tóxica e nem efeitos secundários como hemorragias, sendo investigado seu uso para o tratamento de doenças trombolíticas (GÍRON et al., 2013). Outras enzimas com atividade fibrinolítica também tem sido encontrada em poliquetas: *Neanthes japônica* (WANG et al., 2011) e *Neanthes japonica* (Iznka) (DENG et al, 2010), insetos (AHN et al, 2003), minhocas (WANG et al, 2006) e até mesmo em tecidos que revestem os ferrões de arraia marinha como a das espécies *Dasyatis sephen* e *Aetobatis narinari* (KUMAR et al., 2011).

As plantas por serem ricas fontes de compostos químicos e com valores medicinais, também têm sido alvos de investigações de isolamento de proteases que atuem na degradação de coágulos sanguíneos, sendo essas enzimas isoladas e caracterizadas a partir do látex de *Euphorbia hirta* (PATEL et al., 2012), de folhas de *Spondias dulcis* (ISLAM et al., 2013) e até mesmo de ervas, já tradicionalmente utilizadas na medicina popular asiática como a *Ganoderma lucidum* Vk12 (KUMARAN et al., 2011). Muitas dessas enzimas fibrinolíticas têm sido isoladas e produzidas a partir de diferentes fungos, bactérias, e algas (LU et al, 2010). Bactérias como os *Streptomyces* sp. tem demonstrado atividade fibrinolítica (CHITTE et al., 2011; CHITTE & DESHMUKH, 2011; BHAVANI et al., 2012; JU et al., 2012; MEDEIROS E SILVA et al., 2013).

Entretanto os fungos vêm se destacando, por produzirem proteases com atividades fibrinolíticas de forma extracelular, o que torna uma vantagem para a produção e baixo custo em larga escala, entre os fungos mais estudados estão os cogumelos comestíveis ou medicinais como o *Paecilomyces tenuipes* (KIM et al., 2011), *Pleurotus ostreatus* (LIU et al., 2014) , *Armillaria mellea* (LEE et al., 2005); *Ganoderma lucidium* (CHOI & SÁ, 2000) e os fungos filamentosos: *Aspergillus oryzae* KSK-3 (SHIRASAKA & NAITOU, 2012)., *Schizophyllum commune* (PARK et al, 2010) e *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO et al., 2016).

2.4 O GÊNERO *MUCOR*

Nos últimos 20 anos, entre os micro-organismos utilizados na FES, cerca de 50% são pertencentes à classe dos fungos filamentosos, 30% de leveduras, 15% actinomicetos e 5% bactérias (MARIANO et al., 1995). Sendo que os fungos filamentosos vêm se destacando nesse tipo de fermentação. Nos últimos anos, houve uma crescente demanda para descoberta de enzimas produzidas por fungos, dentre essas enzimas, algumas proteases fibrinolíticas podem ser produzidas como podem ser observados na Tabela 2.

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e eficientes na degradação de diversos substratos. Entre os fungos, o gênero *Mucor* compreende cerca de 80 espécies altamente prevalentes no meio ambiente (solo, ar, poeira) (MORIN-SARDIN et al., 2017) e algumas espécies são conhecidas por serem contaminantes de alimentos (carne, frutas, verduras) (MORIN-SARDIN et al., 2016), sendo considerado o mais representativo e estudado dentre os gêneros de Mucoraceae.

Tabela 2 - Enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos e algumas de suas características bioquímicas.

Espécie	Tempo de fermentação para a produção da enzima	Temperatura ótima da enzima fibrinolítica	pH ótimo da enzima	Peso molecular (kDa)	Referência
<i>Lyophyllum shimeji</i>	-	37°C	8,0	21	MOON et al., 2014
<i>Schizophyllum commune</i>	7 dias	50°C	8,0	-	PANDEE et al., 2008
<i>Bionectria</i> sp.	5 dias	-	-	173, 153 e 80	ROVATI et al., 2010
<i>Pleurotus eryngii</i>	30 dias	40°C	5,0	14	CHA et al., 2010
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP1262	3 dias	37°C	-	97	NASCIMENTO et al., 2016
<i>Cordyceps militaris</i>	5 dias	37°C	7,4	52	KIM et al., 2006
<i>Lignosus rhinocerus</i>	-	40°C	7,0	34 e 10	NOOR et al., 2016
<i>Tremella fuciformis</i>	-	40°C	8,0	38	CHOI et al., 2015

Esse gênero se destaca pela sua produção de proteases extracelulares, amilases e lipases (YEGIN et al., 2011; MORIN-SARDIN et al., 2017). *Mucor* é um fungo filamentoso (Figura 4), mas que pode se apresentar sob a forma leveduriforme podendo formar um pseudomicélio ou constituir hifas, que podem agrupar-se ou justapor-se, porém nunca formando um micélio verdadeiro (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; YIKE, 2011). É um fungo mesófilo (YEGIN et al., 2011), morfologicamente simples, e que pode ser isolado a partir do solo da decomposição de vegetais, frutos e/ou sementes (MORIN-SARDIN et al., 2016). A espécie *Mucor subtilissimus* pertence ao filo Zygomycota, Subfilo Mucoromycotina (MORIN-SARDIN et al., 2016), Classe Zygomycetes, Ordem Mucorales, é um grupo filogeneticamente antigo de fungos a qual compreende os gêneros filamentosos *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizo-Mucor*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Lichtheimia* e *Blakeslea* (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; YEGIN et al., 2011).

Figura 4 - *Mucor subtilissimus* (A) *M. subtilissimus* crescido em meio Czapek. (B) *M. subtilissimus* crescidos através da FES utilizando farelo de trigo como substrato.

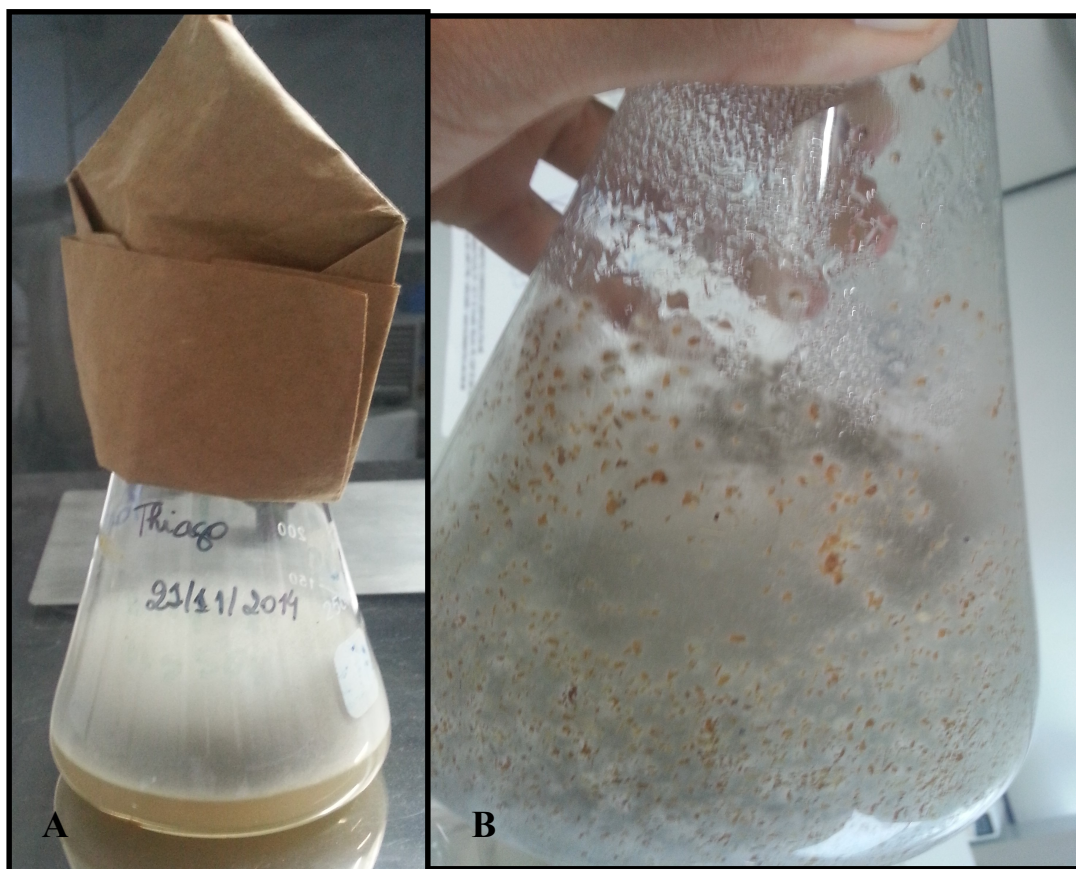


Foto do acervo pessoal

De acordo com Certik & Adamechova (2009) esses fungos se destacam na produção de enzimas na FES, o que torna interessante do ponto de vista biotecnológico, uma vez que:

- a) A superfície de substratos é suficientemente coberta pelo micélio fúngico durante a fermentação;
- b) Observações microscópicas revelaram que as hifas fúngicas penetram nos substratos e são capazes de penetrar o mais difícil deles, em virtude da presença da pressão de turgescência através da ponta do micélio (Ramachandran et al., 2004).
- c) Eles crescem com a atividade da água reduzida impedindo ou evitando que ocorra uma contaminação por bactérias.

Além disso, são os organismos mais adaptados ao crescimento nos substratos sólidos porque seu crescimento filamentoso e apical permite a colonização das partículas sólidas para obter a fonte de carbono e os nutrientes minerais pela degradação enzimática do substrato (GOMES et al., 2017), tendo vantagens na sua produção de enzimas, uma vez que as enzimas são normalmente produzidas extracelularmente, tornando mais fácil a sua recuperação a partir do caldo de fermentação, o que facilita o processo em larga escala (BIDOCHKA & KHACHATOURIANS, 1988; WONGANU et al., 2008). Além do que, as enzimas fúngicas são consideradas mais seguras do que as produzidas por bactérias, por apresentarem menos toxicidade (MITRA et al., 1992; PANDEY, 1992).

O gênero *Mucor* vem sendo bastante utilizado biotecnologicamente na produção de amilases (*Mucor racemosus*), ácidos orgânicos (*Mucor piriformis*), etanol (ESPOSITO & AZEVEDO, 2010; YEGIN et al., 2011), enzimas coagulantes do leite (FRAILE et al. 1981; FERNANDEZ-LAHOIRE et al., 1999).

Há relatos da presença do *Mucor* na produção do Douchi, um alimento tradicional e popular na China que tem base da fermentação de grãos de soja, há registros escritos do processo que remontam desde a Dinastia Xijin (200 d.C) (BAO, 1985; LUO et al., 2008). *Mucor* também contribui para a textura e características sensoriais de queijos (ZHANG e ZHAO, 2010; HERMET et al., 2012), tendo algumas espécies um papel tecnológico fundamental no processamento de produtos lácteos (DESMASURES, 2014). Nascimento et al. (2016) mostram a produção de uma protease

fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, utilizando farelo de trigo como substrato na FES.

2.5 PROCESSO FERMENTATIVO

2.5.1 Fermentação em estado sólido (FES)

As proteases fibrinolíticas são enzimas que podem ser produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) (NASCIMENTO et al., 2016). A FES tem se destacado ao longo das duas últimas décadas, conquistando atenção significativa para o desenvolvimento de bioprocessos industriais devido a diversidade e a crescente produção de bioprodutos gerados (MARIANO et al., 1995; VIJAYARAGHAVAN et al., 2016; GOMES et al., 2017) tais como: antibióticos, ácido cítrico e enzimas (principalmente as proteases).

Há uma ampla vantagem por se escolher a FES como processo fermentativo industrial em virtude da mesma apresentar: quantidades de enzimas produzidas maiores do que quando utilizado a Fermentação submersa (GONZÁLEZ et al., 2003), custos menores devido a eficiente produção do produto requerido, em virtude de não necessitar de tanto controle dos parâmetros durante a fermentação (ROBINSON & NIGAM, 2003), ausência de água livre, o que torna menos gastos hídricos (YEGIN et al., 2011), um volume de trabalho menor (JYH-PING, 1988), baixo consumo de energia por se tratar de um processo estático (SANDHYA et al., 2005), baixo impacto ambiental do processo, e de expressão diferencial de metabólitos (LAREO et al., 2006) e uma melhor recuperação do produto (GÓMEZ et al., 2005). Até mesmo, um micro-organismo pode produzir uma mesma enzima com características bioquímicas diferentes do que aquelas produzidas pelo mesmo organismo sob a FS (GERMANO et al., 2003).

