



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PÁBLO EUGÊNIO DA COSTA E SILVA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES**

Recife

2018

Páblo Eugênio da Costa e Silva

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Co-orientadora

Prof^a Dr^a Raquel Pedrosa Bezerra

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE

Recife

2018

Catálogo na fonte

Elaine C. Barroso (CRB4/ 1728)

Silva, Páblo Eugênio da Costa e

Produção, purificação e caracterização de enzimas fibrinolíticas obtidas a partir de micro-organismos fotossintetizantes / Páblo Eugênio da Costa e Silva- 2018.

39 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto Coorientadora: Raquel Pedrosa Bezerra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologias.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo

1. Enzimas 2. Sistema cardiovascular- doenças 3. Milhocina I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Bezerra, Raquel Pedrosa (coorient.)

III. Título

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-400

Páblo Eugênio da Costa e Silva

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS
FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS A PARTIR DE MICRO-ORGANISMOS
FOTOSSINTETIZANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS), do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 27/Julho/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
(Presidente/Orientador)

Prof^a Dra. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
(1º Examinador)

Profº Dr. Emmanuel Viana Pontual
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
(2º Examinador)

Profº Dr. Vagne de Melo Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
(3º Examinador)

Prof^a Dra. Maria Carolina de Albuquerque Wanderley
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
(4º Examinador)

*aos meus pais: João Eugênio e Denize Pereira, irmãos, amigos, Tia Teta e Tio Frank (In
Memoriam), as minhas entidades e a todo meu povo que sempre me guiaram*

AGRADECIMENTOS

A minha mulher Ceça e seus familiares pelo carinho e apoio quando sempre precisei.

Aos meus Padrinhos, Seu Omolu, Seu Zé Filintra, Seu Boiadeiro e Reis Malunguinho.

As minhas Madrinhas, Maria Padilha, Mestra Paulina e Mestra Ritinha.

A minha Madrinha Mere e todos do terreiro, por sempre pedir proteção, saúde, sorte e ciência para o seu filho.

A Professora Dra Ana Lúcia Figueiredo Porto por ter me dado a oportunidade de ser seu orientando por mais esses 4 anos, sinto-me bastante grato por tudo que a senhora fez por minha carreira profissional e pessoal. Oportunidade, atenção e confiança foram tudo que eu precisava para me tornar o que sou hoje, e esse mérito também é seu.

A Professora Dra Raquel Pedrosa Bezerra que nunca hesitou em medir esforços para retirar minhas dúvidas múltiplas sobre o mesmo assunto. Por está sempre a disposição e por sempre ser esta pessoa simples, humilde e maravilhosa. E dentro desses 6 anos que passamos juntos dentro da pesquisa, hoje posso lhe dizer que você é uma pessoa que admiro imensamente, a senhora é demais! Uma *Spirulina* em pessoa!

Agradeço também a Anderson Paulo por ter sido um irmão desde a graduação e ter me dado força para fazer esta pós-graduação.

Aos meus amigos de laboratório. Rebeca Melo com seu alto astral infinito, Priscilla Calaça sempre com suas brincadeiras e auto-estima, Meire Falcão, Milena Fernandes, Aldeni José, Alexsandra Frazão, Ariadne Tennyle, Rafaela Barros e aos tantos outros que foram e ainda fazem presente.

A todos que estão descritos aqui e a todos que fazem a família do Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ) e Laboratório de Tecnologias de Bioativos (LABTECBIO) da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

E por fim, a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) por me conceder a ajuda financeira (bolsa), que foi de suma importância para o decorrer do doutorado nesses quatro anos de pesquisa científica.

“Amigo bom é irmão do outro, um corta o pau o outro arranca o toco”

Mestre Zé Filintra

(Centro Espírita Cabocla Jurema – São Lourenço da Mata – PE - Brasil)

RESUMO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo e podem ser causadas pela formação desordenada de fibrina nos vasos sanguíneos. Enzimas fibrinolíticas podem ser usadas para reestabelecer o fluxo sanguíneo normal. O objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar uma enzima fibrinolítica obtida a partir da microalga *Chlorella vulgaris* cultivada mixotroficamente usando milhocina, um subproduto agroindustrial do processamento do milho. O cultivo da microalga *C. vulgaris* utilizando 1% de milhocina obteve um $X_m = 1637,45 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 181,93 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e atividade fibrinolítica ($FU = 273,82 \text{ U mg}^{-1}$), bem como um menor valor de atividade proteásica total ($PA = 33,22 \text{ U mg}^{-1}$). Ambas as enzimas foram purificadas por cromatografia de troca iônica. A enzima purificada de *C. vulgaris* apresentou uma atividade fibrinolítica de $1834,6 \text{ U mg}^{-1}$ ($226,86 \text{ mm}^2$) e peso molecular de 45 kDa, confirmado por SDS-PAGE e zimografia de fibrina. A enzima foi Fe^{2+} -dependente e inibida pelo inibidor de metaloproteinase, EDTA (43,37%) e serino protease, PMSF (49,59%), caracterizando uma metal-dependente serino protease. Também apresentou taxa de hemólise menor que 4% e atividade trombolítica de 25,6% em apenas 90 minutos de reação. Assim, sugere-se que o cultivo mixotrófico de *C. vulgaris* utilizando milhocina é uma fonte promissora para produção de enzima fibrinolítica, diminuindo os custos industriais, agregando valor ao produto final e mostrando ser de interesse para as indústrias biomédica e farmacêutica.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Enzimas fibrinolíticas. Milhocina. Subproduto agroindustrial.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading causes of death in the world and may be caused by the disordered formation of fibrin in blood vessels. Fibrinolytic enzymes can be used to reestablish normal blood flow. The objective of this work was to produce, purify and characterize an fibrinolytic enzyme obtained from microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated mixotrophically using corn steep liquor, an agroindustrial by-product of maize processing. The cultivation of *C. vulgaris* microalgae using 1% cornsteep obtained a $X_m = 1637.45 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 181.93 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and fibrinolytic activity ($FU = 273.82 \text{ U mg}^{-1}$) as well as a lower value of total protease activity ($PA = 33.22 \text{ U mg}^{-1}$). Both enzymes were purified by ion exchange chromatography. The enzyme purified from *C. vulgaris* showed fibrinolytic activity of 1834.6 U mg^{-1} (226.86 mm^2) and molecular weight of 45 kDa, confirmed by SDS-PAGE and fibrin zymography. The enzyme was Fe^{2+} -dependent and inhibited by the metalloproteinase inhibitor, EDTA (43.37%) and serine protease, PMSF (49.59%), characterizing a metal-dependent serine protease. It also presented hemolysis rate of less than 4% and thrombolytic activity of 25.6% in only 90 minutes of reaction. Thus, it is suggested that the mixotrophic culture of *C. vulgaris* using corn steep liquor is a promising source for the production of fibrinolytic enzyme, reducing industrial costs, adding value to the final product and showing that it is of interest to the biomedical and pharmaceutical industries.

