UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI

PRISCILA DANIELLY SANTOS DE BARROS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS DE *Arthrospira platensis*

Recife

2018

PRISCILA DANIELLY SANTOS DE BARROS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS DE *Arthrospira platensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto
Coorientadora: Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra

Recife

2018

Catalogação na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Barros, Priscila Danielly Santos de
Purificação e caracterização de enzimas fibrinolíticas obtidas de *Arthrospira platensis* / Priscila Danielly Santos de Barros. - 2018

57 f. : il.

Orientadora: Prof. Drª. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Coorientadora: Profª. Raquel Pedrosa Bezerra.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplica à Saúde, Recife, 2018.
Inclui referências.

1. . Enzimas. 2. Enzimas microbianas. 3. Sistema cardiovascular – Doenças. 4. Trombose. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (Orientadora). II. Bezerra, Raquel Pedrosa (Coorientadora). III. Título.

572.7 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2018 - 217

PRISCILA DANIELLY SANTOS DE BARROS

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS DE *Arthrospira platensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 27/02/2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Raquel Predrosa Bezerra / UFRPE

_____

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa / UFRPE

_____

Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques / UPE

Aos meus familiares e amigos. Especialmente, José Cristiano Santana (*in memoriam*), por ter deixado sua marca de amor, carinho e simplicidade para sempre no coração de quem teve a honra de conviver e conhecer um ser tão especial,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu chegar até os dias atuais com vida e saúde, sempre me amparando em seus braços e, quando necessário, me pegando no colo e mostrando o caminho certo a seguir.

A cada um de meus familiares, pois com suas individualidades contribuíram para a conclusão desta fase em minha vida. Especialmente minha mãe com sua paciência e minha irmã com seus conselhos.

Aos amigos de infância, Adrielly, Karina, Kelly, Ramon e Sabrina. Que vocês possam sempre estar ao meu lado e que a amizade iniciada há tempos perdure durante toda a vida de cada um de nós.

Aos amigos feitos na graduação, Elaine, José, Ketyline, Lais e Vivianne, meu muito obrigada pelo ombro amigo nos momentos de angústia e pelos muitos sorrisos nos momentos de alegria.

Ao meu amado Eternal. Diego, Ewerton, Lucas, Raionir e Vivianne, obrigada por trazerem tanta alegria e amor aos meus dias.

Às minhas “falsianes”, Araísa, Priscila e Viviane, e Guilherme Antônio. Cada risada ao lado de vocês é singular e isso faz o meu coração saltar em gratidão por tudo.

Aos companheiros de turma, que tornaram essa jornada tão leve, crítica e engraçada desde o primeiro momento. Aline, Ana, André, Anthony, Geilza, Mirella e Wilson, amo vocês.

Aos amigos feitos no SENAC, Elaine, Heva, Jonas, Thaís e Wlly. Vocês se tornam especiais para mim a cada novo dia e serei sempre grata pelo nosso encontro.

À minha orientadora, Professora Ana, por todos os ensinamentos e minha co-orientadora Professora Raquel, por toda paciência, carinho, amizade, dedicação e por ser meu maior exemplo profissional.

Aos professores do LABTECBIO, em especial Taciana, por ter permitido que eu ingressasse na ciência, e Romero, por ter estado lado-a-lado nos experimentos e toda dedicação a este trabalho. Daniela e Polyanna, minha gratidão também é vossa.

Aos amigos do CENAPESQ, LABTECBIO e LIKA. Especialmente a Thiago Pajeú, que tanto me ensinou acerca de toda a metodologia que envolveu esse trabalho, e tia Edna, por todo carinho.

Agradeço também aqueles que me auxiliaram nos momentos em que mais precisei e sempre me forneceram apoio, como meu amigo Cristiano (*in memoriam*), Nelson, Dija, Niédja, Larissa e Calisto. Bem como à todos os meus irmãos em Cristo.

E por fim, a todos que não foram mencionados devido ao esquecimento momentâneo, mas de certa forma contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e construção da pessoa que sou hoje.

RESUMO

Uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo são as doenças cardiovasculares (DCV) que estão intimamente associadas com a formação desordenada de coágulos sanguíneos. A terapia fibrinolítica é um tratamento padrão para estas desordens, entretanto as enzimas fibrinolíticas atualmente utilizadas possuem efeitos colaterais indesejáveis. Neste sentido, a busca por novas enzimas fibrinolíticas mais seguras e com menos efeitos colaterais têm recebido atenção. Estudos demonstraram a utilização de microrganismos fotossintetizantes para produção de enzimas fibrinolíticas. Estes microrganismos são importantes fontes de substâncias ativas para o tratamento de várias doenças, incluindo *Arthrospira platensis* que têm sido amplamente utilizada na aplicação de cosméticos e produtos farmacêuticos. À vista disso, este trabalho teve como finalidade purificar e caracterizar proteases fibrinolíticas produzidas pela cianobactéria, *Arthrospira platensis*. O microrganismo foi cultivado em meio Schlösser sem nitrato de sódio ($NaNO_3$) e suplementado com 0,2% de milhocina com uma concentração celular inicial de 50 mg/L, 30 ± 2 ºC e 45 ± 5 µmol de fótons m^{-2} s^{-1}. A extração da enzima fibrinolítica foi realizada por homogeneização de 50 mg/mL da biomassa liofilizada em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, durante 30 minutos à temperatura ambiente (30 ± 2 °C). A proteína foi precipitada utilizando 70% (m/v) de sulfato de amônio e purificada utilizando dois passos cromatográficos, cromatografia de troca iônica (DEAE-Shephadex) e gel filtração (Superdex 75). A enzima purificada foi então utilizada para avaliação da sua massa molecular por métodos eletroforéticos, caracterização bioquímica quanto a temperatura e ao pH ótimos, estabilidade enzimática à temperatura e ao pH, avaliação do efeito de íons e surfactantes na atividade fibrinolítca e classificação quanto ao tipo de enzima proteolítica. A enzima fibrinolítica purificada apresentou aumento de 32,72 vezes no fator de purificação e recuperação de 28,85% em relação às proteínas do extrato bruto inicial, além de massa molar equivalente a 72,6 kDa e atividade fibrinolítica específica de 7988,34 U/mg. Esta exibiu uma temperatura ótima de 40 ºC e foi estável nesta temperatura por 150 minutos e pH ótimo de 6,0, e maior estabilidade no pH 7,0, no qual manteve sua atividade por 24 horas. A enzima mostrou aumento da atividade específica na presença de íons (Fe^{2+}, Zn^{2+} K^{+}) e surfactantes (Triton