A FES reproduz os processos microbiológicos naturais fornecendo uma ancoragem adequada, simulando as reações de fermentação que ocorrem na natureza (CERTIK & ADAMECHOVA, 2009) como a compostagem. Em aplicações industriais, pode ser utilizada de forma controlada para produzir um produto desejado (COUTO & SAROMÁN, 2006). Ao longo da última década, houve uma melhoria significativa na compreensão de como projetar, operar e ampliar biorreatores para o seu uso (LAREO et al., 2006), já que um dos problemas desse tipo de fermentação é o calor metabólico ocasionado pela falta de aeração sendo, portanto um desafio para o processo em larga escala.

Vários fatores são fundamentais na FES entre eles se destacam o crescimento microbiano, tamanho do substrato e a quantidade de umidade no processo fermentativo (COUTO & SAROMÁN, 2006). Na FES, o substrato sólido fornece não só os nutrientes para a cultura, mas também atua servindo como um ponto de ancoragem ou apoio para as células microbianas (COUTO & SAROMÁN, 2006). Além do que, um dos maiores problemas na produção de qualquer biomolécula, é que as substâncias nutritivas empregadas no meio de cultura elevam o total dos custos de produção, portanto com uma redução de despesas do substrato há um aumento na produtividade do processo (GÓMEZ et al., 2005). O cultivo em estado sólido oferece a possibilidade de utilizar subprodutos, co-produtos e resíduos de alimentos e indústrias agrícolas (GÓMEZ et al., 2005; VIJAYARAGHAVAN et al., 2016), sendo assim a FES oferece benefícios potenciais nas frentes econômicas e ambientais, com sustentabilidade (GOMES et al., 2017).

A redução do custo de produção de enzimas através desse tipo de fermentação no país é favorecida pela possibilidade da bioconversão de subprodutos agrícolas (MUSSATTO et al., 2007). Desde 1996, o Brasil tem investido em tecnologias e na busca de biomoléculas geradas a partir de produtos agrícolas, subprodutos ou co-produtos gerados no país (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003; COUTO & SAROMÁN, 2006).

A vantagem é alta, pois a utilização desses produtos é de baixo custo e há uma fácil disponibilidade, uma vez que o Brasil se destaca como um dos grandes exportadores e produtores de alimentos do mundo (COUTO & SAROMÁN, 2006), tendo uma forte produção de resíduos e subprodutos gerados. A utilização de resíduos agroindustriais em bioprocessos proporciona não somente uma fonte alternativa, mas também ajuda a resolver o problema da poluição ambiental, que em caso contrário, sua acumulação pode causar (PANDEY et al., 2000).

Muitas enzimas, entre elas as proteases já foram produzidas através da utilização de resíduos ou subprodutos agroindustriais como substratos: café (PANDEY et al., 2000), farelo de trigo e arroz (SILVEIRA & FURLONG, 2007), torta de soja desengordurada (GERMANO et al., 2003), casca de castanha, farelo de cevada (Gómez et al., 2005), bolo de óleo de coco (RAMACHANDRAN et al., 2004), torta de Babaçu (CASTRO et al., 2011), bagaço de cana, resíduos de banana, resíduos de uva, palha de trigo, madeira (IANDOLO et al., 2011), sabugo de milho (CHA et al., 2010).

2.5.2 Uso do farelo de trigo como substrato

Frequentemente utilizado como substrato para a FES o farelo de trigo é visado à produção de insumos para a indústria de alimentos, devido à sua abundância (COELHO, et al., 1999). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o trigo é o segundo cereal mais produzido no mundo, com um significativo peso na economia agrícola global. No Brasil, a taxa de aumento do consumo do trigo tem sido de 1,31% ao ano (<http://www.agricultura.gov.br>), segundo dados da associação brasileira de indústria do trigo o consumo do cereal em 2017 foi de 12,100 milhões de toneladas (<http://www.abitrigo.com.br/estatisticas-trigo.php>).

O farelo de trigo é constituído da aleurona, ou seja, a película que separa a casca do endosperma (RHODES & BRODERICK, 1989), ele possui glúten, é rico em fibras e pobre em calorias. A composição nutricional do farelo de trigo esta descrita na Tabela 3. Embora venha sendo muito consumido nos últimos anos, em virtude dos seus benefícios, suas características organolépticas são pouco agradáveis aos seres humanos (SILVEIRA & FURLONG, et al., 2007). O farelo de trigo é mais utilizado para alimentação animal, em média o preço de uma tonelada do farelo no Brasil é de 800,00 reais (<http://www.mfrural.com.br>, consultado no dia 23 de janeiro de 2018).

Tabela 3 - Composição nutricional em 100 g de farelo de trigo.

Quantidade por 100 g de farelo de trigo (Energia: 252 kcal)	
Proteína	15,1 g
Gordura	3,4 g
Carboidratos	39,8 g
Fibras	30,0 g
Ácido Fólico	250,0 mg
Potássio	900,0 mg
Ferro	5,0 mg
Cálcio	69,0 mg

Fonte: Retirado de <http://www.tuasaude.com/farelo-de-trigo/>, acessado e disponível no dia 12 de julho de 2016.

2.6 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO, PURIFICAÇÃO E TRATAMENTO FINAIS DE ENZIMAS

De acordo com Yegin et al (2012), qualquer processo de produção de biomoléculas independente do tipo de fermentação requer uma fase de produção do produto de interesse e uma segunda fase relativa à recuperação e purificação desse produto. Sendo a viabilidade econômica das aplicações biotecnológicas das enzimas

dependente desses processos de produção eficientes e técnicas de recuperação, de forma a preservar a estrutura e a funcionalidade do produto final de interesse (SILVA et al., 2017).

Enzimas produzidas por fungos filamentosos geralmente são produzidas de forma extracelular, o que facilita a etapa no processo de recuperação, pois não necessita de etapas de rompimento celular. Entretanto, uma das grandes dificuldades para aplicação tecnológica de enzimas é o seu grau de pureza (SHANMUGAPRAKASH et al., 2015). Sadana (1995) afirma que cerca de 80%, do custo do processamento de produção de uma enzima seja gasto com a etapa de purificação, com isso é necessário o desenvolvimento de técnicas, que sejam mais econômicas e que aumentem a eficiência no processo de recuperação enzimática. Produtos farmacêuticos e terapêuticos, por exemplo, necessitam de um alto grau de pureza para a sua utilização (BRITES, 2005).

Dentre as diversas técnicas utilizadas para purificação de enzimas, a precipitação é uma das mais antigas adotadas e bem rudimentares, devido à simplicidade da sua técnica, geralmente é utilizada como uma pré - purificação, antes da aplicação de métodos de maiores resoluções (LUCCARINI et al., 2005; BIAZUS et al., 2010). Os reagentes mais utilizados nessa etapa tem sido o uso de solventes ou sais. O sulfato de amônio é o sal mais utilizado para precipitar proteína, porque a sua solubilidade permite a precipitação com elevada força iônica (HEU et al., 1995).

Diversas técnicas e metodologias são utilizadas para eliminar ou reduzir compostos que não são desejados pelas indústrias, estas etapas são geridas por uma série de fatores, como a sua aplicação, a que se destina e a natureza do material de partida (SAWHNEY & SINGH, 2000). Em pequenas escalas (laboratoriais) utiliza se operações de membrana, mais conhecida como diálise, em escala industrial essa etapa é composta de uma fase de ultrafiltração e uma seguinte de diafiltração (YEGIN et al., 2011).

Após etapas de purificação, geralmente muitas enzimas diminuem ou perdem suas atividades funcionais, portanto para as indústrias é necessário que se tenha uma purificação rápida, e que seja eficaz e essencial para o desenvolvimento do produto (ERJAVEC et al., 2012).

De acordo com Schmidell *et al* (2001), o processo de purificação de um produto biotecnológico pode ser dividido em 4 etapas principais:

- a) Etapa – Separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação);
- b) Etapa - Concentração e/ou purificação de baixa resolução, a qual compreende a separação da molécula (ex: enzima) de outros componentes indesejáveis ao produto final (ex: pigmentos, polissacarídeos, lipídeos, entre outros).
- c) Etapa – Purificação de alta resolução, a qual compreende a separação de classe de moléculas com algumas características físico-químicas semelhantes (ex: proteínas).
- d) Etapa – Operações para acondicionamento do produto final.

De forma geral a purificação desejada é dependente do número de etapas empregadas no processo e do uso a que se refere o produto final (SCHMIDELL et al., 2001). Dentre esses processos de purificação, temos os de baixa resolução (precipitação, ultrafiltração, extração por sistema de duas fases aquosas) e os de alta resolução (métodos cromatográficos – troca iônica afinidade, imuno-afinidade, interação hidrofóbica, exclusão molecular, membranas adsortivas) (PESSOA JÚNIOR & KILIKAN, 2005).

2.6.1 Sistema de duas fases aquosas (SDFA)

O sistema de duas fases aquosas (SDFA) é um tipo de extração líquido – líquido que surgiu desde meados de 1950 por Albertsson (MONTEIRO – FILHO, 2010), que tentava purificar cloroplastos através de líquidos imiscíveis e que iniciou os primeiros estudos da aplicação do SDFA para a purificação de produtos biológicos (ALBERTSSON, 1985).

Tanto a academia quanto a indústria têm mostrado nas últimas duas décadas, um grande interesse por esse tipo de purificação (GRILO et al., 2016). Este processo vem sendo utilizado em substituição aos métodos comuns de purificação, como solventes orgânicos, eletroforeses, cromatografias, ultrafiltração, precipitação, entre outros, pois além desses processos serem mais caros, resulta em volumes e rendimentos muito pequenos, com um alto custo dos reagentes e dificuldade de dimensionamento desses processos em larga escala (LI et al., 2012; RODRIGUEZ-DURAN et al., 2013; MEDEIROS E SILVA et al., 2013).

Biomoléculas purificadas por SDFA incluem: ácidos clorogênicos (YANG et al., 2016); íons (JIMENEZ et al., 2016); polissacarídeos (Wang, Y. et al., 2016); enzimas (LIMA et al., 2011; PORFIRI et al., 2011; BACH et al., 2012; SALES et al., 2013; MEDEIROS & SILVA et al., 2013; BERTRAND et al., 2016); vírus, organelas, fragmentos de membrana (COELHO et al., 2013), lectinas (PORTO et al., 2011; SOARES et al., 2011) entre outros.

O SDFA é formado pela adição de dois (ou mais) polímeros solúveis em água ou um polímero e um sal específico, que quando colocado em solução aquosa, acima de certas concentrações críticas e temperaturas, resultam no aparecimento de duas fases aquosas imiscíveis (SALES et al., 2013; PATEL et al., 2018). Quanto aos polímeros utilizados, os mais comuns são: o polietilenoglicol (PEG), dextrana (DX) e o polipropilenoglicol (PPG) (SCHMIDELL et al., 2001).

Entretanto o SDFA, utilizando PEG/sal vem sendo mais utilizado, por a dextrana ser um polímero caro em comparação aos outros polímeros e por o sistema PEG/sal ser uma boa alternativa, com resultados muito satisfatórios a um custo muito baixo (GRILO & AZEVEDO, 2016). Além do sistema PEG/sal possui vantagens como uma rápida separação de fases, e uma maior seletividade na separação da molécula de interesse (SCHMIDELL et al., 2001).

Outras vantagens do uso do SDFA para a purificação de biomoléculas, tem sido: clarificação, maior concentração e purificação parcial integrada em um único passo, curto tempo de processamento, baixo consumo de energia, e um ambiente biocompatível para a biomolécula por causa da grande quantidade de água nos sistemas de extração (PESSOA JÚNIOR & KILIKAN, 2005), possibilidade de ampliação em larga escala à temperatura ambiente (desde que sejam respeitados as proporções dos volumes obtidos em ensaios de menores escalas) (SCHMIDELL et al., 2001) e a possibilidade do reaproveitamento dos polímeros utilizados (GRILO et al., 2016).