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Fibrinolytic enzymes. Corn steep liquor. Agroindustrial subproduct.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Microscopia da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	16
Figura 2 – Microscopia da microalga <i>Dunaliella tertiolecta</i>	17
Figura 3 – Visão geral do sistema fibrinolítico. O plasminogênio é convertido em serino protease ativa, plasmina, principalmente através da ação de duas cadeias de ativadores do plasminogênio tissular (tc-tPA) ou duas cadeias de uroquinase (tc-uPA). Estes ativadores são secretados como cadeias simples (sc-tPA e sc-uPA) a partir de células endoteliais e a partir de epitélio renal, monócitos, macrófagos ou células endoteliais respectivamente. Ambos tPA e uPA podem ser inibidos pelo inibidor de ativadores do plasminogênio-1 (PAI), enquanto que a plasmina é inibida pelo seu maior inibidor, inibidor $\alpha 2$ -plasmina ($\alpha 2$ -PI) e em menor grau pela $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -MG). Uma vez que a plasmina é gerada, converte as cadeias simples de tPA e uPA em cadeias duplas. Em seguida, são rapidamente inibidos, a menos que se mantenham ligados a fibrina ou a receptores da superfície celular. Os inibidores estão indicados por caixas escuras.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição típica da milhocina.....	20
Tabela 2. Propriedades das enzimas fibrinolíticas produzidas a partir de organismos fotossintetizantes.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
FDA	Food and Drug Administration
rt-PA	Alteplase
PLG	Plasminogênio
PLa	Plasmina
u-PA	Uroquinase Ativadora do Plasminogênio
t-PA	Ativador do Plasminogênio Tecidual
TAFI	Inibidor da Fibrinólise Ativado pela Trombina
CVD	Cardiovascular Disease
CIP	Codium intricatum protease
CLP	Codium latum protease
CDP	Codium divaricatum protease
pH	Potencial Hidrogeniônico
BBM	Bold's Basal Medium
X_m	Maximum Cell Concentration
Px	Cell Productivity
CSL	Corn Steep Liquor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	14
1.1.1 Objetivo Geral.....	14
1.1.2 Objetivos Específicos.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Micro-organismos Fotossintetizantes.....	15
2.1.1 <i>Chlorella vulgaris</i>	15
2.1.2 <i>Dunaliella tertiolecta</i>	16
2.2 Cultivos de Micro-organismos Fotossintetizantes.....	17
2.2.1 Cultivo autotrófico.....	17
2.2.2 Cultivo heterotrófico.....	18
2.2.3 Cultivo mixotrófico.....	19
2.3 Milhocina.....	19
2.4 Aplicações Biotecnológica dos Micro-organismos Fotossintetizantes.....	21
2.5 Proteases Fibrinolíticas.....	21
3 ARTIGO PUBLICADO.....	27
<i>In vitro</i> THROMBOLYTIC ACTIVITY OF A PURIFIED FIBRINOLYTIC ENZYME FROM <i>Chlorella vulgaris</i>	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO A - ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS.....	36
ANEXO B - PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO.....	36
ANEXO C - TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS.....	37
ANEXO D – APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSO.....	37

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte em muitos países. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 17,3 milhões de pessoas morrem vítimas de doenças cardiovasculares por ano, e se estima que o número de mortes chegue a 23,6 milhões até 2030. Em 2013, essas mortes representaram 31% de todas as mortes globais, sendo 80% das mortes registradas em países de baixa e média renda (AMERICAN HEART ASSOCIATION'S, 2016).

Ativadores do plasminogênio são utilizados no tratamento de distúrbios relacionados ao coágulo sanguíneo. Dentre eles podemos destacar a uroquinase (FENG et al., 2017), estreptoquinase (ADIVITIYA et al., 2016), ativador do plasminogênio tissular e estafiloquinase (AISINA et al., 2016). No entanto, eles apresentam várias desvantagens, como meia-vida curta, alto custo, necessidade de altas doses e efeitos colaterais, incluindo reações alérgicas e complicações hemorrágicas (UESUGI et al., 2011).

Como alternativa aos tratamentos existentes, as vantagens da produção de enzimas por via microbiana é seu baixo custo e alta eficácia (DEEPAK et al., 2010). Uma das principais aplicações farmacêuticas das proteases fibrinolíticas microbianas é no tratamento da trombose (MINE et al., 2005).

Enzimas fibrinolíticas já foram extraídas com sucesso a partir de fontes vegetais, animais e microbianas. As de origem microbiana têm sido relatadas em várias espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Alteromonas*, *Coryneform*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichotecium*, *Actinomyces*, *Escherichia coli*, *Streptomyces* e *Anabaena*.

O cultivo de micro-organismos fotossintetizantes destinados a obtenção de enzimas fibrinolíticas é pouco relatado (BANERJEE et al., 2013) e pode ser uma alternativa como fonte de novas enzimas.

A procura de compostos bioativos de interesse farmacológico em microalgas e cianobactérias têm recebido grande atenção, principalmente no tocante à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes micro-organismos. A imensa biodiversidade e consequente variabilidade na composição bioquímica em extratos dos micro-organismos fotossintetizantes têm levado à descoberta de uma variedade de substâncias com atividades biológicas.

Sendo assim, a aplicação biotecnológica de micro-organismos fotossintetizantes na produção de enzimas fibrinolíticas utilizando cultivo mixotrófico pode se tornar uma alternativa bastante viável e econômica, diminuindo os custos de produção e aumentando a produção da biomolécula de interesse. Assim, a purificação e caracterização da biomolécula para evitar efeitos colaterais em etapas futuras são fundamentais, evitando riscos à saúde humana e promovendo bem-estar.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Produzir, purificar e caracterizar proteases fibrinolíticas a partir da microalga *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta*

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a produção fibrinolítica da microalga *C. vulgaris* utilizando subproduto agro-industrial milhocina;
- b) Purificar a enzima fibrinolítica produzida a partir das microalgas *C. vulgaris*;
- c) Estimar o peso molecular da enzima fibrinolítica, utilizando a técnica de SDS-PAGE e zimografia de fibrina;
- d) Caracterizar bioquimicamente, quanto o efeito de íons e inibidores a enzima purificada da microalga;
- e) Verificar o efeito hemolítico e trombolítico *in vitro* da enzima obtida a partir da microalga *C. vulgaris*;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos Fotossintetizantes

Os micro-organismos fotossintéticos podem ser procarióticos ou eucarióticos e são produtores carboidratos, proteínas e lipídios como resultados da fotossíntese. Eles podem crescer rapidamente e viver em condições severas devido à sua estrutura unicelular ou simplesmente multicelular. Exemplos de micro-organismos fotossintéticos procarióticos são as cianobactérias (Cyanophyceae), e de eucarióticos, as microalgas (Chlorophyta). Os micro-organismos fotossintetizantes estão presentes em todos os ecossistemas existentes, representando uma grande variedade de espécies que vivem em uma ampla gama de condições ambientais. A iluminação solar, a água e os sais minerais são os principais requisitos para o cultivo destes micro-organismos. Estes possuem a capacidade de assimilar o CO₂ atmosférico utilizando a energia luminosa como energia, com uma eficiência 10 vezes maior do que às plantas terrestres, com inúmeras vantagens tecnológicas adicionais (RICHMOND, 2004; BRENNAN e OWENED, 2010). Vários micro-organismos fotossintetizantes são utilizados para obtenção de diversos produtos biotecnológicos e biomassa, devido a sua diversidade fisiológica e bioquímica, dentre os quais podemos citar a *Chlorella*, *Dunaliella* e *Arthrospira*.

2.1.1 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris (Figura 1) é uma microalga pertencente ao Filo Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae, Ordem Chlorellales e Família Chlorellaceae. São cosmopolitas, possuindo forma esférica e coloração verde devido a presença de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b) em seus cloroplastos. Através da fotossíntese, essas microalgas se multiplicam rapidamente mediante reprodução assexuada.