X-100), tendo a atividade enzimática completamente inibida na presença de PMSF, indicando ser uma serino protease. O zimograma utilizando fibrina como substrato específico evidenciou que a enzima fibrinolítica estudada atua de forma semelhante a plasmina, apresentando especificidade pela fibrina. Portanto, esta enzima fibrinolítica (72,6 kDa) representa um possível agente terapêutico para utilização no tratamento de doenças trombolíticas como infarto do miocárdio, doenças cardíacas isquêmicas, trombose venosa profunda e tromboembolismo venoso.

Palavras-chave: Microrganismos fotossintéticos. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis.* Serino protease. Trombose. Fibrinólise.

ABSTRACT

One of leading causes of morbidity and mortality worldwide is cardiovascular disease (CVD), which is closely associated with disordered blood clot formation. Fibrinolytic therapy is a standard approach for the treatment of these disorders, however the fibrinolytic enzymes currently used have undesirable side effects. In this sense, the search for new fibrinolytic fibrinolytic enzymes safer and with fewer side effects have received attention. Studies have demonstrated the use of photosynthetic microorganisms for the production of fibrinolytic enzymes. These microorganisms are important sources of active substances for the treatment of various diseases, including *Arthrospira platensis* which have been widely used in the application of cosmetics and pharmaceuticals. Therefore, this work aimed to purify and characterize fibrinolytic proteases produced by a cyanobacteria species, *Arthrospira platensis*. The microorganism was grown in Schlösser medium without sodium nitrate ($NaNO_3$) and supplemented with 0.2% corn steep liquor at an initial cell concentration of 50mg/L, 30 ± 2 ºC and 45 ± 5 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Extraction of the fibrinolytic enzyme was carried by homogenization of 50 mg/mL lyophilized biomass in 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0, during 30 minutes at room temperature (30 ± 2 °C). The protein was precipitated using 70% (w/v) ammonium sulfate and purified using two chromatographic steps, ion exchange chromatography (DEAE-Shephadex) and gel filtration (Superdex 75). The purified enzyme was then used for evaluation of the molecular weight by electrophoretic methods, biochemical characterization of optimum temperature and pH, enzymatic stability at temperature and pH, evaluation of the effect of ions and surfactants on fibrinolytic activity and classification as to the type of proteolytic enzyme. Purified fibrinolytic enzyme presented a 32.72 fold increase in the purification factor and 28.85% recovery in relation to the proteins of the crude extract, in addition to a molecular weight equivalent to 72.6 kDa and specific fibrinolytic activity of 7988.34 U/mg. It exhibited an optimum temperature of 40 ° C and was stable at this temperature for 150 minutes and optimum pH of 6.0, and greater stability at pH 7.0, in which it maintained its activity for 24 hours. Enzyme showed increased activity in the presence of ions (Fe^{2+}, Zn^{2+} K^{+}) and surfactants (Triton X-100), and the enzymatic activity was completely inhibited in the presence of PMSF, indicating to be a serine protease.

The zymogram using fibrin as a specific substrate showed that the fibrinolytic enzyme studied acts plasmin-like protein, presenting fibrin specificity. Therefore, this fibrinolytic enzyme (72.6 kDa) represent a possible therapeutic agent for use in the treatment of thrombolytic diseases such as myocardial infarction, ischemic heart disease, deep vein thrombosis and venous thromboembolism.

Keywords: Photosynthetic microorganisms. *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Serine protease. Thrombosis. Fibrinolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo esquemático das etapas homeostáticas de coagulação sanguínea e fibrinólise.....18

Figura 2 - *Arthrospira platensis*.....22

Figura 3 - Perfis de eluição da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis* em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex).....35

Figura 4 - Perfis de eluição da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis* em cromatografia de gel filtração (Superdex 75).....35

Figura 5 - Zimograma de fibrina (12%) da enzima fibrinolica purificada por cromatografia em gel de exclusão (Superdex 75).....37

Figura 6 - pH ótimo da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis*.....38

Figura 7 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* após 120 minutos.....38

Figura 8 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* após 24 horas.....39

Figura 9 - Temperatura ótima da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis*.....40

Figura 10 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* a 30, 40 e 50°C. 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas utilizadas no processo de purificação de enzimas fibrinolíticas.....25

Tabela 2 - Características bioquímicas de enzimas fibrinolíticas.....28

Tabela 3 - Etapas de purificação da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*.....36

Tabela 4 - Efeito de íons metálicos na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*.....42

Tabela 5 - Efeito de inibidores na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis.*.....43