A purificação de proteínas pelo SDFA é favorecida, uma vez que essa molécula necessita de um percentual hídrico elevado para garantir a manutenção de suas propriedades biológicas, e o SDFA contém cerca de 75 a 90% em massa de teor de água em sua constituição (SCHMIDELL et al., 2001; SILVA et al., 2017). Como pode ser observar na Tabela 4 há uma escassez de estudos que demonstrem a utilização do SDFA para a purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por micro-organismos.

Tabela 4 - Purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por diferentes micro-organismos por sistema de duas fases aquosas.

Micro-organismo	SDFA utilizado	Referência
<i>Bacillus</i> sp. UFPEDA 485	PEG 8000/Sulfato de sódio	SALES et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. DPUA1576	PEG 1500/Fosfato	MEDEIROS e SILVA et al., 2013.
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.)	PEG 8000/Fosfato	ALI et al., 2014.
<i>Bacillus subtilis</i>	PEG 4000/amido de hidroxipropilo	LU et al., 2004.
<i>Bacillus subtilis</i> DC-2	PEG 4000/Sulfato de sódio	ONESMUS et al., 2008.

Os fatores mais importantes para a partição de enzimas no SDFA são: a massa molar e concentração do polímero, o tipo e a concentração do sal e o pH (SCHMIDELL et al., 2001). Outros fenômenos também têm sido alvos para estudo de partição como: temperatura, força iônica, influencia da luz, e utilização de polímeros termosensíveis (GRILO & AZEVEDO, 2016).

Além disso, utilizar projetos estatísticos como objetivo de extrair as enzimas pelo SDFA é muitas vezes utilizado para investigar a influência de variáveis independentes em seu desempenho, permitindo avaliar suas interações e reduzindo o número de experimentos (PORTO et al., 2008; KIRSCHET al., 2012; SILVA et al., 2017).

Diversos parâmetros influenciam o sistema de duas fases aquosas e a extração do bioproduto de interesse, geralmente esses fatores são divididos em duas categorias: os fatores inerentes ao próprio sistema (concentração e tipo do polímero, concentração e tipo do sal e pH) e os fatores inerentes ao bioproduto de interesse (hidrofobicidade, massa molar, conformação da biomolécula e carga) (OLIVEIRA et al., 2001; PESSOA-JÚNIOR & KILIKAN, 2005). Nesse sentido, a recuperação, coeficiente de partição e a purificação do bioproduto são de vital importância para a sua produção industrial.

A migração de uma molécula é dada pelo coeficiente de partição que é representado pela letra K . Onde, quando o valor de K for >1 , significa que houve uma migração da molécula para a fase superior (geralmente a fase rica em polímero). Quando o valor de K for <1 , há uma migração da molécula para a fase inferior (geralmente a fase rica em sal). Esse particionamento da molécula, para uma das fases e a determinação do K vai depender da sua solubilidade (hidrofóbica ou hidrofílica), da

carga superficial da biomolécula, do pH do SDFA, da força iônica e da massa molar do polímero (geralmente polímeros de massa molar superior a 1500 promovem a partição da proteína para a fase sal, fenômeno conhecido como exclusão molecular) (SCHMIDELL et al., 2001).

2.6.2 Métodos cromatográficos

2.6.2.1 Cromatografia de Troca Iônica

Schmidell et al. (2001) define que os processos cromatográficos são aqueles em que os solutos de um meio líquido (proteínas, peptídeos, anticorpos) são adsorvidos ou retidos em uma fase estacionária (matriz), através da qual a fase móvel (eluente) é bombeada, sendo um método físico-químico utilizado para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. Os mais comumente métodos cromatográficos utilizados para a purificação de enzimas fibrinolíticas tem sido: a cromatografia de troca iônica e a de exclusão molecular.

A cromatografia de troca iônica (CTI) é um processo de separação que se baseia na afinidade entre os componentes de uma amostra e os sítios iônicos de uma matriz sólida (SCHMIDELL et al., 2001). Esse tipo de cromatografia é normalmente utilizado para separar biomoléculas (proteínas, polipeptídeos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, carboidratos e polissacarídeos carregados) (AGUILAR, 2004) especialmente proteínas, pois apresenta elevada capacidade de adsorção das mesmas (SCHMIDELL et al., 2001).

A CTI separa as proteínas com base nas diferenças na carga superficial das moléculas, sendo a separação ditada pelas interações proteicas com a fase estacionária, tendo como um modo clássico a aplicação de um gradiente linear de sal regularmente aplicado para a eluição (MONTERO-LOMELI & RUMJANEK, 2013; FEKETE et al., 2015).

Quanto à fase estacionária, existem dois aspectos principais: (1) a força da interação e a retenção associada (permutador de íons é fraco ou forte) e as (2) larguras de pico possíveis (que significa uma melhor eficiência) (FEKETE et al., 2015). Tanto os permutadores de cátions quanto os de ânions podem ser classificados como trocadores fracos ou fortes, dependendo da força covalentemente ligada à matriz (SCHMIDELL et al., 2001; FEKETE et al., 2015).

O trocador catiônico possui grupos carregados positivamente que foram imobilizados sobre um suporte cromatográfico e, portanto irá se ligar a íons carregados

negativamente (ânions), já o trocador aniônico tem carga negativa e grupos imobilizados que irão se ligar aos íons carregados positivamente (cátions) (AGUILAR, 2004). As matrizes são classificadas em inorgânicas e orgânicas, sendo as orgânicas mais eficientes e podendo ambas ser naturais ou sintéticas (SCHMIDELL et al., 2001). No caso das proteínas, o trocador catiônico é bem adequado, mas um forte permutador aniônico pode ser aplicado para ligar as proteínas se o seu pI estiver abaixo de pH 7. Os trocadores fracos só podem ser úteis em uma segunda instância, se a seletividade dos permutadores de íons fortes não for satisfatória (FEKETE et al., 2015).

Com relação ao pH do tampão de eluição, a faixa mais frequentemente aplicada para separações de proteínas está entre 5,5-7,0 (FEKETE et al., 2015) e os tampões utilizados com maior frequência para separações de proteínas são: o fosfato (útil entre pH 5,5 e 6,8 ($pK_a \pm 6,15$)), citrato (2,6 e 3,7 ($pK_a \pm 3,1$)) e o Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico (para pH entre 6,7 e 7,6 ($pK_a \pm 7,2$)) (FEKETE et al., 2015). Após a escolha do tampão da fase móvel e do seu pH, outro fator que deve ser otimizado é o gradiente de sal. Os mais comumente utilizados para caracterização de proteínas são o cloreto de sódio e/ou potássio, usando um gradiente de sal de 0 para 0,2-0,5 M (FEKETE et al., 2015). É importante notar que a inclinação do gradiente tem um forte impacto na retenção e seletividade e deve, portanto, ser sistematicamente otimizado.

Entre as vantagens da CTI destacam-se: alta resolução, processos de separação e recuperação rápidos, e que os componentes do eluente (tampão) são não desnaturantes, sendo compatíveis ao sistema de separação, conseguindo recuperar proteínas mesmo em baixas concentrações (AGUILAR, 2004).

Para um processo em larga escala, assim como no SDFA, é necessário que se aumentem as variáveis utilizadas no processo, proporcionalmente ao experimento obtido inicialmente em colunas menores (SCHMIDELL et al., 2001). Entretanto, na CTI o comprimento da coluna permanece constante, diferentemente do seu diâmetro que aumenta proporcionalmente a escala desejada (WHEELWRIGTH, 1991; SCHMIDELL et al., 2001).

2.6.2.2 Cromatografia de gel filtração

A cromatografia de gel filtração (CGF) ou também chamada de cromatografia de exclusão molecular, promove como o próprio nome diz, a exclusão por tamanho, baseado na diferenciação das proteínas pelo raio hidrodinâmico das mesmas envolvidas (MONTERO-LOMELI & RUMJANEK, 2013). A fase estacionária consiste em

partículas esféricas porosas com um tamanho de poro cuidadosamente controlado, através do qual as biomoléculas são difundidas com base na sua diferença de tamanho molecular usando um tampão aquoso como fase móvel (FEKETE et al., 2014), sendo a partição conduzida por processos entrópicos sem qualquer adsorção.

As colunas podem variar em tamanho, desde muito pequenas (por exemplo, colunas de centrifugação de <1 ml de volume de leito para separações analíticas) a muito grande (para aplicações em escala). O gel ou a matriz é constituído por partículas porosas esféricas de tamanho de poro controlado cuidadosamente. Existem principalmente dois tipos de materiais de embalagem da CGF: (1) sílica, com ou sem modificação de superfície, e (2) embalagens poliméricas reticuladas que podem ser não-polares (hidrofóbicas), hidrofílico ou iônico, sendo a sílica a mais comumente utilizada nos processos de purificação (FEKETE et al., 2014).

As proteínas ou moléculas cujo volume efetivo excede o volume do poro são expulsas da coluna, no chamado volume espacial (V_e) (SCHMIDELL et al., 2001). Já as proteínas menores que o volume dos poros, penetra no mesmo e são arrastadas por um eluente, que geralmente é um tampão adequado à manutenção da estabilidade da proteína alvo (SCHMIDELL et al., 2001; AGUILAR M.I., 2004). Em virtude desses procedimentos, pode ser observado que as proteínas maiores são as primeiras a serem recuperadas, seguidas das intermediárias prosseguindo até as proteínas menores (SCHMIDELL et al., 2001; FEKETE et al., 2014).

Algumas variáveis são estudadas, para garantir e melhorar o desenvolvimento do processo agregando e tornando o método mais robusto e confiável, são eles: eluentes e pH compatíveis com a proteína ou produto de interesse, é necessário um pH e uma concentração de sal apropriados para assegurar a forma do pico e sua resolução. Geralmente, o pH deve estar próximo do ponto isoeletrico da proteína, e esta deve ser solúvel e estável, a seleção do gel/matriz também é importante assim como um tamanho de poro apropriado (SCHMIDELL et al., 2001; FEKETE et al., 2014).

Para caracterização de proteínas, tamanhos de poro típicos entre 150 e 500 Å são aplicados. Em proteínas terapêuticas comuns (Massa molecular em torno de 15-80 kDa), um tamanho de poro de 150-200 Å é bem adequado, enquanto um tamanho de poro de 200-300 Å é geralmente aplicado para anticorpos monoclonais (Massa molecular em torno de 150 kDa). Proteínas muito grandes com massa molecular > 200 kDa, as fases 500-1000 Å oferecem a melhor seletividade (FEKETE et al., 2014). Para o tampão, uma solução com uma força iônica de 50-200 mM é ideal ajudando a reduzir

as interações não específicas entre a proteína e a fase estacionária. O tampão mais utilizado é o fosfato em concentração 10-200 mM e pH entre 6 e 7,2 (FEKETE et al., 2014), lembrando que tampões com alta concentração de sal e modificadores orgânicos podem ser perigosos para a bomba e o sistema de purificação podendo bloquear a tubulação, por isso é sugerido eliminar sempre os sais do sistema regularmente com água ou com um dispositivo aquoso elevado (por exemplo, 5% de acetonitrila ou metanol) (FEKETE et al., 2014).

A grande vantagem da CGF é a instrumentação necessária para este tipo de processo, uma vez que é relativamente fácil e barata, além de serem eficientes para amostras de dessalinização por meio de tampão e para aplicação na análise de peptídeos (AGUILAR, 2004). A Tabela 5 mostra alguns métodos cromatográficos utilizados para a purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos.

Tabela 5 - Enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos e purificadas por métodos cromatográficos.