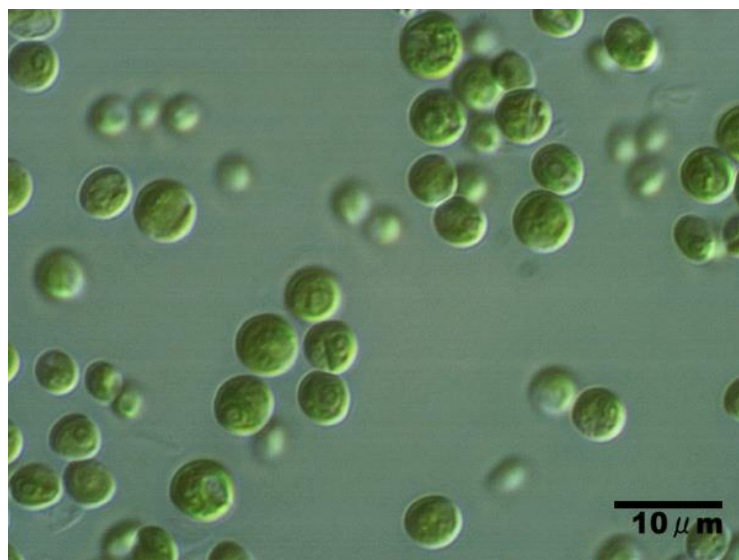


Fig. 1. Microscopia da microalga *Chlorella vulgaris*. (Fonte: ALGAL RESOURCE DATABASE: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?stockNo=NIES-642>)

Por décadas estes micro-organismos têm sido estudados visando a produção de biomassa para diferentes aplicações. A primeira cultura de microalga foi estabelecida por Beijerinck, em 1980, constituindo-se na espécie *Chlorella vulgaris*. Em escala comercial, a produção de microalgas iniciou-se no Japão, na década de 60, com espécies do gênero *Chlorella* sp., visando a utilização como suplemento alimentar. A partir de então, o cultivo de microalgas foi aumentando, destinando-se às mais variadas aplicações, como produção de proteínas, lipídios, clorofila, carotenóides, enzimas, agentes antioxidantes, vitaminas, antibióticos (LOURENÇO, 2007).

A biomassa da *Chlorella vulgaris* apresenta algumas particularidades, tais como elevado teor protéico e lipídico, contendo aminoácidos e ácidos graxos essenciais a alimentação humana e animal. Por possuir essas características, são recomendadas como suplemento alimentar (ECIMAT, 2013).

2.1.2 *Dunaliella tertiolecta*

Dunaliella tertiolecta (Figura 2) é uma microalga unicelular marinha, de coloração esverdeada, simetria radial, elipsoidal, oval ou raramente ovalada. Suas células medem cerca de 5-18 μm e são caracterizados como micro-organismos fotossintetizantes flagelados.

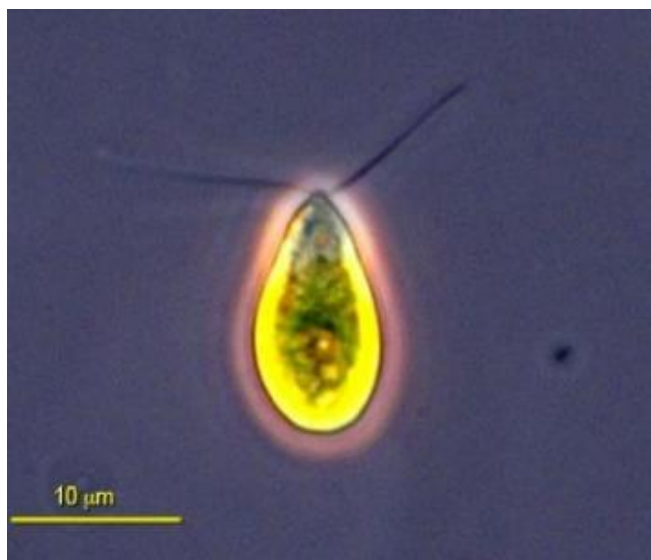


Fig. 2. Microscopia da microalga *Dunaliella tertiolecta*. (Fonte: ENCYCLOPEDIA OF LIFE: <http://eol.org/pages/901806/overview>)

Algumas espécies da microalga *Dunaliella* estão descritas na literatura, a exemplo da *D. salina*, com aplicações na indústria de alimentos (KAY, 1991), obtenção de carotenoides, vitaminas, antioxidantes (MURTHY et al., 2005; MILKO, 1963) e de enzimas (BEM-AMOTZ & AVRON, 1990; GEORGIANNA et al., 2013); *D. primolecta*, como fonte de substâncias antibióticas (CHANG et al., 1993); como também, a *D. tertiolecta*, utilizada como indicadores ecológicos (HALL & GOLDING, 1998), produtora de fitosteróis (FRANCAVILLA et al., 2010) e fornecedora de proteínas (FRABREGAS & ERRERO, 1985).

2.2 Cultivos de Micro-organismos Fotossintetizantes

A tecnologia de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes é um dos principais fatores para obtenção de diversos produtos de interesse biotecnológico, podendo ser utilizado o cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico.

2.2.1 Cultivo autotrófico

No cultivo autotrófico, os micro-organismos fotossintetizantes geram matéria orgânica através da fixação de carbono inorgânico, principalmente CO₂, e luz como fonte de energia (CHENG et al., 2013). Este tipo de sistema de cultivo é visto como um dos métodos mais antigos para obtenção de biomassa microalgal (LODI et al., 2005). O sistema pode ser realizado em águas naturais (lagos, lagoas e lagoas), lagoas artificiais e

recipientes (por exemplo, Erlenmeyers, tanques, sacos). Nesse método, o requisito de CO₂ é fornecido a partir do ar da superfície ou aeradores submersos que podem ser instalados para aumentar a absorção de CO₂ (BRENNAN & OWENDE, 2010).

A utilização tanto de sistemas abertos quanto de sistemas fechados (fotobioreatores) em culturas autotróficas, geralmente se torna desvantajosa, devido à baixa produtividade celular e consequente dificuldade de obtenção de novas biomoléculas, fazendo recorrer a outros modos de cultivo.

2.2.2 Cultivo heterotrófico

O cultivo heterotrófico não utiliza da energia luminosa para o crescimento celular, sendo sua fonte de energia a oxidação de substâncias orgânicas (URRUTIA et al., 1995). Esses sistemas de cultivo são uma alternativa viável aos sistemas de cultivo fotoautotróficos mais tradicionais, que tipicamente sofrem de uma biomassa desfavorecida, alto custo de produção e baixa produtividade. Várias espécies de algas foram cultivadas com sucesso em condições de cultura heterotróficas, tais como *Nitzschia laevis* (WEN & CHEN, 2000), *Chlorella protothecoides* (GAO et al., 2010) e *Galdieria sulphuraria* (GRAVERHOLT & ERIKSEN, 2007) para a produção de ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico, biodiesel e c-ficocianina.

A principal fonte de carbono do cultivo heterotrófico é a glicose. No entanto, devido ao alto custo da glicose, algumas pesquisas usam o produto de hidrólise de celulose para substituir a glicose (BEHRENS, 2005). Em adição, *Chlorella* também possui a capacidade de crescimento utilizando glicerol como fonte de carbono (O'GRADY & MORGAN, 2010), que pode servir para manter o equilíbrio osmótico celular e não é prejudicial para as microalgas, mesmo em alta concentração. O tipo de fontes de carbono orgânico também pode afetar o crescimento das microalgas. *C. vulgaris* cultivada com glicose, glicerol ou acetato obteve maiores concentrações de biomassa e acumulação de lipídios. Também foi relatado que algumas microalgas poderiam crescer com sorgo e inhame para produzir lipídios (ZHANG et al., 2013). No entanto, uma desvantagem causada pela adição de fonte de carbono orgânico é a facilidade de contaminação do meio por outros micro-organismos, tais como bactérias, fungos e/ou leveduras (CHEN et al., 2011), porém o cultivo heterotrófico tem sido considerado como um método potencial para reduzir o custo de produção de substâncias economicamente viáveis a partir de microalgas (ERIKSEN, 2008).

2.2.3 Cultivo mixotrófico

Neste tipo de cultivo, os micro-organismos fotossintetizantes são capazes de crescer utilizando CO₂ e fontes orgânicas na presença de luz. Normalmente, a *Chlorella* cresce melhor em condições mixotróficas do que em condições autotróficas. O crescimento mixotrófico combina as vantagens do cultivo autotrófico com o heterotrófico, superando as desvantagens do modo autotrófico (CHEN et al., 1996). Sob condições de cultivo mixotrófico, as microalgas podem crescer através dos metabolismos heterotrófico e autotrófico, simultaneamente, aumentando a taxa de crescimento e outros biocompostos. Diferente do modo heterotrófico, os pigmentos e carotenóides fotossintéticos como o β -caroteno podem ser preservados em condições mixotróficas (ALKHAMIS e QIN, 2015).