Tabela 6 - Efeito de surfactantes na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis.*.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASM - American Society for Microbiology
AVC - Acidente Vascular Cerebral
BCA - Ácido Bicinconínico
CM - Carboximetilo
DCBV - Doenças Cerebrovasculares
DCV - Doenças cardiovasculares
DEAE - Dietilaminoetilo
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA - U.S. Food and Drug Administration
HBPM - Heparina de baixo peso molecular
HNF - Heparina não fracionada
IAM - Infarto Agudo do Miocárdio
kDa - Kilodalton
OMS - Organização Mundial de Saúde
OutrasCirc - Outras Doenças Circulatórias
PAI-1 - Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PLG - Plasminogênio
PMSF - Fluoreto de metilfenilsulfonilo
SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SUS - Sistema Único de Saúde
TNK - Tenecteplase
t-PA - Ativador tecidual do plasminogênio
TVP - Trombose Venosa Profunda
u–PA - Uroquinase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA DO SISTEMA VASCULAR **18**
2.2 FIBRINÓLISE COMO TRATAMENTO DA TROMBOSE E DOENÇAS DO SISTEMA CARDIOCIRCULATÓRIO **19**
2.3 AGENTES FIBRINOLÍTICOS 20
2.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS 22
2.5 *Arthrospira platensis* 23
2.6 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS 24
2.7 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS 27
3 OBJETIVOS 31
3.1 OBJETIVO GERAL 31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 31
4 MATERIAIS E MÉTODOS 32
4.1 MEIO DE CULTURA 32
4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO 32
4.3 EXTRATO ENZIMÁTICO 32
4.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA FIBRINOLÍTICA 32
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA 33
4.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS 33
4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA FIBRINOLÍTICA 33
4.7.1 Efeito do pH e Temperatura na Estabilidade da Protease Fibrinolítica 33
4.7.2 Efeito de Íons Metálicos na Atividade Enzimática 34
4.7.3 Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática 34
4.7.4 Efeito de Surfactantes na Atividade Enzimática 34
4.8 SDS – ZIMOGRAFIA DE FIBRINA 34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 PURIFICAÇÃO E ZIMOGRAMA DE FIBRINA 35
5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA E ESTABILIDADE 38
5.3 EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA 42
5.4 EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA 43
5.5 EFEITO DE SURFACTANTES NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA 44
6 CONCLUSÃO 46
REFERÊNCIAS 47

1 INTRODUÇÃO

A trombose ocorre quando há formação desordenada de coágulos sanguíneos e desregulação na hidrólise da fibrina presente nestes coágulos por redução do teor sanguíneo de plasmina (CHOI *et al*., 2011). Esta tendência trombogênica se relaciona com doenças cardiovasculares (DCV) e pode resultar em graves complicações clínicas como infarto do miocárdio, doenças cardíacas isquêmicas, trombose venosa profunda e tromboembolismo venoso. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 31% de todas as mortes em nível global sejam decorrentes de doenças cardiovasculares (WHO, 2017). No Brasil, foram mais de 349 mil óbitos por DCV em 2016 (SBC, 2018).

Devido ao seu efeito direto na degradação dos coágulos de fibrina, a terapia fibrinolítica é um tratamento padrão para doenças cardiovasculares na fase aguda, sendo inclusive uma técnica adotada pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Há vários agentes fibrinolíticos utilizados na clínica, sendo as formas farmacológicas mais ativas e disponíveis no mercado a estreptoquinase, a uroquinase (u–PA) e o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA) (VAIDYA *et al.,* 2011; NAVEENA *et al.,* 2012ª).

Apesar de possuírem uso bastante disseminado, esses agentes fibrinolíticos possuem efeitos colaterais indesejáveis, como complicações hemorrágicas gastrointestinais, reações alérgicas, meia-vida curta, baixa especificidade pela fibrina e elevado custo de produção (KIM *et al.*, 2011; HUANG *et al*., 2013; ZHANG *et al*., 2013). Esses fatores incentivaram pesquisas por novas enzimas fibrinolíticas mais seguras, econômicas, com menos efeitos colaterais e maior especificidade, atuando de forma semelhante a plasmina (KIM *et al*., 2015; NAVEENA *et al*., 2012a; BI *et al*., 2011; CHITTE *et al*, 2011).

Há uma vasta diversidade de organismos produtores de enzimas fibrinolíticas. Contudo, maior efetividade têm sido encontrada em enzimas fibrinolíticas oriundas de microrganismos, tais como fungos (LU *et al.*, 2010; SHIRASAKA *et al.*, 2012) e bactérias isolados de alimentos fermentados tradicionais orientais (SUMI *et al.*, 2004; KIM *et al.*,1996; WANG *et al.*, 2006; CHANG *et al.*, 2012) e alimentos funcionais (DEEPAK *et al.*, 2010).

Apesar de apresentarem grande diversidade química e vantagens em comparação aos demais microrganismos na produção de bioativos, como por exemplo o baixo custo de produção (BRASIL *et al*., 2017), há poucos relatos a respeito da obtenção de enzimas fibrinolíticas por microrganismos fotossintetizantes (BANERJEE *et al.,* 2013; BAGCHI *et al.,* 2016, SILVA *et al.,* 2017). *Arthrospira platensis* é uma cianobactéria utilizada como suplemento nutricional para humanos e animais, e há vários estudos na aplicação de cosméticos e produtos farmacêuticos (MOSULISHVILI *et al*., 2002; UNGSETHAPHAND *et al.*, 2010; CASAZZA *et al*., 2015; WANG e ZHANG, 2016). Embora muitas enzimas fibrinolíticas de diferentes microrganismos tenham sido produzidas, purificadas e caracterizadas, não há relatos de enzimas fibrinolíticas do gênero *Arthrospira.*