Fungo produtor da enzima fibrinolítica	Cromatografia utilizada	Tipo de resina	Fator de purificação obtido	Recuperação (%)	Peso molecular (kDa)	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i> <i>KSK-3</i>	Ionica	DEAE-Toyopearl 650C	5,1	4,9	30,0	SHIRASAKA et al., 2012
<i>Rhizomucor miehei</i>	Gel filtração	Sephadex G 200	13,9	12,6	-	USAMA et al., 2008
<i>Ganoderma Lucidum</i>	Iônica	DEAE-cellulose	7,9	59,5	33,2	KUMARAN et al., 2011.
<i>Fusarium sp</i>	Iônica	CM- Toyopearl 650M (Tosoh)	39,9	8,4	-	UEDA et al., 2007.
<i>Schizophyllum commune</i> BL23	Iônica	DEAE-Sephacel	86,0	36,4	-	PANDEE et al., 2008
<i>Neurospora sitophila</i>	Gel filtração	Superdex 75	75,2	1,1	34,0	LIU et al., 2016

2.7 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E DICROÍSMO CIRCULAR

A caracterização enzimática é feita com o uso de processos que envolvem agentes químicos (uréia, detergentes, ácidos, bases, etc) ou agentes físicos (temperatura, pressão, radiação, etc). Através da ação desses agentes o estado nativo da enzima é afetado, podendo levar até mesmo a desnaturação da mesma (MONTERO-LOMELI & RUMJANEK, 2013).

Para exercer ou melhorar o seu papel catalítico, muitas enzimas se associam a outras moléculas ou íons, fazendo com que sua atividade enzimática ative, ou seja, inibida (BORZANI et al., 2001). A esses componentes é dado o nome de co-fatores, podendo ser íons metálicos como, por exemplo: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , entre outros (BORZANI et al., 2001)

Entre os agentes físicos estudados, o dicroísmo circular vem se destacando, pois é um importante método que ajuda na determinação do grau de estrutura secundária das proteínas, se baseando em princípios físicos (MONTERO-LOMELI & RUMJANEK, 2013) dados pela diferença de absorção, entre a luz circularmente polarizada à direita e a luz circularmente polarizada à esquerda, em moléculas opticamente ativas como os carboidratos, proteínas (GUEDES, 2011), ácidos nucleicos, peptídeos, fármacos, etc. Para estudos com proteína é necessário que a mesma tenha em torno de 95% de pureza (MARTINEZ, 2013), por isso sua importância, nos estudos de mudanças estruturais da proteína secundária (TARHAN et al., 2016) uma que o dicroísmo circular é capaz de elucidar sua estrutura em solução e em condições experimentais variáveis (YAO et al., 2018).

A técnica do Dicroísmo Circular (DC) está baseada na alteração da luz incidente, que é quando a proteína interage com a luz circularmente polarizada provocando uma alteração na luz incidente (GUEDES, 2011). O DC está na região do espectro eletromagnético referente ao extremo ultravioleta, cujo comprimento de onda se estende de 190 a 250nm (GUEDES, 2011).

Embora haja um desafio do DC, para a estimativa de proteínas, devido as suas dimensões e flexibilidades (MARTINEZ, 2013). É um método ainda bastante sensível, que varia em função do tipo de estrutura secundária apresentada pela proteína e permitem a distinção entre conformações de α -hélice (97%), folhas- β (75%), (MANAVALAN & JOHNSON, 1987), 50% para torções/voltas, e 89% para outras estruturas secundárias (MARTINEZ, 2013). Sendo a proteína dominada por α -hélice

com uma banda positiva a 193 nm normalmente e banda negativa a 222 e 208 nm, enquanto a proteína dominada por folhas β tem bandas negativas a 218 nm e bandas positivas a 195 nm (YAO et al., 2018).

Dentre as diversas aplicações do DC, as mais estudadas são: conformação de proteínas e ácidos nucleicos, estabilidade e termodinâmica de enovelamento, desnaturação/desenovelamento, renaturação e estudos da interação entre moléculas assimétricas. É interessante estudar o espectro de proteínas dependente da temperatura uma vez que, pequenas alterações no sinal de proteína dobrada em relação à temperatura refletem em uma verdadeira mudança na conformação e não são simplesmente devido a alterações nas propriedades ópticas de uma hélice ou de uma cadeia (MARTINEZ, 2013).

Dados de DC podem ser apresentados em diferença de absorbância, elipticidade dicróica e elipticidade molar (MANZINI, 2011; MARTINEZ, 2013) e os tipos de gráficos podem ser obtidos devido às diferentes estruturas em moléculas quirais (MANZINI, 2011).

3 ARTIGOS PUBLICADOS

3.1 CAPÍTULO I – PURIFICATION OF A FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP 1262 BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS (PEG/SULFATE)

Publicado na revista “Journal of Chromatography B”

Recebido 24 de fevereiro de 2016

Recebido em forma revisada 13 de abril de 2016

Aceitado 29 de abril de 2016

Disponível online 3 de maio de 2016

Fator de Impacto: 2016: 2.603

Fator de impacto de 5 anos: 2.711

Resumo

Uma protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi recuperada e parcialmente purificada por sistema de duas fases aquosas (SDFA) (polietilenoglicol/sulfato de sódio). A influência simultânea da massa molar do PEG, concentração de PEG e concentração de sulfato na recuperação enzimática foram investigadas pela primeira vez usando um planejamento fatorial completo 2^3 e uma metodologia de superfície de resposta para identificar as condições ideais para extração de enzimas fibrinolíticas por SDFA. Uma vez selecionada a melhor massa molar de PEG para o processo (6000 g/mol) foi aplicado um central composto para melhor avaliar os efeitos de outras duas variáveis independentes. A enzima fibrinolítica mostrou preferencialmente partição para a fase inferior com um coeficiente de partição (K) variando de 0,2 a 0,7. Os melhores resultados em termos de purificação enzimática foram obtidos com o sistema formado por 30,0% (m/m) de PEG 6000 g/mol e 13,2% (m/m) de sulfato de sódio, que assegurou um fator de purificação de 10,0, K de 0,2 e rendimento de atividade de 102,0%. A SDS-PAGE e o zimograma de fibrina mostraram que a protease purificada possui uma massa molecular de 97 kDa e um ponto isoelétrico aparente de 5.4. Quando submetido a ensaios com diferentes substratos e inibidores, a enzima mostrou seletividade para succinil-l-alá-alá-pro-l-fenilalanina-p-nitroanilida e foi quase completamente inibida pelo fluoreto de fenilmetilsulfonilo, comportando-se como uma protease do tipo quimotripsina. Na temperatura ótima que foi de 37°C, a

atividade residual da enzima foi de 94 e 68% após 120 e 150 minutos de incubação respectivamente. Este estudo demonstrou que a protease fibrinolítica produzida pelo *M. subtilissimus* possui uma potente atividade fibrinolítica em comparação com enzimas similares produzidas por fermentação em estado sólido, portanto, pode ser usado como agente para a prevenção e terapia da trombose, além disso, parece ter as vantagens de produção de baixo custo e simples etapa de purificação.

Journal of Chromatography B, 1025 (2016) 16–24



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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



Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate)



Thiago Pajeú Nascimento^a, Amanda Emmanuelle Sales^b, Camila Souza Porto^c, Romero Marcos Pedrosa Brandão^b, Galba Maria de Campos-Takaki^d, José Antônio Couto Teixeira^e, Tatiana Souza Porto^{b,f}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^b, Attilio Converti^{g,*}

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Lins do Rego, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Unit of Penedo, Federal University of Alagoas-UFAL, Av. Duque de Caxias, 1074, 57200-000 Penedo, Alagoas, Brazil

^d Center for Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco-UNICAP, Rua do Príncipe, 526, 50050-900 Recife, Pernambuco, Brazil

^e Center of Biological Engineering, University of Minho, Campus of Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal

^f Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco-UFRPE, Avenida Bom Pastor, s/n, 55296-901 Garanhuns, Pernambuco, Brazil

^g Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, University of Genoa-UNIGE, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2016

Received in revised form 13 April 2016

Accepted 29 April 2016

Available online 3 May 2016

Keywords:

Mucor subtilissimus

Fibrinolytic protease

ATPS

ABSTRACT

A fibrinolytic protease from *M. subtilissimus* UCP 1262 was recovered and partially purified by polyethylene glycol (PEG)/sodium sulfate aqueous two-phase systems (ATPS). The simultaneous influence of PEG molar mass, PEG concentration and sulfate concentration on the enzyme recovery was first investigated using a 2³ full factorial design, and the Response Surface Methodology used to identify the optimum conditions for enzyme extraction by ATPS. Once the best PEG molar mass for the process had been selected (6000 g/mol), a two-factor central composite rotary design was applied to better evaluate the effects of the other two independent variables. The fibrinolytic enzyme was shown to preferentially partition to the bottom phase with a partition coefficient (K) ranging from 0.2 to 0.7. The best results in terms of enzyme purification were obtained with the system formed by 30.0% (w/w) PEG 6000 g/mol and 13.2% (w/w) sodium sulfate, which ensured a purification factor of 10.0, K of 0.2 and activity yield of 102.0%. SDS-PAGE and fibrin zymography showed that the purified protease has a molecular mass of 97 kDa and an apparent isoelectric point of 5.4. When submitted to assays with different substrates and inhibitors, it showed selectivity for succinyl-L-alanyl-L-proline-L-phenylalanine-p-nitroanilide and was almost completely inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride, behaving as a chymotrypsin-like protease. At the optimum temperature of 37 °C, the enzyme residual activity was 94 and 68% of the initial one after 120 and 150 min of incubation, respectively. This study demonstrated that *M. subtilissimus* protease has potent fibrinolytic activity compared with similar enzymes produced by solid-state fermentation, therefore it may be used as an agent for the prevention and therapy of thrombosis. Furthermore, it appears to have the advantages of low cost production and simple purification.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mucor subtilissimus is a dimorphic fungus of the phylum of Zygomycota that can switch between yeast and filamentous growth structures depending on the environmental stimulus received [1].

This fungus belongs to the order of Mucorales also comprising the genera *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella* and *Absidia*, which are known to have a potential for the production of milk-clotting enzymes, lipases, amylases and extracellular proteases [2].

Proteases are a large and complex group of enzymes that play an important nutritional and regulatory role in nature [3]. These enzymes are considered the most important group of industrial enzymes with a great variety of industrial and biotechnological applications accounting for about 60% of the total enzyme

* Corresponding author.

E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

Artigo completo totalmente disponível no site da revista, devido à proteção de direitos autorais.

3.2 CAPÍTULO II – PURIFICATION, BIOCHEMICAL, AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF A NOVEL FIBRINOLYTIC ENZYME FROM *MUCOR SUBTILISSIMUS* UCP 1262

Publicado na revista “Bioprocess and Biosystems Engineering”

Recebido 22 de fevereiro de 2017

Aceitado 8 de maio de 2017

Disponível online 12 de maio de 2017

Fator de Impacto: 2017: 1.870

Resumo

As proteases fibrinolíticas são enzimas que degradam a fibrina. Elas fornecem uma alternativa promissora para medicamentos para terapia trombolítica. Uma protease isolada do fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi purificada em três passos: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular, além disso, a enzima foi caracterizada bioquimicamente e estruturalmente. A protease fibrinolítica purificada apresentou uma massa molecular de 20 kDa, um ponto isoelétrico aparente de 4,94 e uma estrutura secundária composta principalmente de α hélice. A enzima apresentou seletividade para N-succinilAla-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida como substrato cromogênico sugerindo que é uma serino protease do tipo quimotripsina, cuja atividade foi aumentada pela adição de Cu^{2+} , Mg^{2+} , e Fe^{2+} . A enzima mostrou uma atividade fibrinolítica de 22,53 U/mL a 40 °C e o seu contato com polietilenoglicol não conduziu alterações significativas na sua estrutura secundária. Esta proteína representa um importante exemplo de uma nova enzima fibrinolítica com potencial uso no tratamento de distúrbios tromboembólicos, tais como acidentes vasculares cerebrais, embolia pulmonar e trombose venosa profunda.