O cultivo mixotrófico possui a capacidade de aumentar a taxa de crescimento e produção de biomassa, além da possibilidade da produção de diversos químicos finos com aplicação industrial (enzimas, carboidratos, pigmentos). O que é resultante da versatilidade de fontes orgânicas que podem ser utilizadas, como glicerol, soro de queijo, borras de vinho branco e milhocina em seu cultivo (MIRZAIE et al., 2015; SALATI et al., 2017).

2.3 Milhocina

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida à evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (FILIPOVIC et al., 2002).

A composição da milhocina é variável (Tabela 1), dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento (AKHTAR et al., 1998). Basicamente, a milhocina é composta por uma mistura de proteína solúvel, aminoácidos, carboidratos, ácidos orgânicos (por exemplo, o ácido láctico), vitaminas e sais minerais. Hull et al. (1996) encontraram uma série de pequenos polipeptídeos presentes na milhocina.

Tabela 1. Composição típica da milhocina (CHIANI et al., 2010)

Propriedades gerais	Valores	Geral	Valores
Proteína	20,5%	Umidade	47,5%
Carboidrato	13-22%	Fibra	1%
Lipídeo	1%	Cinzas	8,8%
Massa seca	52,5%	pH	4-5
Brix	54,5		
Aminoácidos	Valores	Aminoácidos	Valores
Arginina	3,3%	Glicina	5,1%
Isoleucina	3,6%	Metionina	1,9%
Treonina	4%	Leucina	11,3%
Triptofano	0,2%	Lisina	2,5%
Tirosina	5,8%	Histidina	2,8%
Cisteína	1,9%	Valina	3,4%
Fenilalanina	4,4%		
Minerais	Valores	Minerais	Valores
Cálcio	1%	Potássio	4,5%
Magnésio	1,5%	Sódio	0,2%
Fósforo	3,3%	Cloro	0,18%
Enxofre	0,58%	Ferro	0,10%
Vitaminas	Valores	Vitaminas	Valores
Tiamina (B1)	1 mg/Kg	Ácido pantoténico (B5)	8 mg/Kg
Riboflavina (B2)	5 mg/Kg	Piridoxina (B6)	2 mg/Kg
Niacina (B3)	30 mg/Kg		

A utilização do subproduto milhocina no cultivo de micro-organismos e produção de biocompostos já vem sendo descrita na literatura, e se faz fonte atrativa nas aplicações biotecnológicas de micro-organismos fotossintetizantes devido à sua composição (MAHBOOB et al., 2012; MIRZAIE et al., 2015).

2.4 Aplicações Biotecnológicas dos Micro-organismos Fotosintetizantes

Os micro-organismos fotossintéticos são constituídos por diversos compostos, tais como carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas. Esses metabólitos podem ser utilizados como suplemento humano e animal, combustíveis, produtos químicos finos e produtos farmacêuticos. A biomassa de algas e os compostos derivados de algas tem uma vasta diversidade de aplicações, como alimentos para animais e aquicultura, produtos de nutrição e saúde humana (ELALLA e SHALABY, 2009).

Há relatos da utilização de compostos orgânicos no cultivo de *C. vulgaris* destinados a produção de proteínas (SALATI et al., 2017), assim como o uso de ácido graxos extraídos da microalga *D. salina* com potencial antimicrobiano frente a diversos patógenos clínicos (CAKMAK et al., 2014). O uso de suplemento alimentar de *Chlorella* para aumentar a capacidade aeróbica em indivíduos jovens (UMEMOTO e OTSUKI, 2014) e uso da cianofíceia *Anabaena* na produção de inibidores da enzima conversora da angiotensina e enzima fibrinolítica (BANERJEE et al., 2013; BAGCHI et al., 2015).

A biotecnologia de micro-organismos fotossintetizantes fez grandes avanços e diversas espécies são cultivadas para produção de vários produtos biotecnológicos (SPOLAORE et al. 2006), dentre os quais podemos destacar as proteases fibrinolíticas (SILVA et al., 2018).

2.5 Proteases Fibrinolíticas

Várias terapias com proteases estão atualmente sob investigação clínica, algumas das quais são esperadas para chegar ao mercado ao longo dos anos. A agência de saúde americana, Food and Drug Administration (FDA) já aprovou uma variedade de proteases para o uso em tratamentos tais como desbridamento de feridas (colagenase), trombólise (uroquinase), hemofilia (fator VIIa), sepsia (proteína C ativada) e espasmos musculares (toxina botulínica A e B) (CRAIK et al., 2011; DESAI e HENTZ, 2010).

Proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas. Com base na sua estrutura ou propriedade do sítio ativo, há vários tipos de proteases, tais como, de serina, carboxil, metalo, ácidas, neutras e alcalinas. As proteases são enzimas industrialmente importantes e constituem um quarto da produção de enzima global (KALAIARASI & SUNITHA, 2009), aplicadas no processamento do couro, na produção de detergentes, na indústria de alimentos, farmacêutica e têxtil (DENG et al., 2010; JELLOULI et al., 2009).

A atividade catalítica das proteases faz delas um terapêutico potencial único, permitindo dosagens menores, potencial para inativar numerosas proteínas alvo e maior eficácia. Em combinação, estes efeitos podem conduzir a doses mais baixas e menos frequentes e o mais importante, custos mais baixos.

Agentes trombolíticos, anticoagulantes, antiagregantes e trombolíticos diretos (fibrinolíticos) são utilizados para o tratamento de doenças trombóticas (MACKMAN, 2008). Atualmente, as enzimas fibrinolíticas por via microbiana tem conquistado grande interesse em buscas de novas biomoléculas.

Esses fibrinolíticos são enzimas que hidrolisam a fibrina, o principal componente proteico dos trombos (AHN et al., 2003), desencadeando assim, o processo de fibrinólise. Segundo Cesarman-Maus & Hajjar (2005), a fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina mediada pela plasmina. Este sistema tem por base a ativação de uma pró-enzima, o plasminogênio (PLG), que depois de ativado se transforma em plasmina (PLa), uma proteína com capacidade de degradar a fibrina.

A ativação da coagulação gera trombina, o que resulta na formação do trombo por conversão do fibrinogênio em fibrina e por ativação das plaquetas. Plasmina (EC 3.4.21.7) é a mais importante protease fibrinolítica (Figura 3). Plasminogênio (PLG) é um zimogênio que circula no plasma e pode ser convertido em plasmina pelo ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) bem como pela uroquinase (u-PA). Através de mecanismos de retroalimentação positiva, a plasmina cliva tanto o t-PA quanto o u-PA, transformando-os de uma cadeia simples para duas cadeias ativas de polipeptídios. A fibrina, um importante substrato da plasmina, regula sua própria degradação pela ligação do PLG com o t-PA na sua superfície, assim, localizando e aumentando a geração de plasmina. Embora o t-PA seja um ativador fraco do plasminogênio na ausência de fibrina, a sua eficiência

catalítica para ativação do PLG é reforçada por pelo menos duas ordens de grandeza na presença de fibrina (CESARMAN-MAUS & HAJJAR, 2005).