Enzimas fibrinolíticas extraídas de microrganismos são produtos biológicos que serão destinados a indústria farmacêutica, dessa forma requerem alto grau de pureza e conhecimento de suas propriedades bioquímicas. Neste sentido, a busca por novas estratégias para a purificação de proteases com atividade fibrinolítica e posterior determinação de suas características bioquímicas se faz necessária. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo purificar e caracterizar proteases fibrinolíticas produzidas pela cianobactéria *A. platensis*, visando a produção de baixo custo de uma molécula de alto valor agregado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

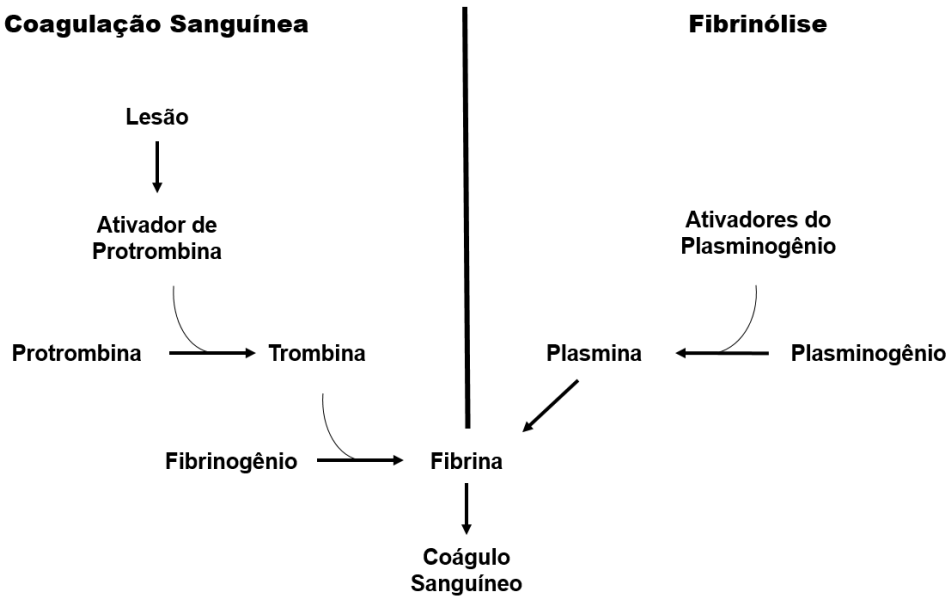
2.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA DO SISTEMA VASCULAR

O termo homeostasia é usado para definir a manutenção de condições quase constantes no meio corporal interno, ou seja, é o conjunto de ações fisiológicas necessárias à condição de relativa estabilidade, sem a qual não há funcionamento adequado do organismo. Quando um vaso sanguíneo sofre injúria, a homeostasia é mantida por meio de vários mecanismos distintos, dentre os quais se destacam a coagulação sanguínea, a formação de tampão plaquetário e o espasmo vascular, além do eventual crescimento de tecido fibroso para vedar o orifício no vaso de maneira permanente (GUYTON e HALL, 2017).

A formação dos coágulos é um fator de proteção empregado na contenção de sangramentos excessivos de feridas e lesões. O desenvolvimento destes coágulos ocorre, de forma sucinta, em três etapas essenciais: primeiramente, um complexo de substâncias, denominado ativador de protrombina, é formado em resposta à ruptura do vaso; posteriormente, o ativador da protrombina catalisa a conversão da protrombina em trombina; e, por fim, a trombina atua na conversão do fibrinogênio em filamentos de fibrina, que envolvem as plaquetas, eritrócitos e plasma, formando o coágulo sanguíneo (GUYTON e HALL, 2017) (Figura 1).

A remoção de fibrina e coágulos sanguíneos, por sua vez, fica a cargo do sistema fibrinolítico. A degradação da fibrina resulta da ação proteolítica da plasmina que existe no organismo sob a forma de uma pró-enzima inativa, denominada plasminogênio (PLG). Por ação de diversos ativadores ocorre modificações estruturais na molécula de plasminogênio acarretando na sua conversão em plasmina, cuja ação é hidrolisar o substrato da fibrina (CESARMAN-MAUS e HAJJAR, 2005; BANERJEE *et al.*, 2004; DRAG e SALVESEN, 2010; STIE e FOX, 2012) (Figura 1).

Figura 1 - Resumo esquemático das etapas homeostáticas de coagulação sanguínea e fibrinólise



Fonte: Acervo pessoal da autora.

2.2 FIBRINÓLISE COMO TRATAMENTO DA TROMBOSE E DOENÇAS DO SISTEMA CARDIOCIRCULATÓRIO

Coagulação e fibrinólise são mecanismos distintos que coexistem e se desenvolvem simultaneamente proporcionando um equilíbrio dinâmico contínuo entre ambos. Desequilíbrios eventuais podem acarretar em tendência hemorrágica quando há predominância da fibrinólise e tendência trombogênica quando predomina a coagulação (LANGER e WOLOSKER, 2006).

A trombose é ocasionada pela formação desordenada de coágulos sanguíneos e ocorre quando a fibrina não é hidrolisada em casos de desequilíbrio do sistema biológico por redução do teor sanguíneo de plasmina (CHOI *et al*., 2011). Este acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos pode acarretar na obstrução do fluxo sanguíneo e está relacionado a doenças cardiovasculares (DCV), resultando em complicações clínicas graves como infarto do miocárdio, doenças cardíacas isquêmicas, trombose venosa profunda e tromboembolismo venoso. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 17,5 milhões de pessoas

morrem devido a doenças cardiovasculares a cada ano, o que representa 31% de todas as mortes em nível global (WHO, 2017).