RESEARCH PAPER

Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262

Thiago Pajeú Nascimento¹ · Amanda Emmanuelle Sales² · Tatiana Souza Porto^{2,4} · Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa² · Leonid Breydo³ · Vladimir N. Uversky^{3,5,6} · Ana Lúcia Figueiredo Porto² · Attilio Converti⁷

Received: 22 February 2017 / Accepted: 8 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract Fibrinolytic proteases are enzymes that degrade fibrin. They provide a promising alternative to existing drugs for thrombolytic therapy. A protease isolated from the filamentous fungus *Mucor subtilissimus* UCP 1262 was purified in three steps by ammonium sulfate fractionation, ion exchange, and molecular exclusion chromatographies, and characterized biochemically and structurally. The purified protease exhibited a molecular mass of 20 kDa, an apparent isoelectric point of 4.94 and a secondary structure

composed mainly of α -helices. Selectivity for *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide as substrate suggests that this enzyme is a chymotrypsin-like serine protease, whose activity was enhanced by the addition of Cu^{2+} , Mg^{2+} , and Fe^{2+} . The enzyme showed a fibrinolytic activity of 22.53 U/mL at 40 °C and its contact with polyethylene glycol did not lead to any significant alteration of its secondary structure. This protein represents an important example of a novel fibrinolytic enzyme with potential use in the treatment of thromboembolic disorders such as strokes, pulmonary emboli, and deep vein thrombosis.

Keywords Fibrinolytic enzyme · *Mucor subtilissimus* · Enzyme activity · Circular dichroism · Polyethylene glycol

✉ Attilio Converti
converti@unige.it

¹ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Lins do Rego, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil

³ Department of Molecular Medicine and Byrd Alzheimer's Institute, Morsani College of Medicine, University of South Florida, 12901 Bruce B Downs Blvd., Tampa, FL 33612, USA

⁴ Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, Garanhuns, PE 55296-901, Brazil

⁵ Laboratory of New Methods in Biology, Institute for Biological Instrumentation, Russian Academy of Sciences, Institutskaya str., 7, Pushchino, Moscow Region 142290, Russia

⁶ Laboratory of Structural Dynamics, Stability and Folding of Proteins, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 4 Tikhoretsky Ave., Saint Petersburg 194064, Russia

⁷ Department of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Pole of Chemical Engineering, University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy

Introduction

Cardiovascular diseases are the major cause of death worldwide [1]. Thrombosis plays an important role in pathogenesis of several cardiovascular disorders due to accumulation of clots blocking the passage of blood flow [2, 3]. These clots are formed through the conversion of fibrinogen to fibrin due to the proteolytic action of thrombin (EC 3.4.21.5). Current therapies against clot formation include anti-platelet drugs, anticoagulants, and thrombolytic agents [2, 3]. However, many of these drugs suffer from high cost, short duration of action when applied intravenously, lack of specificity, toxicity, risk of allergic reactions, and various other side effects [4–6].

Therefore, there is an active search for new sources of fibrinolytic enzymes including those of microbial origin [3]. Examples of bacteria synthesizing such enzymes include the mutant *Pseudomonas aeruginosa* CMSS strain isolated from bovine milk [4], the cyanobacterium

Published online: 12 May 2017

Springer

Artigo completo totalmente disponível no site da revista, devido à proteção de direitos autorais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível a extração e purificação de 2 proteases com atividade fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 através de sistema de duas fases aquosas (PEG 6000/Sulfato de sódio) e métodos cromatográficos. As enzimas possuem uma alta especificidade para degradação de fibrina e suas características bioquímicas e estruturais foram descritas e relevantes para possíveis aplicações terapêuticas *in vivo* e *in vitro*, sendo obtidos processos que propõem reduzir etapas e proporcionar uma maior rapidez no processo de purificação de enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos filamentosos.

REFERÊNCIAS

- ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase and protease by *Ulocladium botrytis* Preuss ATCC 18042 using water hyacinth as a substrate under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**. v. 62, n. 4, p. 1547–1556, 2012.
- AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p., 2007.
- AGREBI, R., HADDAR, A., HAJJI, M., FRIKHA, F., MANNI, L., JELLOULI, K., NASRI, M. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Characterization and statistical media optimization. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 55, p. 1049-1061, 2009.
- AGREBI, R., HADDAR, A., HMIDET, N., JELLOULI, K., MANNI, L., NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1252–1259. 2009.
- AGREBI, R., HADDAR, A., HMIDET, N., JELLOULI, K., MANNI, L., NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: Purification, biochemical and molecular characterization. **Process Biochemistry**. v. 44, p. 1252–1259. 2009.
- AGUILAR, M.I. **HPLC of peptides and proteins**. Methods and protocols, methods in molecular biology, v. 251. Humana press, Totowa New Jersey. 411f. 2004.
- ALI, S.M., LING, T.C., MUNIANDY S., TAN, Y. S., RAMAN J., SABARATNAM V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**. v. 122, p. 359–366. 2014.
- ANISHA, G.S., PREMA, P. Cell immobilization technique for the enhanced production of α -galactosidase by *Streptomyces griseolalbus*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3325-30, 2008.
- ARAI, K., MIMURO, J., MODOIWA, S., MATSUDA, M., SAKO, T., SAKATA, Y. Effect of staphylokinase concentration on plasminogen activation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1245, p. 69–75. 1995.
- BACH, E., SANTANNA, V., DAROIT, D.J., CORRÊA, A.P.F., SEGALINC, J., BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 2455–2462, 2012.
- BAJAJ, B.K., SHARMA, N., SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton cake as nitrogen source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 2, n. 3, p. 204-209. 2013.
- BANERJEE, S., PRASANNA, R., BAGCHIS, N. Purification and characterization of a fibrino(geno)lytic protease from cultured natural isolate of a cyanobacterium, *Anabaena fertilissima*. **Journal of Applied Phycology**. v. 25, p. 1111–1122. 2013.

BAO, Q.A. The headsteam and technology of douchi. **China Brewing**. v. 2, p. 9–14. 1985.

BARBOSA, R.G., BORGHESAN, A.C., CERQUEIRA, N.F., HUSSNI, C.A., ALVES, A.L.G., NICOLETTI J.L.M., FONSECA, B.P.A. Fisiopatologia da trombose e tromboflebite da veia jugular de eqüinos: revisão. **Veterinária. e Zootecnia**. v.16, n.1, mar., p.26-37, 2009.

BAYARS, T. D.; DAVIS D., DIVERS, T.J. Coagulation in the equine intensive-care patient. **Clinical Techniques in Equine Practice Journal**. v.2, p.178-187, 2003.

BAYARS, T.D., DAVIS, D., DIVERS, T.J. Coagulation in the equine intensive-care patient.

BERTRAND, B., MAYOLO-DELOISA, K., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M., TINOCO-VALENCIA, R., SERRANO-CARREÓN, L., MARTÍNEZ-MORALES, F.TREJO-HERNÁNDEZ, M.R., RITO-PALOMARES, M. *Pleurotus ostreatus* laccase recovery from residual compost using aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 91, n. 8, p. 2235-2242. 2016.

BHUNIA, B., BASAK, B., DEY, A. A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus* spp. **Journal of Biochemical Technology**. v. 3, p. 448–457, 2012.

BI, B., WANG, X., WU, H., WEI, Q. Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. **Food Chemistry**. v. 126, p.46–53, 2011.

BIAZUS, J.P.M., SANTANA, J.C.C., SOUZA, R.R., TAMBOURGI, E.B. Purificação de amilases de malte de *Zea mays*. **Ciência de Tecnologia Alimentar**. Campinas, v. 30, n. 1, p. 218-223, jan.-mar. 2010.

BIDOCHKA, M.J, KHACHATOURIANS, G.G. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**. (Orlando, FL); v. 12, p. 161–168. 1988.

BLANN, A.D., LANDRAY, M.J. LIP, G.Y. An overview of antithrombotic therapy. **British Medical Journal**. v. 325, p. 762–765. 2002.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A. Aquarone E. **Biotechnologia Industrial- Fundamentos** , v. 1. 1 edição, Editora Edgard Blucher LTDA. 2001.

BRITES, Luciana Machado. **Separação e Purificação do Ácido Clavulânico através de Extração Líquido - Líquido seguida de Adsorção em Coluna de Leito Fixo**. São Carlos. Universidade Federal de São Carlos. 2005. 86f. Dissertação. Pós-Graduação em Engenharia Química (Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos), São Carlos, São Paulo. Brasil. 2005.

CASTRO, A.M., TEIXEIRA, M.M.P., CARVALHO, D.F., FREIRE, D.M.G., CASTILHO, L.D.R. Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. **Enzyme research**, p.1-9, 2011.

CASTRO, H.C., ABREU, P. A., GERALDO, R. B., MARTINS, R.C.A., MARTINS, R.C.A., MARTINS, R.C.A., SANTOS, R., LOUREIRO, N.I.V., CABRAL, L.M., RODRIGUES, C. R. Looking at the proteases from a simple perspective. **Journal of molecular recognition: JMR**, v. 24, n. 2, p. 165–81, 2011.

CERTIK, M., ADAMECHOVA, Z. Cereal-based bioproducts containing polyunsaturated fatty acids. **Lipid Technology**. v. 21, n. 11/12. 2009.

CHA, W.S., PARK, S.S., KIM, S.J., CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 6475–6481. 2010.

CHANG, C.T., WANG, P.M., HUNG, Y.F., Chung, Y.C. Purification and biochemical properties of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis*-fermented red bean. **Food Chemistry**. v. 133, p. 1611–1617. 2012.

CHAVEZ-SANTOSCOY, A., BENAVIDES, J., VERMAAS, W., RITO-PALOMARES, M. Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products. **Chemical Engineering and Technology**. v. 33, n. 1, p. 177–182, 2010.

CHITTE, R.R. DEY, S. Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD 5. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, p. 405-410. 2000.

CHOI, D., CHA, W., PARK, N., KIMB, H., LEE, J.H., PARK, J.S., PARK, S.S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresouce Technology**. v. 102, p. 3279-3285, 2011.

CHUNG, T.W., WANG, S.S., SAI, W.J.T. Accelerating thrombolysis with chitosan-coated plasminogen activators encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles. **Biomaterials**. v. 29, p. 228–237. 2008.

COELHO, C.S.P.; ALMEIDA, T.L.; FURLONG, E.B. Migração de Micotoxinas durante o Processo de Parboilização do Arroz. **Brazilian Food Technology**. v. 1, n. 2, p. 43-50, 1999.

COELHO, D. F.; SILVEIRA, E.; PESSOA JUNIOR, A; TAMBOURGI, E. B. Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/Ammonium sulfate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 36, n. 2, p. 185–92, 2013.

COUTO, S.R., SANROMÁN, M.R. Application of solid-state fermentation to food industry — A review. **Journal of Food Engineering**. v. 76, p.291-302. 2006.

DEEPAK, V, ILANGO VAN, S, SAMPATHKUMAR, M.V., VICTORIA, M.J., PASHA, S.P.B.S., PANDIAN, S.B.R.K., GURUNATHAN, S. Medium optimization and immobilization of purified fibrinolytic URAK from *Bacillus cereus* NK1 on PHB nanoparticles. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 47, p. 297–304, 2010.

DESMASURES, N. CHEESE. Mold-ripened Varieties. **Encyclopedia of Food Microbiology**. Second ed., p. 409-415. 2014.

DEVI, C.S., MOHANASRINIVASAN, V., SHARMA, P., DAS, D., VAISHNAVI, B.S., NAINE, J. Production, Purification and Stability Studies on Nattokinase: A Therapeutic Protein Extracted from Mutant *Pseudomonas aeruginosa* CMSS Isolated from Bovine Milk. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. v. 22, p. 263–269. 2016.

DRAG, M., SALVESEN, G.S. Emerging principles in protease-based drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 9, n. 9, p. 690–701, 2010.

ELBERT, D. L. Liquid–liquid two-phase systems for the production of porous hydrogels and hydrogel microspheres for biomedical applications: A tutorial review. **Acta Biomaterialia**. v. 7, n. 31–56, 2011.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIČ, J. Proteins of higher fungi--from forest to application. **Trends in biotechnology**. v. 30, n. 5, p. 259–73, 2012.

ESPOSITO, E., AZEVEDO, J. L. **FUNGOS: Uma introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia**. 2.ed. revisada e ampliada. Caxias do Sul. Editora da Universidade de Caxias do Sul, 638f. (Coleção Biotecnologia). 2010.

FEKETE, S., BECK, A., VEUTHEY, J. L., GUILLARME, DAVY. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 43–55, 2015.

FEKETE, S., BECK, A., VEUTHEY, J. L., GUILLARME, DAVY. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 101, p. 161–173, 2014.