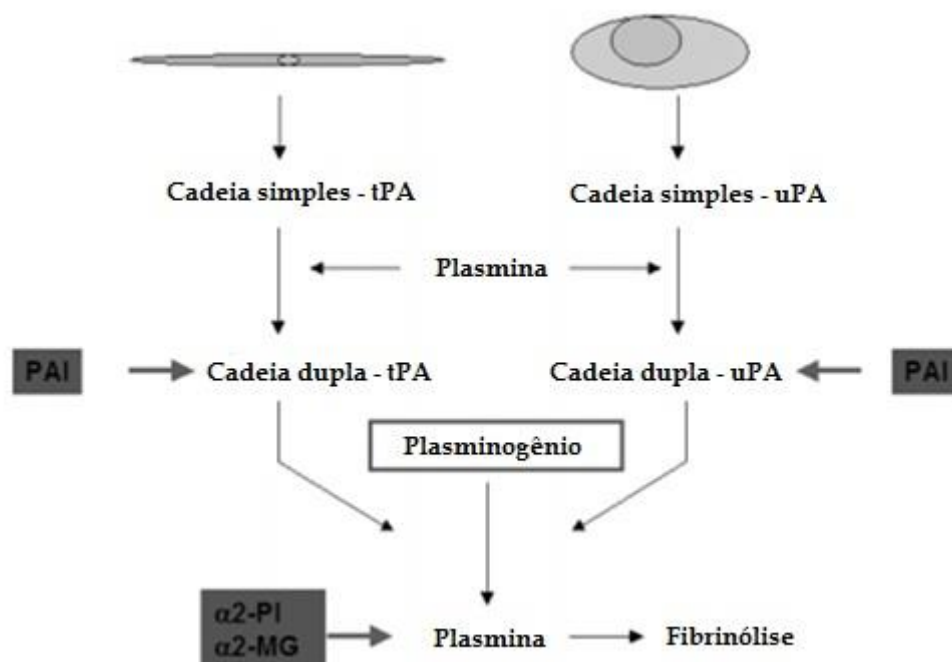


Fig. 3. Visão geral do sistema fibrinolítico. O plasminogênio é convertido em serino protease ativa, plasmina, principalmente através da ação de duas cadeias de ativadores do plasminogênio tissular (tc-tPA) ou duas cadeias de uroquinase (tc-uPA). Estes ativadores são secretados como cadeias simples (sc-tPA e sc-uPA) a partir de células endoteliais e a partir de epitélio renal, monócitos, macrófagos ou células endoteliais respectivamente. Ambos tPA e uPA podem ser inibidos pelo inibidor de ativadores do plasminogênio-1 (PAI), enquanto que a plasmina é inibida pelo seu maior inibidor, inibidor $\alpha 2$ -plasmina ($\alpha 2$ -PI) e em menor grau pela $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -MG). Uma vez que a plasmina é gerada, converte as cadeias simples de tPA e uPA em cadeias duplas. Em seguida, são rapidamente inibidos, a menos que se mantenham ligados a fibrina ou a receptores da superfície celular. Os inibidores estão indicados por caixas escuras (CESARMAN-MAUS & HAJJAR, 2005).

Essas enzimas fibrinolíticas tem sido encontradas em macroalgas do gênero *Codium* e *Costaria* (MATSUBARA et al., 2000; CHOI et al., 2013; KIM et al., 2013) e em diversos organismos fotossintetizantes (Tabela 2), além de micro-organismos como bactérias do gênero *Bacillus*, como a Nattokinase (FUJITA et al., 1993), CK (KIM et al., 1996), Subtilisina DFE (PENG et al., 2003), outras produzidas por bactérias do gênero *Streptomyces* como FP84 (SIMKHADA et al., 2010) e SOT (UESUGI et al., 2011), por fungos, Fu-P (WU et al., 2009) e KSK-3 (SHIRASAKA et al., 2012), além da produzida pela cianobactéria do gênero *Anabaena*, Afp (BANERJEE et al., 2013), abrindo novos

horizontes para a bioprospecção de enzimas fibrinolíticas a partir de micro-organismos fotossintetizantes.

Tabela 2. Propiedades das enzimas fibrinolíticas produzidas a partir de organismos fotossintetizantes

Organismo Enzima	Massa molecular (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade pH	Estabilidade da temperatura (°C)	Comentários	Referências
<i>Codium intricatum</i> / CIP	20	8-9	Não informada	Não informada	Não informada	Serino protease	Matsubara et al., 1998
<i>Codium latum</i> / CLP	23	10	Não informada	Não informada	Não informada	Serino protease	Matsubara et al., 1999
<i>Codium divaricatum</i> / CDP	31	9	Não informada	Não informada	Não informada	Serino protease	Matsubara et al., 2000
<i>Costaria costata</i> / CCP	60,45	6	37	5-7	4-50	Serino protease	Kim et al., 2013
<i>Anabaena fertilissima</i> / Afp	17 e 27	8	40	Não informada	Não informada	Enzima inibida por inibidor de serino, metalo e cisteíno protease	Banerjee et al., 2013

Portanto, a busca por enzimas fibrinolíticas de baixo custo, alto grau de pureza e com elevada especificidade vem sendo continuamente investigada, uma vez que diversos efeitos colaterais, como hemorragia, podem ser causados pelos medicamentos convencionais (estreptoquinase, uroquinase, alteplase).

3 ARTIGO PUBLICADO

In vitro THROMBOLYTIC ACTIVITY OF A PURIFIED FIBRINOLYTIC ENZYME FROM *Chlorella vulgaris*

Publicado na revista “Journal of Chromatography B”

Recebido 24 de janeiro de 2018

Recebido em forma revisada 01 de abril de 2018

Aceitado 23 de abril de 2018

Disponível online 24 de abril de 2018

Fator de Impacto: 2018: 2.441

Fator de impacto de 5 anos: 2.526

Resumo

Uma enzima fibrinolítica foi produzida pela microalga *Chlorella vulgaris* cultivada em condições autotróficas e mixotróficas acrescidas de milhocina, purificadas por um único passo cromatográfico, caracterização bioquímica e atividade trombolítica *in vitro*. A concentração celular máxima ($1637,45 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$) e produtividade ($181,93 \text{ mg L}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) foram obtidas em cultura mixotrófica utilizando 1% de milhocina. A enzima extraída a partir da biomassa microalgal foi purificada por precipitação com acetona e cromatografia de troca aniônica utilizando DEAE Sephadex com rendimento de 2 vezes e recuperação de 4,0%. Após a purificação, a atividade fibrinolítica foi de $1834,6 \text{ U mg}^{-1}$ e $226,86 \text{ mm}^2$ por espectrofotometria e ensaios de placa de fibrina, respectivamente. Os resultados de SDS-PAGE exibiram uma banda proteica de cerca de 45 kDa e a banda fibrinolítica foi detectada por zimografia de fibrina. A atividade enzimática foi aumentada na presença de Fe^{2+} e inibida pelo fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o que sugere ser uma serina protease dependente de metal. O extrato também mostrou uma lise de células vermelhas do sangue <4% e atividade trombolítica *in vitro* de 25,6% em 90 minutos de reação. Estes resultados indicam que a enzima fibrinolítica de *C. vulgaris* pode ter aplicações potenciais na prevenção e tratamento da trombose.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

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

In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*

Páblo Eugênio da Costa e Silva^a, Rafaela Cavalcante de Barros^b,
Wendell Wagner Campos Albuquerque^b, Romero Marcos Pedrosa Brandão^b,
Raquel Pedrosa Bezerra^b, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,b,*}

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes s/n, 50670-901 Recife, PE, Brazil

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Fibrinolytic enzyme
Thrombolytic activity
Corn Steep Liquor
Chlorella vulgaris
Chromatography

ABSTRACT

A fibrinolytic enzyme was produced by microalga *Chlorella vulgaris* cultivated in autotrophic and mixotrophic conditions added corn steep liquor, purified by a single chromatographic step, then biochemical characterization and *in vitro* thrombolytic activity was performed. Maximum cell concentration ($1637.45 \pm 15 \text{ mg L}^{-1}$) and productivity ($181.93 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) was obtained in mixotrophic culture using 1% corn steep liquor. Enzyme-extracted microalgal biomass was purified by acetone precipitation and DEAE Sephadex anion exchange chromatography up to 2 fold with recovery of 4.0%. After purification, fibrinolytic activity was 1834.6 U mg^{-1} and 226.86 mm^2 by spectrophotometry and fibrin plate assays, respectively. SDS-PAGE results exhibited a protein band of about 45 kDa and fibrinolytic band was detected by fibrin zymography. Enzyme activity was enhanced in the presence of Fe^{2+} and inhibited by phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), which suggest it to be a metal-dependent serine protease. The extract also showed a red blood cell lysis < 4% and *in vitro* thrombolytic activity of 25.6% in 90 min of reaction. These results indicate that the fibrinolytic enzyme from *C. vulgaris* may have potential applications in the prevention and treatment of thrombosis.