Segundo a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), no Brasil, apenas no ano de 2014, foram registrados 605,1 óbitos para cada 100 mil habitantes motivados por causas circulatórias. Deste total, 93,8 falecimentos foram decorrentes de Doenças Cerebrovasculares (DCBV) - incluindo Acidente Vascular Cerebral e Outras Doenças Circulatórias (OutrasCirc). Estatísticas brasileiras estimam 349.938 mortes por DCV só em 2016, das quais Acidente Vascular Cerebral (AVC) e Infarto do miocárdio representam mais de 17% das causalidades (SBC, 2018). Sendo o AVC a causa mais frequente de óbito na população adulta (10% dos óbitos) e responsável pelo diagnóstico de 10% das internações hospitalares públicas. O Brasil é o país com quarto maior índice de mortalidade por AVC da América Latina e Caribe (BRASIL, 2017).

Devido ao seu efeito direto na degradação dos coágulos de fibrina, agentes fibrinolíticos têm sido extensivamente utilizados no tratamento terapêutico da trombose e suas complicações. Algumas destas enzimas fibrinolíticas são utilizadas para tratamentos específicos e estão atualmente registradas na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, portanto, disponíveis para utilização e comercialização no Brasil (BRASIL, 2014).

A fibrinólise é uma técnica adotada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), conforme preconizam os Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas para o tratamento de AVC isquêmico agudo e Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). Nesta padronização do cuidado e tratamento são utilizadas enzimas fibrinolíticas como Alteplase e Tenecteplase (TNK), com doses que chegam a custar mais de R$ 2.200,00 aos cofres públicos nacionais (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012).

2.3 AGENTES FIBRINOLÍTICOS

O tratamento padrão da Trombose Venosa Profunda (TVP) consiste na utilização de heparina não fracionada (HNF) ou heparina de baixo peso molecular (HBPM), seguido de varfarina (antagonista da vitamina K, AVK) em longo prazo (YOSHIDA, 2016) e, em casos mais graves e extensos, há a opção terapêutica da fibrinólise. Watson *et al.* (2014) demonstrou que 48,2% dos pacientes tratados com

agentes fibrinolíticos apresentaram coágulos completamente degradados utilizando ativadores de plasminogênio ou enzimas fibrinolíticas, mostrando maior eficiência quando comparados aos 27,2% dos casos tratados de maneira conservadora. Esta última intervenção terapêutica está relacionada com complicações significativamente mais frequentes, tais como: embolia pulmonar, hemorragia intracraniana e hematomas.

Por ser uma forma rápida para conter o trombo, a terapia fibrinolítica é uma abordagem padrão para o tratamento de doenças cardiovasculares na fase aguda. Uma variedade de agentes fibrinolíticos são utilizados na clínica, sendo as formas farmacológicas mais ativas e disponíveis no mercado a estreptoquinase, a uroquinase (u–PA) e o ativador tecidual do plasminogênio (t-PA). Estes agentes são classificados em dois tipos: ativadores de plasminogênio (u-PA, t-PA e estreptoquinase), que ativam a plasmina por meio da influência direta ou indireta sobre modificações estruturais no plasminogênio; e as proteínas semelhantes a plasmina (nattoquinase e lumbroquinase), que degradam diretamente a fibrina (VAIDYA *et al.,* 2011; NAVEENA *et al.,* 2012a; CHUNG *et al.*, 2010).

Apesar do seu uso comum, agentes fibrinolíticos normalmente possuem efeitos colaterais indesejáveis, como complicações hemorrágicas gastrointestinais, reações alérgicas, meia-vida curta, baixa especificidade pela fibrina e elevado custo de produção (KIM *et al.,* 2011; HUANG *et al.,* 2013; ZHANG *et al.,* 2013). Desta forma, a pesquisa por enzimas fibrinolíticas mais seguras, econômicas e que causem menos efeitos colaterais a partir de uma diversidade de fontes estão em andamento nas últimas décadas (KIM *et al.*, 2015; NAVEENA *et al.*, 2012a; BI *et al.*, 2011). O maior interesse é a prospecção de enzimas fibrinolíticas específicas que atuem de forma semelhante à plasmina (CHITTE e DESHMUKH, 2011).

Além da especificidade pela fibrina, existem mais propriedades que os agentes trombolíticos promissores devem apresentar para utilização na terapêutica: reperfusão rápida, baixa incidência de sangramento sistêmico, baixa incidência de hemorragia intracraniana, resistência ao Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), baixa taxa de reoclusão, não apresentar efeito na pressão arterial, não possuir antigenicidade e menor custo de produção (OLIVEIRA, 2001).

2.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

Diversos são os organismos produtores de enzimas fibrinolíticas identificados e estudados, incluindo insetos (AHN *et al*, 2003), poliquetas (DENG *et al.*, 2010), veneno de cobra (DE-SIMONE *et al.*, 2005) e cogumelos comestíveis ou medicinais (LEE *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2007; CHA *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2011). Grande eficácia, no entanto, têm sido encontrada em enzimas fibrinolíticas produzidas por microrganismos isolados de alimentos fermentados tradicionais orientais - “Natto” japonês (SUMI *et al.*, 2004), “Chunkook-jang” coreano (KIM *et al.*, 1996) e “douch” chinês (WANG *et al.*, 2006), bem como também a partir de microrganismos isolados de alimentos funcionais (DEEPAK *et al.*, 2010). Outras fontes de enzimas fibrinolíticas estudadas nos últimos anos foram extraídas de bactérias dos gêneros *Bacillus* (CHANG *et al.*, 2012) e *Streptomyces* (MEDEIROS E SILVA *et al.*, 2013) e fungos (LU *et al.*, 2010; SHIRASAKA *et al.*, 2012).