FERNANDEZ-LAHORE H.M., AUDAY, R.M., FRAILE, E.R., BISCOGLIO J.B.M, PIRPIGNAN, L, MACHALINSKI, C., CASCONI, O. Purification and characterization of an aspartic proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**. v. 53, p. 599–605.1999.

FRAILE, E.R., BERNARDINELLI, S.E., HANDEL, M., JAUREGUI, A.M. Selección de cepas de *Mucor* sp productoras de enzimas coagulantes de leche. **Revista Argentina de Microbiología**. v. 10, p. 65–69.1978.

FRANCO, R.F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Revista da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, v.34, p.229-237, 2001.

GERMANO, S., PANDEY, A., OSAKU, C.A., ROCHA, S.N., SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 32, p. 246–251. 2003.

GOMES, E., SILVA, R., PEREIRA, J. C., LADINO-ORJUELA, G. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering** Current Advances in Solid-State Fermentation, p. 31–56, 2018.

GÓMEZ, J., PAZOS, M., COUTO, S.R., SANROMÁN, M.A. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. **Journal of Food Engineering**. v. 68, p. 315–319. 2005.

- GONZÁLEZ, G.V., TORRES, E.F., AGUILAR, C.N., GOMEZ, S.J.R, GODÍNEZ, G.D., AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 157–167. 2003.
- GOODMAN E GILMAN. Coagulação sangüínea e anticoagulantes, trombolíticos e fármacos antiplaquetários. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª ed., Rio de Janeiro: Editora Americana, p. 1321- 1341. 2006.
- GRILO, A.L., AIRES-BARROSA, M.R., AZEVEDO, A.M. Partitioning in aqueous twophase systems: fundamentals, applications and trends, **Separation and Purification Reviews**. v. 45 , p. 68-80. 2016.
- GUEDES, Alberto Monteiro. **Espectrometria Raman, UV, DOS e Circular Dicroísmo de Alcalóides do Cigarro**. Belém. Universidade Federal do Pará. 2011.87f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Física. Belém. 2011.
- HANYAO, E. W., XU, X., KOSGEI, A., SPIEGELEER, B. Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.147, n. 5, p. 50-64, 2018.
- HARISH, B.S., UPPULURI, K. B. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1373-1387, Part B, February 2018.
- HERMET, A., MOUNIER, J., KERAVEC, M., VASSEUR, V., BARBIER, G., JANY, J.L. Application of capillary electrophoresis single-stranded conformation polymorphism (CE-SSCP) analysis for identification of fungal communities in cheese. **Food Microbiology**. v. 41, p. 82-90. 2014.
- HEU, M. S., KIM, H. R., & PYEUN, J. H. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy (*Engraulis japonica*). **Comparative Biochemistry and Physiology B – Biochemistry and Molecular Biology**. v. 112, p. 557–568. 1995.
- HSU, JYH-PING. Biodigestion of Solid Substrate: Effect of Random Initial Condition. **Journal of Theoretical. Biology**. v. 132, p. 381-386. 1988.
- <http://www.abitrigo.com.br/estatisticas-trigo.php> (disponível e acessado em 03 de janeiro de 2017).
- <http://www.companiesandmarkets.com> (disponível e acessado em 02 de janeiro de 2018).
- <http://www.mdic.gov.br/>. **O Brasil exportou US\$ 3,661 bilhões na terceira semana de janeiro**. : Criado: Quarta 18 de Maio de 2016, 17h09; Publicado: Segunda, 19 de Janeiro de 2015, 17h10; Última atualização em Quarta, 18 de Maio de 2016, acessado em 30 de julho de 2016 as 08:32.
- <http://www.mfrural.com.br>, acessado e disponível no dia 12 de julho de 2016.
- <http://www.tuasaude.com/farelo-de-trigo/>, acessado e disponível no dia 12 de julho de 2016.
- HUANG, S. PAN, S., CHEN, G., HUANG, S., ZHANG, Z., LI, Y., LIANG, Z. 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.

LANDOLO, D., PISCITELLI, A., SANNIA, G., FARACO, V. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 40–51, 2011.

JARA, F., PILOSO, A.M.R. Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. **Food Hydrocolloids**. v. 25, p. 374–380, 2011.

JIANG, N.Q. ZHAO, F.S. L-Asparaginase release from *Escherichia coli* cells with aqueous two-phase systems. **Industrial Microbiology**. v. 29, n. 2, p. 5–9. 1999.

JIMENEZ, Y.P., GALLEGUILLOS, H.R., CLAROS, M. Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by NaNO_3^+ Poly(ethylene glycol) + H_2O . **Fluid Phase Equilibria**. v. 421, p. 93–103. 2016.

JIN, M., CHEN, W., HUANG, W., RONG, L., GAO, Z. Preparation of pegylated lumbrokinase and an evaluation of its thrombolytic activity both in vitro and in vivo. **Acta Pharmaceutical Sinica B**. v.3, p. 123–129. 2013.

JOSHI, R., JAN, S., WU, Y., MACMAHON, S. Global inequalities in access to cardiovascular health care. **Journal of American College Cardiology**. v. 52, p.1817–25. 2008.

KETNAWA, S., RAWDKUEN, S., CHAIWUT, P. Two phase partitioning and collagen hydrolysis of bromelain from pineapple peel *Nang Lae* cultivar. **Biochemical Engineering Journal**. v. 52, p. 205–211. 2010.

KHANAHMADI, M., MITCHELL, D.A., BEHESHTI, M., ROOSTAAZAZ, R. Continuous solid-state fermentation as affected by substrate flow pattern. **Chemical Engineering Science**. v. 61, p. 2676 – 2687. 2006.

KIM H. C., CHOI B. S., SAPKOTA K., KIM S., LEE H. J., YOO J. C., KIM S.J. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Paecilomyces tenuipes*. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1545–1553. 2011.

KIM J.S., SAPKOTA K., PARK S.E., CHOI B.S., KIM S., HIEP N.T., KIM C.S., CHOI H.S, KIM M.K., CHUN H.S., PARK Y., KIM S.J. A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris*. **The Journal of Microbiology**. v.44, n.6, p. 622–631. 2006.

KIM, J.S., KIM, J.E., CHOI, B.S., PARK, S.E., SAPKOTA, K., KIM, S., LEE, H.H., KIM, C.S., PARK, Y., KIM, M.K., KIM, Y.S., KIM, S.J. Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia. **Mycological research**. v. 11, p. 2990–998. 2008.

KIM, S.H., CHOI, N.S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-jang. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 64, p. 1725–1772. 2000.

- KIRSCH, L. S., PINTO, A. C. S., TEIXEIRA, M. F. S., PORTO, T. S., PORTO, A. L. F. Partition of Proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the PEG/Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Química Nova**, v. 35, p. 1912–1915, 2012.
- KO, J.A., KOO, S.Y., PARK, H.J. Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. **Food Chemistry**. v. 111, p. 921–924. 2008.
- LAREO, C., SPOSITO, A.F., BOSSIO, A.L., VOLPE, D.C. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 391–399. 2006.
- LEE, J.S.; BAI, H.S.; PARK, S.S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic proteases from mushroom, *Fomitella fraxinea*. **Journal Microbiology and BioTechnology**. v. 16, p. 264–271, 2006.
- LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B.L. Commercial proteases: present and future. **FEBS letters**. v. 587, n. 8, p. 1155–63, 2013.
- LIJNEN, H. R., DE C.F., MATSUO, O., COLLEN, D. Comparative fibrinolytic and fibrinogenolytic properties of staphylokinase and streptokinase in plasma of different species in vitro. **Fibrinolysis**, v. 6, p. 33–37, 1992.
- LIMA, C. A., LIMA FILHO, J. L. NETO, B.B. CONVERTI, A., CARNEIRO DA CUNHA, M.G., PORTO, A.L.F. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 16, n. 3, p. 549–560, 2011.
- LIMA, C.A., RODRIGUES, P.M.B., PORTO, T.S., VIANA, D.A., LIMA FILHO, J.L., PORTO, A.L.F., CARNEIRO DA CUNHA, M.G. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM3622. **Biochemical Engineering Journal**. v. 43, n. 3, p. 315–320. 2009.
- LIU, J.; XING, J.; CHANG, T.; MA, Z.; LIU, H. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by *Bacillus natto* NLSSE using statistical experimental methods. **Process Biochemistry**. v. 40, n. 8, p. 2757–2762, 2005.
- LIU, X. L., KOPPARAPU, N. K., ZHENG, H. C., KATROLIA, P., DENG, Y. P., ZHENG, X.Q. 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.
- LU, C.L., CHEN, S.N. Fibrinolytic Enzymes from Medicinal Mushrooms. **Protein Structure**. p. 332–362, 2010.
- LU, F., LU, Z., BIE X, YAO Z., WANG Y., LU Y., GUO Y. Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Thrombosis Research**. v. 126, p. 349–355. 2010.

LU, J., ZHAO, J., LIN, D.Q., YAO, S.J. Separation of nattokinase by immobilized metal ions affinity partitioning in aqueous two-phase systems. **Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities**. v. 18, n. 4, p.465-470. 2004.

LUCCARINI, A. C.; KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Precipitação. In: PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V. (coords.). **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole. v. 1, p. 89-113, 2005.

LUO, Y., LI, B., JI, H., JI, B., JI, F., CHEN, G., TIAN, F. Effect of soybean varieties on the fibrinolytic activity and sensory characteristics of Douchi. **Journal of Food Processing and Preservation**. v. 34, n. 2, p. 457–469, 2010.

MACEDO, Ana Alves. **Ação da vitamina C no processo fibrinolítico in vitro**. Niterói. Universidade Federal Fluminense, 2009. 113f. Dissertação. Curso de Pós-Graduação em Patologia (Patologia Investigativa). Niterói, Rio de Janeiro.

MAHAJAN, P.M. NAYAK, S. LELE, S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 113, p. 307–314. 2012.

MAHAJAN, P.M., NAYAK, S., LELE, S.S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 113, n. 3, p. 307–314. 2012.

MAIOLINI, R. S. S. **Aplicações das enzimas em diagnóstico molecular: desenvolvimento de um reagente enzimático para determinação de lactato em fluidos biológicos**. Lavras. Universidade Federal de Lavras, 36 folhas. Monografia de Especialização. Pós-Graduação Lato Sensu em Química. Lavras, Minas Gerais – Brasil, 2009.

MANAVALAN, P. JOHNSON, W.J. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. **Analytical Biochemistry**, v. 167, n. 1, p. 76. 1987.

MANDER P., CHO S.S., SIMKHADA J.R., CHOI Y.H., YOO J.C. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1449–1455. 2011.

MANZINI, M. C.. **Efeito da carga dos lipídios na interação do BP100 em modelos de membrana**. São Paulo. 2011. Universidade de São Paulo. 135f. Dissertação. Pós Graduação em Ciências Biológicas (área de bioquímica), São Paulo – São Paulo- Brasil. 2011.

MARTINEZ, M. C. E. M. **Métodos Físico-químicos em Biotecnologia**. Dicroísmo circular. Instituto de Biotecnologia – UNAM. 78 f. 2013. Disponível e acessado através de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/dicroismocircular2013.pdf>. Disponível em 26 de julho de 2016.

MEDEIROS & SILVA, G. M., BEZERRA, R. P., TEIXEIRA, J. A., SILVA, F. O., CORREIA, J. M., PORTO, T. S., LIMA-FILHO, J. L., PORTO, A. L. F. Screening,

production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amazonica**. v. 46, n. 3,; p. 301 – 310. 2016.

MEDEIROS & SILVA, G. M., VIANA MARQUES, D. A., PORTO, T. S., LIMA FILHO, J. L., TEIXEIRA, J. A. C., PESSOA-JÚNIOR, A., PORTO, A. L. F. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**.v. 339, p. 52– 57. 2013.

MEDVED, L. V., SOLOVJOV, D. A., INGHAM, K. C. Domain structure, stability and interactions in streptokinase. **European Journal of Biochemistry**. v. 239, p. 333–339. 1966.

MINE, Y., WONG, A. H. K., JIANG, B. Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. **Food Research International**. v. 38, p. 243–250. 2005.