1. Introduction

Cardiovascular diseases are caused by disorders of heart and blood vessels. Formation of endogenous thrombi in blood vessels is one of the leading causes of death in modern life. According to 2015 World Health Organization (WHO) data, mortality from cardiovascular disease (CVD) is estimated at 17,867,000 deaths (31% of all-cause mortality) [1]. For this, an amount of research has been done in the area of prevention and treatment of these diseases.

Many thrombolytic agents, such as tissue plasminogen activator (TPA), streptokinase and urokinase, used as classical therapy have caused side effects such as hemorrhage, allergic reactions, short half-lives, high cost (US\$ 98.6–1125.87, few milligrams), large therapeutic, allergic reactions and hemorrhagic complications [2–5]. In addition, these enzymes are generally produced recombinantly to improve their pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, however the cost of production still remains very expensive [6]. Consequently, several lines of investigation are currently being pursued to enhance the efficacy and specificity of fibrinolytic therapy. Recently, an investigation was

conducted involving the isolation of fibrinolytic enzyme from natural extracts such as microorganisms, snakes, earthworms, insects, plants, algae and other organisms sources [7,8]. These fibrinolytic proteases used in thrombolytic therapy exhibit high specificity for fibrin, and are relatively inexpensive.

Several nontoxic photosynthetic organisms contain biologically active substances. These extracts have been reported to exert hematological, antiviral, antimicrobial, antioxidant, hypotensive, and hepatoprotective effects [9–14]. Furthermore, some reports have described fibrinolytic activity occurring in some photosynthetic organisms, including cyanobacteria [15,16], microalgae [17] and algae [18]. Although research has classically focused on the therapeutic effects of *C. vulgaris*, little information is available in regard to its fibrinolytic activity. Prior to our report, fibrinolytic enzymes had been identified in the extract of *C. vulgaris* biomass [17]. Therefore, a more in-depth study of the purification, characterization and *in vitro* thrombolytic potential of fibrinolytic enzymes derived from *C. vulgaris* is necessary. The understanding of the properties of the enzyme will open the possibilities of the enzyme to be an alternative for thrombolytic therapy for cardiovascular diseases and increase the economic value of microalgae.

* Corresponding author at: Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil.
E-mail address: anaporto@dmfa.ufpe.br (A.L.F. Porto).

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.04.040>

Received 24 January 2018; Received in revised form 1 April 2018; Accepted 23 April 2018
Available online 24 April 2018

1570-0232/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível realizar a purificação de uma biomolécula com atividade fibrinolítica a partir da microalga *Chlorella vulgaris* utilizando apenas uma etapa cromatográfica (cromatografia de troca iônica). A enzima possui capacidade de degradar diretamente a fibrina e também foi avaliada *in vitro*. Os dados obtidos se mostraram atrativos para futuras aplicações *in vivo* da enzima.

REFERÊNCIAS

- ABE, K., IMAMAKI, A., HIRANO, M. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal Applied Phycology**. v. 14, p. 129-134. 2002.
- ADIVITIYA, DAGAR, V.K., DEVI, N, KHASA, Y.P. High level production of active streptokinase in *Pichia pastoris* fed-batch culture. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 83, p. 50-60. 2016.
- AHN, M.Y., HAHN, B.-S., RYU, K.S., KIM, J.W., KIM, I., KIM, Y.S. Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from the dung beetles, *Catharsius molossus*. **Thrombosis Research**. v. 112, p. 339-347. 2003.
- AISINA, R., MUKHAMETOVA, L., VARFOLOMEYEV, S. Synergistic fibrinolysis: The combined effects of tissue plasminogen activator and recombinant staphylokinase in vitro. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1860, n. 4, p.629-635. 2016.
- AKHTAR, M., SCOTT, G.M., SWANEY, R.E., KIRK, T.K. An overview of biomechanical pulping research. In: RAYMOND A YOUNG, AKHTAR M. Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry. **New York: John Wiley and Sons**. p. 309-339. 1998.
- ALKHAMIS, Y., QIN, J.G. Comparison of pigment and proximate compositions of *Tisochrysis lutea* in phototrophic and mixotrophic cultures. **Journal Applied Phycology**. v. 28, p. 35-42. 2015.
- BAGCHI, S.N., SONDHIA, S., AGRAWAL, M.K., BANERJEE, S. An angiotensin-converting enzyme-inhibitory metabolite with partial structure of microginin in a cyanobacterium *Anabaena fertilissima* CCC597, producing fibrinolytic protease. **Journal Applied Phycology**. v. 28, n. 1, p. 177-180. 2015.
- BEHRENS, P. Photobioreactors and fermentors: the light and dark sides of growing algae. **Algal Culturing Techniques**. p. 189-204. 2005.
- BANERJEE, S., PRASANNA, R., BAGCHI, S.N. Purification and characterization of a fibrino(geno)lytic protease from cultured natural isolate of a cyanobacterium, *Anabaena fertilissima*. **Journal Applied Phycology**. v. 25, p. 1111-1122. 2013.
- BEN-AMOTZ, A., AVRON, M. The biotechnology of cultivating of the halotolerant alga *Dunaliella*. **Tibtech**. v. 8, p. 121–126. 1990.

- BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae - a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 557-577. 2010.
- CAKMAK, Y.S., KAYA, M., ASAN-OZUSAGLAM, M. Biochemical Composition and Bioactivity Screening of Various Extracts From *Dunaliella salina*, a Green Microalga. **EXCLI Journal**. v. 13, p. 679–690. 2014.
- CESARMAN-MAUS, G., HAJJAR, K.A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British Journal of Haematology**. v. 129, p. 307–321. 2005.
- CHEN, C.Y., YEH, K.L., AISYAH, R., LEE, D.J., CHANG, J.S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 71-81. 2011.
- CHEN, F., ZHANG, Y., GUO, S. Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture. **Biotechnology Letters**. v. 18, p. 603-608. 1996.
- CHENG, H.X., TIAN, G.M., LIU, J.Z. Enhancement of biomass productivity and nutrients removal from pretreated piggy wastewater by mixotrophic cultivation of *Desmodesmus* sp CHX1. **Desalin Water Treat.** v. 51, p. 7004-7011. 2013.
- CHIANI, M., AKBARZADEH, A., FARHANGI, A., MEHRABI, M.R. Production of Desferrioxamine B (Desferal) Using Corn Steep Liquor in *Streptomyces pilosus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 13, n. 23, p. 1151-1155. 2010.
- CHOI, J.-H., SAPKOTA, K., PARK, S.-E., KIM, S., KIM, S.-J. Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. **Biochimie**. v. 9, n. 6, p. 1266-1277. 2013.
- CRAIK, C., PAGE, M., MADISON, E. Proteases as therapeutics. **Biochemical Journal**. v. 435, p. 1–17. 2011.
- 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 Microbial and Technology**. v. 47, p. 297–304. 2010.
- DENG, A., WU, J., ZHANG, Y., ZHANG, G., WEN, T. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 18, p.7100-7116. 2010.
- DESAI, S., HENTZ, V. Collagenase *Clostridium histolyticum* for Dupuytren's contracture. **Expert Opinion on Biological Therapy**. v. 10, p. 1395–1404. 2010.