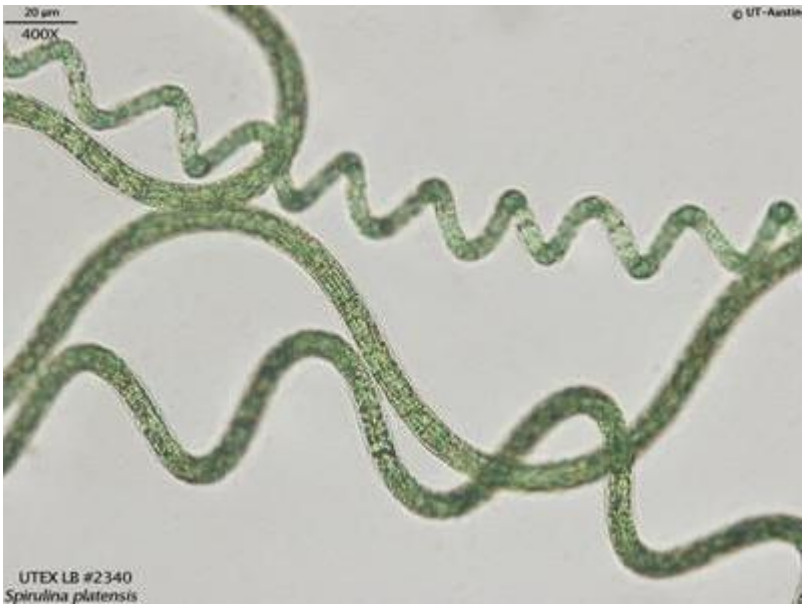
A produção de enzima fibrinolítica por microrganismos ainda possui um alto custo devido ao processo de produção industrial, sendo este um dos maiores obstáculos à sua utilização. Várias são as tentativas em laboratório de melhorar a produção enzimática, o que inclui: seleção de meio de cultura ideal, otimização das condições ambientais, superexpressão de cepas geneticamente modificadas e a busca por novas e efetivas fontes da protease fibrinolítica (PENG *et al*., 2003).

Devido à diversidade química dos microrganismos fotossintetizantes, estes são fontes de compostos ativos que podem ser utilizadas na prospecção de moléculas biologicamente ativas (KIM *et al.*, 2008; PRIYADARSHANI *et al.*, 2012). As microalgas e cianobactérias têm várias vantagens em comparação aos demais microrganismos na produção de bioativos de interesse industrial devido aos seus requisitos nutricionais mínimos, reduzindo o custo de produção (BRASIL *et al.,* 2017). Esses microrganismos têm demonstrado ser uma boa escolha para a produção de enzimas fibrinolíticas, bem como de agentes pró-fibrinolíticos (BANERJEE *et al.,* 2013; BAGCHI *et al.,* 2016, SILVA *et al.,* 2017; MADHYASTHA *et al.*, 2006). Embora muitos agentes fibrinolíticos de diferentes microrganismos tenham sido produzidos, purificados e caracterizados, não há relatos de enzimas fibrinolíticas do gênero *Arthrospira*.

2.5 *Arthrospira platensis*

Arthrospira (Spirulina) platensis é uma cianobactéria multicelular filamentosa, fotoautotrófica, com coloração verde azulada e células cilíndricas dispostas em tricomas helicoidais. Seus filamentos possuem entre 5-6 µm de largura e 20-200 µm de comprimento, dispondo da capacidade de deslizar ao longo de seu próprio eixo. Com multicamadas de parede celular que cercam a membrana plasmática, os tricomas possuem poros separados por septos que podem ser visualizados pelos métodos tradicionais da microscopia óptica (Fig. 1) (HOFF e SNELL, 2008; SHIMAMATSU, 2004; ASM, 1983; VONSHAK e TOMASELLI, 2002).

Figura 2 - *Arthrospira platensis.*



Fonte: UTEX. Disponível em: www.utex.org/products/utex-lb-2340

Cianobactérias contêm até 10% de nitrogênio em sua composição; o que justifica a diversidade de compostos nitrogenados que podem ser obtidos de sua biomassa, especialmente proteínas e peptídeos. *A. platensis* se destaca pela sua alta concentração de proteínas de 53-62%, entre as quais estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações químicas de fotossíntese. Da totalidade proteica presente nesse microrganismo, 47% equivale a aminoácidos

essenciais como a metionina, molécula ausente na maioria das cianobactérias e microalgas (CIFERRI, 1983; DILLON *et al.,* 1995; HOUSTON, 2002).

A. platensis possui uma composição nutricional completa, pois somado ao conteúdo protéico encontram-se vitaminas, carotenóides, ácidos graxos e minerais. (HOUSTON, 2002; BECKER, 2007; VONSHAK, 2000). Os ácidos graxos de maior interesse são os ácidos palmítico, linoléico e oléico (HIRANO *et al*., 1990). Sua riqueza de vitaminas se dá pela presença de moléculas como Cianocobalamina (B12), Pirodoxina (B6), Riboflavina (B2), Tiamina (B1), Tocoferol (E) e Filoquinona ou Fitonadiona (K) (BRANGER *et al*., 2003). Os altos níveis de carotenóides se devem a presença de β-caroteno e clorofila (RANGEL-YAGUI *et al*., 2004; CARERI *et al*., 2001; ANNAPURNA *et al*., 1991).