MITRA, P., CHAKRAVERTY. R., CHANDRA, A. Production of proteolytic enzymes by solid state fermentation. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 55, p. 439–442, 1996.

MONTEIRO, V. N., SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos Goiânia**, v.3, n.5, ano 3, jan/jun ISSN 1981-8521, 2009.

MONTEIRO-FILHO, E. S. Sistemas aquosos bifásicos: **Uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos**. Ciência & Tecnologia: FATEC-JB (ISSN 2178-9436), Jaboticabal (SP), v. 1, n. 1, p. 33-41, 2010.

MONTERO-LOMELI, M.; RUMJANEK, F. D. **Técnicas em biociências: protocolos comentados para o laboratório**. Rio de Janeiro: Editora MedBook, 295 folhas, 2013.

MORIN-SARDIN, S., JANY, J.L., ARTIGAUD, S., PICHEREAU, V., BERNAY, B., COTON, E., MADEC, S. Dataset of differentially accumulated proteins in *Mucor* strains representative of four species grown on synthetic potato dextrose agar medium and a cheese mimicking medium. **Data Brief**, v. 11, p. 214–220, Apr, 2017.

MORIN-SARDIN, S., RIGALMA, K., COROLLER, L., JEAN-LUC, J., COTON, E. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor* spp. growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. **Food Microbiology**, v. 56, p. 69-79. 2016.

MORYA, K., YADAV, S., KIM, E.K., YADAV, D. In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 243–57. 2012.

MUKHAMETOVA, L.I., AISINA, R.B., LOMAKINA, G., VARFOLOMEEV, S.D. Characterization of urokinase type plasminogen activator modified by phenylglyoxal. **Bioorganicheskaya Khimiya**, v. 28, p. 308-314. 2002.

MUKHERJEE, A. K., RAI, S. K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus* sp. strain AS-S20-I. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 182–189, 2011.

- MURRAY, V., NORRVING, B., SANDERCOCK, P.A., TERENT, A., WARDLAW, J.M., WESTER, P. The molecular basis of thrombolysis and its clinical application in stroke. **Journal of International Medicine**, v. 267, p. 191-208. 2010.
- MUSSATTO, S. I., FERNANDES, M., MILAGRES, A. M. F. Enzimas: poderosa ferramenta na indústria. **BIOTECNOLOGIA. Revista Ciência Hoje**, v. 41, n. 242, p. 27 – 33. 2007.
- NASCIMENTO, T. P., SALES, A. E., PORTO, C. S., BRANDÃO, R. M. P., CAMPOS-TAKAKI, G. M., TEIXEIRA, J. A. C., PORTO, T. S., PORTO, A. L. F., CONVERTI, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16–24, 2016.
- NAVEENA, B., SAKTHISELVAN, P., ELAIYARAJU, P., PARTHA, N. Ultrasound induced production of thrombinase by marine actinomycetes: Kinetic and optimization studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 61, p. 34–42, 2012.
- NI, H., GUO, P. C., JIANG, W. L., FANA, X. M., LUO, X. Y., LI, H. H. Expression of nattokinase in *Escherichia coli* and renaturation of its inclusion body. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 65–71. 2016.
- NOORA, Z. M., AHMAD, M. S., ARIFFINA, Z. Z. Purification and characterisation of fibrinolytic enzymes from endophytic fungi and *Lignosus rhinocerus*. **Jurnal Teknologi**, v. 78, n. 6–5, p. 53–57, 2016.
- OLIVEIRA, C.C. Trombolíticos, Artigo de revisão, **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. XIV, n. 1, Jan / Fev/Mar, p. 47 – 52, 2001.
- OLIVEIRA, G. G. G., SILVA, D. P., ROBERTO, I. C., VITOLO, M., PESSOA-JUNIOR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase em sistema de duas fases aquosas utilizando PEG-Citrato. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.2, p. 176-187, 2001.
- ONESMUS, K. ASHIPALA, QIAN, H. Optimization of fibrinolytic enzyme production by *Bacillus subtilis* DC-2 in aqueous two-phase system (poly-ethylene glycol 4000 and sodium sulfate). **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p. 4112–4119, 2008.
- OSIPOV, A.V., FILKIN, S.Y., MAKAROVA, Y.V., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N. A new type of thrombin inhibitor, noncytotoxic phospholipase A2, from the *Naja haje* cobra venom. **Toxicon**.v. 55, p. 186–194. 2010.
- OSMOLOVSKIY, A. A., POPOVA, E.A., KREYER, V. G., BARANOVA, N. A., EGOROV, N. S. Fibrinolytic and Collagenolytic Activity of Extracellular Proteinases of the Strains of Micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus*. **MICROBIOLOGY**. Moscow University Biological Sciences Bulletin, v. 71, n. 1, p. 62–66. Allerton Press, 2016.
- PANDEE, P., H-KITTIKUL, A., MASAHIRO, O., DISSARA, Y. Production and properties of a fibrinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. **Journal Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 447-453, Jul-Aug. 2008.

- PANDEY A. Recent process development in solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 27, p. 109–117. 1992.
- PANDEY, A., SOCCOL, C.R., NIGAM, P., BRAND, D., MOHAN, R., ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162. 2000.
- PARK, J.W., PARK, J.E., CHOI, H.K., JUNG, T.W., YOON, S.M., LEE, J.S. Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 979–987. 2013.
- PATEL, G. K., KAWALE, A. A., SHARMA, A. K. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. **Plant physiology and biochemistry: PPB/Société française de physiologie végétale**, v. 52, p. 104–11, 2012.
- PATEL, N., BRACEWELL, D. G. A., SORENSEN, E. Dynamic modelling of aqueous two-phase systems to quantify the impact of bioprocess design, operation and variability. **Food and Bioproducts Processing**, v. 107, p. 10–24, 2018.
- PENNICA, D., HOLMES, W. E., KOHR, W. J., HARKINS, R. N., VEহার, G. A., WARD, C. A., BENNETT, W. F., YELVERTON, E., SEBURG, P. H., HEYNEKER, H. L., GOEDDEL, D. V. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. **Nature**, v. 301, p. 214–21, 1983.
- POLITZER, K., BOM, E. P. S. Enzimas Industriais e Especiais. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, Ciência, Tecnologia e Inovação. Rio de Janeiro. Maio, 2006. **Documento elaborado no âmbito do convênio 143/2005 CGEE – IQ/UFRJ-FUJB**. Relativo ao Termo de Referência Fórum de Biotecnologia 03.
- PORFIRI, M. C., PICÓ, G., ROMANINI, D., FARRUGGIA, B. *Aspergillus oryzae* alpha-amylase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.49, n.1, p.7–13, 2011.
- PORTO, T. S., MEDEIROS e SILVA, G. M., PORTO, C. S., CAVALCANTI, M. T. H., Neto, B. B., LIMA-FILHO, J. L., CONVERTI, A., PORTO, A. L. F., PESSOA, A. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering Processing: Process Intensification**, v. 47, p. 716–721, 2008.
- PORTO, T. S.; MARQUES, P. P.; PORTO, C. S.; MOREIRA, K. A.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PESSOA, A.; PORTO, A. L. F. Extraction of ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima* by continuous process in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1057–64, 2010.
- RAAFAT, A. I., ARABY, E., LOTFY, S. Enhancement of fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* via immobilization process onto radiation synthesized starch/dimethylaminoethyl methacrylate hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1369–1374, 2012.

RAHARDJO, Y.S.P., WEBER, F.J., LE COMTE, E.P., TRAMPER, J., RINZEMA, A. Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, p. 534–539, 2002.

RAMACHANDRAN, S., PATEL, A.K., NAMPOOTHIRI, K.M., FRANCIS, F., NAGY, V., SZAKACS, G., PANDEY, A. Coconut oil cake—a potential raw material for the production of α -amylase. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 169–174, 2004.

RAMAKRISHNA, D.P.N., GOPI REDDY, N., RAJAGOPAL, S.V. Purification and properties of an extracellular alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* (MTTC N0-10110). **International Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 493–504, 2010.

RAO, K.; NARASU, M.L. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 21, p. 2493–2496, 2007.

RAVIKUMAR, G., GOMATHI, D., KALAISELVI, M., UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S411–S417, 2012.

RAYMOND P. W. SCOTT. **Principles and Practice of Chromatography**. Chrom-Ed Book Series (2003), disponível e acessado em :<http://www.library4science.com/> em 30 de julho de 2016.

ROBINSON, T., NIGAM, P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 197–203, 2003.

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

ROVATI, J.I., DELGADO, O.D., FIGUEROA, L.I.C., FARÍÑA, J.I. A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 55–62, 2010.

SADANA, A. **BIOCATALYSIS: Fundamentals of Deactivation Kinetics**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, New York, 1995.

SANDHYA, C., SUMANTHA, A., SZAKACS, G., PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Insutrial- Engenharia Biquimica**, v. 2. 1 edição. Editora Edgard Blucher LTDA. 2001.

SHANMUGAPRAKASHA, M., VINOTHKUMAR, V., RAGUPATHYA, J., REDDY, D.A. Biochemical characterization of three phase partitioned naringinase from

Aspergillus brasiliensis MTCC 1344. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 418–423, 2015.

SHIRASAKA, N., NAITOU, M., OKAMURA, K., KUSUDA, M., FUKUTA, Y., TERASHITA, T. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, p. 354–364. 2012.

SILVA, M. E., KULA, M. R., FRANCO, T. T. Uso de Polietilenoglicol Modificado para Purificação de Lisozima em Sistema de duas Fases Aquosas. **Revista de Ciência & Tecnologia**, v. 14 ,p. 105-112, 1999.

SILVA, O. S., GOMES, M. H. G., OLIVEIRA, R. L., PORTO, A. L. F., CONVERTI, A., PORTO, T. S. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamari* URM 4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

SILVEIRA, C. M., FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 27, n. 4, p. 805-811, 2007.

SIRITAPETAWE, J., THUMANU, K., SOJIKUL, P., THAMMASIRIRAK, S. A novel serine protease with human fibrinolytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, p. 907–912. 2012.

SOUZA, F. A. S. D., SALES, A. E., SILVA P. E. C., BEZERRA, R. P., MEDEIROS & SILVA, G. M., ARAÚJO, J. M., CAMPOS TAKAKI, G. M., PORTO, T. S., TEIXEIRA, J. A. C., PORTO, A. L. F. Optimization of Production, Biochemical Characterization and In Vitro Evaluation of the Therapeutic Potential of Fibrinolytic Enzymes from a New *Bacillus Amyloliquefaciens*. **Macromolecular Research**, v. 24, n. 7, p. 587-595, 2016.

STEPHANI, L., TJANDRAWINATA, R. R., AFIFAH, D. N., LIM, Y., ISMAYA, W. T., SUHARTONO, M. T. Food Origin Fibrinolytic Enzyme With Multiple Actions. **Journal of Biosciences**, v. 24, p. 124-130, 2017.

SUMI, H., YANAGISAWA, Y., YATAGAI, C., SAITO, J. 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 Q., ZHANG B., YAN Q. J., JIANG Z. Q. Comparative analysis on the distribution of protease activities among fruits and vegetable resources. **Food Chemistry**, v. 213, p. 708–713. 2016.

SUNDARARAJAN, S., KANNAN, C.N., CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 128–33, 2011.

THANAPIMMRETHA, A., LUADSONGKRAM, A., TITAPIWATANAKUN, B. Value added waste of *Jatropha curcas* residue : Optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Industrial Crops & Products**, v. 37, n. 1, p. 1–5, 2012.

TIBAZARWA, K.B. DAMASCENO, A.A. Hypertension in Developing Countries. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 30, p. 527-533, 2014.

TUNGA, R., BANERJEE, R., BHATTACHARYYA, B.C. Optimization of n variable biological experiments by evolutionary operation-factorial design technique. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 224–30, 1999.

UESUGI, Y., KAWATA, H., J.O.J., SAITO, Y., TABATA, Y. An ultrasound-responsive nano delivery system of tissue-type plasminogen activator for thrombolytic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 147, p. 269–277. 2010.