- ELALLA, F.M.A.; SHALABY, E.A. Antioxidant Activity of Extract and Semi-Purified Fractions of Marine Red Macroalga. *Gracilaria verrucosa*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**. v. 3, p. 3179-3185. 2009.
- ENDO, H., SANSAWA, H., NAKAJIMA, K. Studies on *Chlorella regularis*, heterotrophic fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to light intensity and acetate concentration. **Plant and Cell Physiology**. v. 18, p. 199-205. 1997.
- ERIKSEN, N.T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**. v. 30, p. 1525-1536. 2008.
- FABREGAS, J., HERRERO, C. Marine microalgae as a potential source of single cell protein (SCP). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 110–113. 1985.
- FENG, Z., TAN, Q., TANG, J., LI, L., TAO, Y.Y., YANG, Y., LUO, C., FENG, H., ZHU, G., CHEN, Q., CHEN, Z. Intraventricular administration of urokinase as a novel therapeutic approach for communicating hydrocephalus. **Translational Research**. v. 180, p. 77-90. 2017.
- FILIPOVIC, S.S., RISTIC, M.D., SAKAC, M.B. Technology of corn steep application in animal mashes and their quality. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 7, p. 705-710. 2002.
- FRANCAVILLA, M., TROTTA, P., LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. **Bioresource Technology**. v. 101, n. 11, p. 4144-4150. 2010.
- FUJITA, M., NOMURA, K., HONG, K., ITO, Y., ASADA, A., NISHIMURO, S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 197, n. 3, p. 1340–1347. 1993.
- GAO, C.F., ZHAI, Y., DING, Y., WU, Q.Y. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**. v. 87, p. 756–761. 2010.
- GEORGIANNA, D.R., HANNON, M.J., MARCUSCHI, M., WU, S., BAOTCH, K., LEWIS, A.J., HYUN, J., MENDEZ, M., MAYFIELD, S.P. Production of recombinant enzymes in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. **Algal Research**. v. 2, p. 2–9. 2013.
- GRAVERHOLT, O.S., ERIKSEN, N.T. Heterotrophic high-cell-density fed-batch and continuous-flow cultures of *Galdieria sulphuraria* and production of phycocyanin. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 77, p. 69–75. 2007.
- HALL, J., GOLDING, L.A. Standard methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report no. MFE80205. Wellington, New Zealand: NIWA report for the Ministry for the Environment. 1998.

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/strainDetailAction.do?stockNo=NIES-642> (disponível e acessado em 18 de Setembro de 2013).

<http://eol.org/pages/901806/overview> (disponível e acessado em 20 de Março de 2017).

https://www.heart.org/idc/groups/ahamh-public/@wcm/@sop/@smd/documents/downloadable/ucm_480086.pdf (disponível e acessado em 14 de Março de 2014).

http://www.ecimat.org/index.php?view=article&id=151:chlorellavulgaris&option=com_content&Itemid=40&lang=es (disponível e acessado em: 20 de Março de 2017).

HULL, S.R., YANG, B.Y., VENZKE, D., KULHAVY, K., MONTGOMERY, R. Composition of corn steep water during steeping. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, p. 1857-1863. 1996.

JELLOULI, K., BOUGATEF, A., MANNI, L., AGREBI, R., SIALA, R., YOUNES, I., NASRI, M. Molecular and biochemical characterization of an extracellular serine-protease from *Vibrio ertschikovii* J1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 36, n. 7, p. 939-948. 2009

KALAIARASI, K., SUNITHA, PU. Optimization of alkaline protease production from *Pseudomonas fluorescens* isolated from meat waste contaminated soil. **Africa Journal Biotechnology**. V. 8, n. 24, p. 7035-7041. 2009.

KAY, R.A. Microalgae as food and supplement. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 30, p. 555–573. 1991.

KIM, D.-W., SAPKOTA, K., CHOI, J.-H., KIM, Y.-S., KIM, S., KIM, S.-J. Direct acting anti-thrombotic serine protease from brown seaweed *Costaria costata*. **Process Biochemistry**. v. 48, p.340–350. 2013.

KIM, W., CHOI, K., KIM, Y., PARK, H., CHOI, J., LEE, Y., OH, H., KWON, I., LEE, S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 7, p. 1488–2482. 1996

LODI, A., BINAGHI, L., De FAVERI, D., CARVALHO, J.C.M., CONVERTI, A., Del BORGHI, M. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Cyanophyceae) with carbon source pulse feeding. **Annals of Microbiology**. v. 55, p. 181-185. 2005.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. **Rima**. 2007.

MACKMAN, N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**. v. 451, p. 914-918. 2008.

MAHBOOB, S., RALF, A., ASHRAF, M., SULTANA, T., SULTANA, S., JABEEN, F., RAJOKA, M.I. High-density growth and crude protein productivity of a thermotolerant *Chlorella vulgaris*: production kinetics and thermodynamics. **Aquaculture International**. v. 20, p. 455–466. 2012

MATSUBARA, K., SUMI, H., HORI, K., MIYAZAWA, K. Purification and Characterization of Two Fibrinolytic Enzymes from a Marine Green Alga, *Codium intricatum*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**. v. 119B, n. 1, p. 177–181. 1998.

MATSUBARA, K., HORI, K., MATSUURA, Y., MIYAZAWA, K. A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. **Phytochemistry**. v. 52, n. 6, p. 993–999. 1999.

MATSUBARA, K., HORI, K., MATSUURA, Y., MIYAZAWA, K. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**. v. 125, p. 137–143. 2000.

MILKO, E.S. Effect of various environmental factors on pigment production in the alga *Dunaliella salina*. **Mikrobiologiya**. v. 32, p. 299–307. 1963

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

MIRZAEI, M.A.M., KALBASI, M., MOUSAVI, S.M., GHOBADIAN, B. Investigation of Mixotrophic, Heterotrophic and Autotrophic Growth of *Chlorella vulgaris* Under Agricultural Waste Medium. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**. v. 46, n. 2, p. 150-156. 2015.

MURTHY, K.N.C., VANITHA, A., RAJESHA, J., SWAMY, M.M., SOWMYA, P.R., RAVISHANKAR, G.A. *In vivo* antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* – a green microalga. **Life Sciences**. v. 76, p. 1381–1390. 2005.

O'GRADY, J., MORGAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 34, n. 1, p. 121-125. 2010.

PENG, Y., HUANG, Q., ZHANG, R.H., ZHANG, Y.Z. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 134, p. 45–52. 2003.

RICHMOND, A. Handbook of Microalgae Culture. Biotechnology and Applied and Phycology. **Blackwell Publishing**. 2004

SALATI, S., D'IMPORZANO, G., MENIN, B., VERONESI, D., SCAGLIA, B., ABBRUSCATO, P., MARIANI, P., ADANI, F. Mixotrophic cultivation of *Chlorella* for local protein production using agro-food by-products. **Bioresource Technology**. v. 230, p. 82-89. 2017.

SILVA, P.E.C., BARROS, R.C., ALBUQUERQUE, W.W.C., BRADÃO, R.M.P., BEZERRA, R.P., PORTO, A.L.F. *In vitro* thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B**. v. 1092, p. 524-529. 2018

SHIRASAKA, N., NAITOU, N., 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.

UESUGI, Y., USUKI, H., IWABUCHI, M., HATANAKA, T. Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 48, p. 7–12. 2011.

UMEMOTO, S., OTSUKI, T. Chlorella-derived multicomponent supplementation increases aerobic endurance capacity in young individuals. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**. v. 55, n. 2, p. 143-146. 2014.

URRUTIA, I., SERRA, J.L., LLAMA, M.J. Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams. **Enzyme Microbial Technology**. v. 17, p. 200-205. 1995.

WEN, Z.Y., CHEN, F. Production potential of eicosapentaenoic acid by the diatom *Nitzschia laevis*. **Biotechnol Letters**. v. 22, p. 727–733. 2000.

WU, B., WU, L., CHEN, D., YANG, Z., LUO, M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 36, p. 451–459. 2009.