O consumo da biomassa de *A. platensis* é importane no tratamento de anemia, hepatotoxicidade, hipertensão, doenças cardiovasculares, redução do colesterol, hiperlipidemia, diabetes mellitus e hiperglicemia, imunodeficiência, processos inflamatórios, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras doenças virais e aumento da resistência imune em vários tipos de câncer (SUETSUNA e CHEN, 2001; SUBHASHINI *et al*., 2004; PARIKH *et al*., 2001; HOUSTON, 2002; DE CASTRO OLIVEIRA *et al.*, 2013). Ademais, ficobiliproteínas presentes da *A. platensis* possuem potencial anticancerígeno, antioxidante, anti-inflamatório, hepatoprotetor e de combate a radicais livres (EL *et al.*, 2013).

Além de ser um ingrediente seguro reconhecido desde 2003 pela U.S. Food and Drug Administration (FDA), *A. platensis* também foi utilizada em aplicações cosméticas (BECKER, 2007; KIM, 2008). Neste sentido, *A. platensis* tem sido amplamente estudada na prospecção de moléculas biologicamente ativas.

2.6 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

O isolamento e a purificação de produtos biológicos representam algumas das principais preocupações para a indústria biotecnológica. A demanda por biomoléculas com elevado grau de pureza tem chamado a atenção para a pesquisa de novas estratégias para o seu desenvolvimento e produção, visando uma futura aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos (CHAVEZ-SANTOSCOY *et al.*, 2010). Separações cromatográficas são amplamente

utilizadas no isolamento e purificação de biomoléculas, pois permitem alta resolução a cada passo e têm sido o suporte para a separação de proteínas (MOHAMMED, 2017), em particular na indústria biofarmacêutica, onde são requeridos elevados graus de pureza.

Um dos métodos cromatográficos mais comuns é a cromatografia de troca iônica, sendo usada em 67% dos procedimentos de purificação. Esta técnica consiste na adsorção reversível de moléculas carregadas com grupos iônicos imobilizados numa matriz de carga oposta, onde a afinidade da proteína com a coluna é conseguida por intermédio de ligações iônicas. Os trocadores de íons mais aplicados são o dietilaminoetilo (DEAE), responsável pela troca aniônica (58%), e o carboximetilo (CM), para troca catiônica (20%) (VENKATANAGARAJU *et al*., 2014; MOHAMMED, 2017; COSKUN, 2016). Matrizes cromatográficas que permitem interações iônicas estão se tornando mais populares em etapas de purificação de enzimas fibrinolíticas.

Vários protocolos têm sido descritos para a purificação de enzimas fibrinolíticas (Tabela 1). Nos últimos dois anos, estas enzimas foram obtidas de diferentes organismos, tais como *Cordyceps militaris* (LIU *et al.,* 2017), *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO *et al.,* 2017), *Pheretima posthumous* (VERMAA e PULICHERLA, 2017), *Bacillus subtilis* C142 (CHOI *et al.,* 2017), *Xylaria curta* (MESHRAM *et al.,* 2017), *Lumbrineris nipponica* (YEON *et al.,* 2017), *Neurospora sitophila* (LIU *et al.,* 2016), *Bacillus cereus* IND5 (BIJI *et al.,* 2016), *Curcuma aromatica Salisb*. (SHIVALINGU *et al.,* 2016), *Whitmania pigra Whitman* (CHU *et al.*, 2016).

Nascimento *et al.* (2017) relataram a purificação da enzima fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262 usando 60% de sulfato de amônio na saturação, e cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex) e gel filtração (Superdex 75) para se obter um fator de purificação de 60,89 e rendimento de 0,17%. Liu *et al.* (2016) obtiveram a enzima fibrinolítica purificada a partir de *Neurospora sitophila* utilizando sulfato de amônio na saturação, seguido por cromatografica de interação hidrofóbica (Octyl Sepharose Fast Flow), troca iônica (SP Sepharose High Performace) e filtração em gel Superdex 75 para se obter um fator de purificação de 75,2 e rendimento de 1,1%. Choi *et al.* (2017) adquiriu uma enzima fibrinolítica purificada a partir de *Bacillus subtilis* C142 submetendo o extrato bruto numa coluna

de troca iônica (DEAE Sepharose) seguida por gel de filtração (SEC 650), obtendo um grau de pureza de 20,71 e 0,90% de rendimento proteico.

Fica evidente que os métodos utilizados influenciam no grau de pureza obtido e, portanto, mais de um passo cromatográfico é geralmente utilizado durante a purificação dessas enzimas. De forma geral, os trabalhos empregam o uso de sulfato de amônio na precipitação proteica, seguido pela utilização de cromatrografia de troca iônica e, posteriormente, a aplicação da enzima em géis de filtração, a exemplo das colunas Superdex 75 e SEC 650, nas quais as proteínas permeiam no gel e são separadas com base em suas diferenças de tamanhos moleculares (NASCIMENTO *et al.,* 2017; LIU *et al.,* 2016; CHOI *et al.,* 2017; LU *et al*., 2010; KUMARAN *et al.*, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1 - Etapas utilizadas no processo de purificação de enzimas fibrinolíticas

Fonte	**Precipitação**	**Etapas de purificação**	**Rendimento (%)**	**Fator de purificação**	**Referência**
Cordyceps militaris	$(NH_4)_2SO_4$ (0–20%)	Phenyl-Sepharose HP CM-Sepharose FF Superdex 75	5,8	36,1	Liu *et al.,* 2017
***Mucor subtilissimus* UCP 1262**	$(NH_4)_2SO_4$ (40–60%)	DEAE-Sephadex Superdex 75	0,17	60,89	Nascimento *et al.,* 2017
Pheretima posthumous	$(NH_4)_2SO_4$ (70%)	DEAE-Cellulose Sephadex G50	*INF	8,01	Vermaa e Pulicherla, 2017
***Bacillus subtilis* C142**	**MNU	DEAE Sepharose CL6B SEC 650	0,9	20,71	Choi *et al.,* 2017
Xylaria curta	$(NH_4)_2SO_4$ (60%)	Sephacryl S-300	9,49	8,37	Meshram *et al.,* 2017