VAIDYA, B., NAYAK, M. K., DASH, D., AGRAWAL, G. P., VYAS, S. P. Development and characterization of site specific target sensitive liposomes for the delivery of thrombolytic agents. **International journal of pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 254–61, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P., ARUN, A., VINCENT, S. G. P., ARASU, M. V. N., DHABI, A. A. Cow Dung Is a Novel Feedstock for Fibrinolytic Enzyme Production from Newly Isolated *Bacillus* sp. IND7 and Its Application in In Vitro Clot Lysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 361, p. 1 – 14. 2016.

VIJAYARAGHAVAN, P., VINCENT, S. G. P. A low cost fermentation medium for potential fibrinolytic enzyme production by a newly isolated marine bacterium, *Shewanella* sp. IND20. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 135–142, 2015.

VIJAYARAGHAVAN, P., VINCENT, S. G. P., VALAN, A. M., AL-DHABI, N. A. Bioconversion of agro-industrial wastes for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus halodurans* IND18: Purification and biochemical characterization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 1–8. 2016.

VIVAS J., IBARRA C., SALAZAR A. M., NEVES-FERREIRA, A. G. C., SÁNCHEZ, E. E., PERALES, J., RODRÍGUEZ-ACOSTA, A., GUERRERO, B. Purification and characterization of tenerplasmin-1, a serine peptidase inhibitor with antiplasmin activity from the coral snake (*Micrurus tener*) venom. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 179, p. 107–115, 2016.

WANG, C. T., JI, B. P., LI, B., NOUT, R., LI, P. L., JI, H., CHEN, L. F. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 750-758, 2006.

WANG, J., CHIU, H., HSIEH, C. Optimization of the Medium Components by Statistical Experimental Methods to Enhance Nattokinase Activity. **Food in Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 21–27, 2009.

WANG, S.L., WU, Y.Y., LIANG, T.W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New Biotechnology**. v. 28, n. 2, 2011.

WANG, Y., HU, X., HAN, J., NI, L., TANG, X., HU, Y., CHEN, T. Integrated method of thermosensitive triblock copolymer-salt aqueous two phase extraction and dialysis membrane separation for purification of *Lycium barbarum* polysaccharide. **Food Chemistry**, v. 194, p. 257-264, 2016.

WEI, X., LUO, M., XU, L., ZHANG, Y., LIN, X., KONG, P., LIU, H. Production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* by fermentation of chickpeas, with the evaluation of the anticoagulant and antioxidant properties of chickpeas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 3957–3963, 2011.

WHEELWRIGHT, S.M. Protein purification: design and scale up of downstream processing. Munich, **Hanser Publishers**, 228 f. 1991.

WIEMER, P., GRUYS, E., VAN-HOECK, B. A study of seven different types of grafts for jugular vein transplantation in the horse. **Research Veterinary. Science**, v.79, p.211-217, 2005.

WONGANU, B., POOTANAKIT, K., BOONYAPAKRON, K., CHAMPREDA, V., TANAPONGPIPAT, S., EURWILAICHITR, L. Cloning, expression and characterization of a thermotolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 58, n. 1, p. 78-86, 2008.

YANG, Z., TAN, Z., LI, F., LI, X. An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaves using acidic ionic liquids. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 78-86.2016.

YEGIN, S., FERNANDEZ-LAHORE, M., SALGADO J.G., GUVENC, A., GOKSUNGUR, U.Y., TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949–60, 2011.

YEGIN, S., GOKSUNGUR, Y., FERNANDEZ-LAHORE, M. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1312–1319, 2012.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.

YIN, LI-JUNG, LIN HSIN-HUNG, JIANG S.T. Bioproperties of Potent Nattokinase from *Bacillus subtilis* YJ1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 5737–5742. 2010.

ZHANG, N., ZHAO, X.H. Study of *Mucor* spp. in semi-hard cheese ripening. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1-7, 2010.

ZHANG, Y., CUI, J., ZHANG, R., WANG, Y., HONG, M. A novel fibrinolytic serine protease from the polychaete *Nereis* (Neanthes) *virens* (Sars): Purification and characterization. **Biochimie**, v. 89, p. 93-103, 2007.

ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P., MACEDO, ALEXANDRE, J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137, jul./dez, 2009.

ANEXO

ARTIGOS PUBLICADOS:

- a) CLEMENTINO, E. L.; SILVA, J. M.; **NASCIMENTO, T. P.**; LIMA, G. M. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; PORTO, C. S. Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online), v. 69, p. 123-129, 2017;
- b) OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; ASSIS, C. R. D. ; **NASCIMENTO, T. P.** ; HERCULANO, P. N. ; CAVALCANTI, M. T. H. ; PORTO, A. L. F. . Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. Pubvet (Londrina), v. 11, p. 243-255, 2017.
- c) **NASCIMENTO, THIAGO PAJEÚ**; SALES, AMANDA EMMANUELLE ; PORTO, TATIANA SOUZA ; COSTA, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO ; BREYDO, LEONID ; UVERSKY, VLADIMIR N. ; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO ; CONVERTI, ATTILIO . Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. BIOPROCESS AND BIOSYSTEMS ENGINEERING, v. 40, p. 1-11, 2017;
- d) OLIVEIRA, V. M. ; CUNHA, M. N. C. ; **NASCIMENTO, T. P.** ; ASSIS, C. R. D. ; BEZERRA, R. S. ; PORTO, A. L. F. . Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado. ACTAPESCA, v. 2, p. 70-82, 2017;
- e) OLIVEIRA, V. M. ; **NASCIMENTO, T. P.** ; ASSIS, C. R. D. ; BEZERRA, R. S. ; PORTO, A. L. F. . Prospecting enzymes of industrial interest in digestive viscera: greater amberjack (*Seriola dumerili*). JOURNAL OF COASTAL LIFE MEDICINE, v. 5, p. 233-238, 2017.
- f) **NASCIMENTO, T. P.**; SALES, A. E. ; PORTO, C. S. ; COSTA, R. M. P. B. ; CAMPOS-TAKAKI, G. M. ; TEIXEIRA, J. A. C. ; PORTO, T. S. ; PORTO, A. L. F. ; CONVERTI, A. . PURIFICATION OF A FIBRINOLYTIC PROTEASE FROM *Mucor subtilissimus* UCP 1262 BY AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS (PEG/SULFATE). Journal of Chromatography. B (Print) **JCR**, p. 16-24, 2016;
- g) ALBUQUERQUE, WENDELL; **NASCIMENTO, THIAGO**; BRANDÃO-COSTA, ROMERO; FERNANDES, THIAGO; PORTO, ANA. Static magnetic field effects on proteases with fibrinolytic activity produced by *Mucor subtilissimus*. Bioelectromagnetics **JCR**, v. 1, p. 1-12, 2016;
- h) **NASCIMENTO, THIAGO PAJEÚ**; SALES, AMANDA EMMANUELLE; PORTO, CAMILA SOUZA; BRANDÃO, ROMERO MARCOS PEDROSA; TAKAKI, GALBA MARIA CAMPOS; TEIXEIRA, JOSE ANTÔNIO COUTO; PORTO, TATIANA SOUZA; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor*

subtilissimus UCP 1262 in Solid-State Fermentation. Advances in Enzyme Research, v. 03, p. 81-91, 2015.

PRÊMIOS:

- a) 2º Lugar entre os trabalhos apresentados no III Simpósio em Oncologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, Hospital de Câncer de Pernambuco;
- b) 3º Lugar entre os trabalhos apresentados no 5º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica.

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:

- a) **T. P. NASCIMENTO**, R. M. P. B. COSTA, A. CONVERTI, e A. L. F. PORTO. PRODUCTION AND PURIFICATION OF PROTEASE BY FUNGUS ISOLATED FROM THE BRAZILIAN DRY TROPICAL FOREST (CAATINGA) 5º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2017;
- b) Vagne de Melo Oliveira, **Thiago Pajeú Nascimento**, Caio Rodrigo Dias Assis, Ranielson Souza Bezerra³, Ana Lúcia Figueiredo Porto. AVALIAÇÃO FÍSICO-BIOQUÍMICA E DENSITOMÉTRICA DE COLAGENO DE *CICHLA OCELLARIS* COMO FONTE POTENCIAL DE PÉPTIDOS PARA FINS INDUSTRIAIS. Encontro Anual da Biofísica, 2018;
- c) V. M. OLIVEIRA, C. H. RODRIGUES, **T. P. NASCIMENTO**, A. L. F. PORTO. FISH AS A POTENTIAL SOURCE OF COLLAGENOLYTIC AND FIBRINOLYTIC ENZYMES OF INTEREST TO THE PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL INDUSTRY. 5º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2017;
- d) V. M. OLIVEIRA, **T. P. NASCIMENTO**, W. W. C. ALBUQUERQUE, M. N. C. CUNHA, C. A. LIMA, D. A. V. MARQUES, A. L. F. PORTO. PARTITIONING COLLAGENOLYTIC ENZYME FROM *Cichla Ocellaris* USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS (PEG-PHOSPHATE) AND APPLICATIONS OF PEPTIDES FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES, 5º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2017;
- e) BUBA, J. C.; **NASCIMENTO, T. P.**; PORTO, A. L. F.; TONSO, A. . PRODUCTION OF PROTEASE WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY BY THE SUBMERGED CULTURE OF *M. Subtilissimus* IN BIOREACTOR. In: XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016, Fortaleza. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2016;
- f) ROCHA, F. T. B.; SOUZA, K. P. S.; CLEMENTINO, E. L.; PORTO, C. S.; **NASCIMENTO, T. P.**; PORTO, A. L. F.; COSTA, R. M. P. B.. Produção de proteases por *Mucor subtilissimus* UCP1262 em fermentação estado sólido e submersa. In: XX SINAFERM, 2015, Fortaleza. Anais do XX SINAFERM, 2015.

- g) SALES, A. E. ; **NASCIMENTO, T. P.**; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, C. S.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. . PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL PROTEASE WITH FIBRINOLYTIC ACTIVITY FROM *Mucor subtilissimus* UCP 1262. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis. Anais do XX COBEQ, 2014.

RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS:

- a) SILVA, M. M.; **NASCIMENTO, T. P.**; MEDEIROS, S. M. F. R. S.; COSTA, R. M. P. B.; SANTOS, N. P. S.; PORTO, A. L. F. Atividade citotóxica in vitro da protease fibrinolítica obtida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 frente a Sarcoma - 180. In: III Simpósio em Oncologia, 2017, Recife. Anais do III Simpósio em Oncologia, 2017;
- b) SILVA, J. B.; TORRES, M. E. L. M.; **NASCIMENTO, T. P.**; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, C. O. ; PORTO, A. L. F. Partição de enzima fibrinolítica de *Penicillium verruculosum* URM 5127 por sistema de duas fases aquosas PEG/Sulfato de Sódio. In: XVI Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX, 2016, Recife. Anais do XVI JEPEX, 2016;
- c) TORRES, M. E. L. M.; SILVA, J. B.; **NASCIMENTO, T. P.**; HERCULANO, P. N.; COSTA, R. M. P. B.; NASCIMENTO, C. O. ; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. PRODUCTION OF FIBRINOLYTIC ENZYMES BY THE *PENICILLIUM* GENUS USING SUBMERGED FERMENTATION. In: XIII Reunião Regional do Nordeste da SBBq, 2016, Fortaleza. Anais da XIII Reunião Regional do Nordeste da SBBq, 2016;
- d) **NASCIMENTO, T. P.**; SILVA, J. M.; SALES, A. E. ; OLIVEIRA, V. M.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, C. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A. PLANEJAMENTO FATORIAL PARA EXTRAÇÃO DE ENZIMA FIBRINOLITICA DE MUCOR SUBTILISSIMUS UCP1262 MEDIANTE SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (PEG/FOSFATO). In: 4 Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2016, Jaboatão dos Guararapes. Anais do 4º Encontro Brasileiro de Inovação Terapêutica, 2016;
- e) **NASCIMENTO, T. P.**; SALES, A. E. ; CORREIA, P. C.; SILVA, O. S.; SILVEIRA, L. L.; SILVA, J. M.; PORTO, C. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of Protease From *Mucor subtilissimus* SIS 42 in Aqueous Two-Phase System Using Peg/Sodium Phosphate. In: XLIII Annual Meeting of SBBq, 2014, Foz do Iguaçu, Paraná. Anais da SBBq, 2014.