ZHANG, X.L., VAN, S., TYAGI, R.D., SURAMPALLI, R.Y. Biodiesel production from heterotrophic microalgae through transesterification and nanotechnology application in the production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 26, p. 216-223. 2013.

ANEXO A - ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

SILVA, P. E. C.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F. An overview about fibrinolytic enzymes from microorganisms and algae: production and characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences*, v. 4, p. 1-11, 2016.

DE SOUZA, FABIANA AMÉRICA SILVA DANTAS ; SALES, AMANDA EMMANUELLE ; **COSTA E SILVA, PABLO EUGÊNIO** ; BEZERRA, RAQUEL PEDROSA ; DE MEDEIROS E SILVA, GERMANA MICHELLE ; DE ARAÚJO, JANETE MAGALI ; DE CAMPOS TAKAKI, GALBA MARIA ; PORTO, TATIANA SOUZA ; TEIXEIRA, JOSÉ ANTÔNIO COUTO ; PORTO, ANA LÚCIA FIGUEIREDO. Optimization of production, biochemical characterization and *In Vitro* evaluation of the therapeutic potential of fibrinolytic enzymes from a new *Bacillus Amyloliquefaciens*. *Macromolecular Research*, v. 1, p. 1-9, 2016.

SILVA, P. E. C.; SOUSA, F. A. S.; BARROS, R. C.; MARQUES, D. A. V.; PORTO, A. L. F.; BEZERRA, R. P.. Enhanced Production of Fibrinolytic Protease from Microalgae *Chlorella Vulgaris* using Glycerol and Corn Steep Liquor as Nutrient. *Journal of Microbiology and Research*, v. 1(1), p. 9-19, 2017.

ANEXO B - PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO

BEZERRA, RAQUEL PEDROSA; MELO, R. G.; CALACA, P. R. A.; **SILVA, P. E. C.**. Participação em banca de Emanuelle Martins de Aguiar. Atividade antimicrobiana dos extratos celulares de *Dunaliella tertiolecta* frente a isolados de mastite bovina. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BEZERRA, R. P.; **SILVA, P. E. C.**; NASCIMENTO, T. P.. Participação em banca de Túlio Alexandre Freire da Silva. Produção, purificação e parcial caracterização de enzimas fibrinolíticas a partir de *Dunaliella tertiolecta*. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BEZERRA, R. P.; **SILVA, P. E. C.**; SOARES, M. T. C. V.; HERCULANO, P. N.. Participação em banca de Priscila Danielly Santos de Barros. Produção de enzimas fibrinolíticas a partir do extrato celular de *Arthrospira platensis* utilizando a milhocina, um

subproduto agroindustrial. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SILVA, P. E. C.; BEZERRA, R. P.; NASCIMENTO, T. P.; MELO, R. G.; CALACA, P. R. A.. Participação em banca de Ariadne Tennylye Vieira de Souza Magalhães. Produção e purificação parcial de enzimas fibrinolíticas a partir da microalga *Scenedesmus* sp.. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

BEZERRA, R. P.; CALACA, P. R. A.; **SILVA, P. E. C.**. Participação em banca de Alessandra Frazão de Andrade. Atividade cicatrizante in vivo de extratos de *Chlorella vulgaris* cultivada em subproduto agroindustrial. 2017.

ANEXO C - TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS

SILVA, P. E. C.; SOUZA, F. A. S. D. DE ; MARQUES, D. A. V. ; PORTO, A. L. F. ; BEZERRA, R. P. . 1 EVALUATION OF *Chlorella vulgaris* PRODUCTION AS FUNCTION OF GLYCEROL AND CORN STEEP LIQUOR CONCENTRATION USING FACTORIAL DESIGN. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2015, Florianópolis. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo: Editora Edgard Blücher. v. 1. p. 873.

ANEXO D - APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSO

MELO, R. G. ; SILVA, M. F. ; **SILVA, P. E. C.** ; MARQUES, D. A. V. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. . Utilização de resíduo agroindustrial como substrato para produção de microalga *Chlorella vulgaris*. 2014.

SILVA, P. E. C.; SOUSA, F. A. S. ; MARQUES, D. A. V. ; PORTO, A. L. F. ; BEZERRA, R. P. . Evaluation of *Chlorella vulgaris* growth as function of glycerol and corn steep liquor concentration using factorial design. 2014.

SILVA, P. E. C.; SOUZA, A. T. V. ; MELO, R. G. ; BARROS, R. C. ; SILVA, T. A. F. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. . Utilização de resíduo agroindustrial para produção de proteases a partir de *Dunaliella tertiolecta*. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).

SILVA, P. E. C.; RAMOS, B. A. ; LIMA, M. S. F. ; MELO, R. G. ; SILVA, M. F. ; SOUZA, A. T. V. ; SOUZA, K. M. S. ; ANDRADE, A. F. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. . EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND FIBRINOLYTIC POTENTIAL FROM FRUIT EXTRACTS OF *Momordica* sp.. 2015.

SOUZA, A. T. V. ; **SILVA, P. E. C.** ; MELO, R. G. ; SILVA, M. F. ; AGUIAR, E. M. ; ANDRADE, A. F. ; MARQUES, D. A. V. ; HERCULANO, P. N. ; PORTO, A. L. F. ; BEZERRA, R. P. . PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DA MICROALGA *Scenedesmus* sp. CULTIVADA COM ADIÇÃO DE RESÍDUO AGROINDUSTRIAL MILHOCINA. 2015.

AGUIAR, E. M. ; **SILVA, P. E. C.** ; MELO, R. G. ; SILVA, M. F. ; SOUZA, A. T. V. ; BARROS, P. D. S. ; SILVA, T. A. F. ; MARQUES, D. A. V. ; HERCULANO, P. N. ; PORTO, A. L. F. ; BEZERRA, R. P. . UTILIZAÇÃO DO RESÍDUO AGROINDUSTRIAL SORO DE QUEIJO COMO FONTE INDUTORA NA PRODUÇÃO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp.. 2015.

SILVA, T. A. F. ; **SILVA, P. E. C.** ; BEZERRA, R. P. ; MARQUES, D. A. V. ; HERCULANO, P. N. ; PORTO, A. L. F. . PRODUÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS A PARTIR DA MICROALGA *Dunaliella tertiolecta* UTILIZANDO A MILHOCINA, UM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL. 2015.

MELO, R. G. ; **SILVA, P. E. C.** ; BEZERRA, R. P. ; MARQUES, D. A. V. ; PORTO, A. L. F. . BIOMASS PRODUCTION OPTIMIZATION OF MICROALGAE *Chlorella vulgaris* USING CHEESE WHEY AS SUBSTRATE. 2015.

SILVA, P. E. C.; MELO, R. G. ; SILVA, T. A. F. ; BARROS, P. D. S. ; SOUZA, A. T. V. ; ANDRADE, A. F. ; MARQUES, D. A. V. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. . INCREASED PRODUCTION OF FIBRINOLYTIC ENZYMES FROM MICROALGAE *Chlorella vulgaris* USING CORN STEEP LIQUOR AGROINDUSTRIAL WASTE. 2015.

ANDRADE, A. F. ; MELO, R. G. ; **SILVA, P. E. C.** ; BEZERRA, R. P. ; MARQUES, D. A. V. ; PORTO, A. L. F. ; HERCULANO, P. N. . Use of algae and microalgae for wound healing: a short review. 2015.

SOUZA, A. T. V. ; **SILVA, P. E. C.** ; PORTO, A. L. F. ; BEZERRA, R. P. . PRECIPITATION FIBRINOLYTIC ENZYMES DERIVED FROM MICROALGAE *Scenedesmus* sp.. 2016.

SILVA, P. E. C.; SILVA, M. F. ; MELO, R. G. ; BARROS, P. D. S. ; MARQUES, D. A. V. ; HERCULANO, P. N. ; BEZERRA, R. P. ; PORTO, A. L. F. . Corn steep liquor as alternative to production of *Arthrospira (Spirulina) platensis* biomass. 2016.