Lumbrineris nipponica	$(NH_4)_2SO_4$ (0-20%/20-55%)	Benzamidine DEAE sepharose	12.7	*INF	Yeon *et al.,* 2017
Neurospora sitophila	$(NH_4)_2SO_4$ (0–40%/40–80%)	Octyl Sepharose FF SP Sepharose HP Superdex 75	1,1	75,2	Liu *et al.,* 2016
***Bacillus cereus* IND5**	$(NH_4)_2SO_4$ (70%)	DEAE-cellulose Caseína-agarose	*INF	*INF	Biji *et al.,* 2016
Curcuma aromatica salisb.	$(NH_4)_2SO_4$ (80%)	Sephadex G-50 Recromatografia	5,9	5,0	Shivalingu *et al.,* 2016
Whitmania pigra whitman	**MNU	Q Sepharose Fast Flow Sephacryl S-200	0,003	630,7	Chu *et al.,* 2016

*INF: Informação não fornecida

**MNU: Metodologia não utilizada

As principais restrições em estratégias de purificação tradicionais incluem rendimentos baixos e longos períodos de tempo. Novas tecnologias, tais como processos de membrana (BALARAMAN e PRABAKARAN, 2007; SIMKHADA *et al*., 2010), sistemas de duas fases aquosas (SILVA *et al.*, 2013) e imunopurificação (KARIMI *et al.*, 2012) estão sendo utilizadas na purificação de proteases fibrinolíticas, visando métodos mais baratos, rápidas, de alto rendimento e passíveis na operação em larga escala.

2.7 CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

A crescente demanda da indústria biofarmacêutica requer de forma simultânea a pureza de biomoléculas a determinação de suas características bioquímicas. No que diz respeito às enzimas, visando uma futura aplicação

terapêutica, tais características associam-se a fatores que influenciam na atividade enzimática, como por exemplo pH, temperatura, cofatores enzimáticos, surfactantes, entre outros. O estudo das enzimas fibrinolíticas nos últimos dois anos demonstram uma série de características que devem ser levadas em consideração.

Liu *et al.* (2017) relataram que a enzima fibrinolítica extraída de *Cordyceps militaris* é uma serino protease de aproximadamente 30 kDa e apresenta maior atividade a 37 °C e pH 7,2, atividade esta que aumenta na presença dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+}. Biji *et al.* (2016) isolou uma protease fibrinolítica de *Bacillus cereus* IND5 com 47 kDa que tem maior atividade no pH 8,0, temperatura equivalente a 50 °C e na presença dos íons Mg^{2+} e Ca^{2+}. Meshram *et al.* (2017) caracterizou uma metaloprotease fibrinolítica produzida por *Xylaria curta* com aproximadamente 33 kDa que apresenta pico de atividade enzimática no pH 8,0 a 35 °C e presença de Ca^{2+}.

Como pode-se observar na Tabela 2, a maioria das enzimas fibrinolíticas obtidas nos últimos anos são serino proteases e/ou metaloproteases, ou seja, possuem o aminoácido serina em seu sítio ativo e íons metálicos estão envolvidos no seu mecanismo catalíco. Estas atigem atividade máxima numa faixa de pH mais neutra (6,0-8,0) e temperatura variante entre 35 °C e 55 °C. Fica evidente a relação de cofatores com o sistema catalítico destas enzimas ao se verificar que íons como Mg^{2+}, Ca^{2+} e Fe^{2+} aumentam suas atividades específicas.

À vista do referido, as cianobactérias são microrganismos promissores na produção de enzimas fibrinolíticas. *Arthrospira platensis* se mostrou uma eficiente fonte dessas enzimas, neste sentido, o presente trabalho tem como objetivo purificar e caracterizar tais enzimas. Aspirando a futura produção biofarmacêutica de um composto com baixo custo e alto valor agregado.

Tabela 2 - Características bioquímicas de enzimas fibrinolíticas

Fonte	**Peso Molecular**	**Classe da protease**	**pH ótimo**	**Temperatura ótima**	**Íons que aumentam a atividade enzimática**	**Referência**
Cordyceps militaris	≈30 kDa	Serino protease	7,2	37 °C	Fe^{2+} e Fe^{3+}	Liu *et al.,* 2017
***Mucor subtilissimus* UCP 1262**	20 kDa	Serino protease	8,0	40 °C	Cu^{2+}, Mg^{2+} e Fe^{2+}	Nascimento *et al.,* 2017
Pheretima posthumous	29.5 kDa	Serino protease	8,0	40 °C	**MNU	Vermaa e Pulicherla, 2017
***Bacillus subtilis* C142**	23.5 kDa	Serino metaloprotease	6,0	40 °C	Mg^{2+} e Ca^{2+}	Choi *et al.,* 2017
Xylaria curta	≈33 kDa	Metaloprotease	8,0	35 °C	Ca^{2+}	Meshram *et al.,* 2017
Lumbrineris nipponica	28 kDa	Serino protease	Atividade em pH's baixo a	37 °C	**MNU	Yeon *et al.,* 2017

			neutro (3,0-7,0)			
Neurospora sitophila	34 kDa	Serino protease	7,6	41 °C	Na^{+}, Ca^{2+} e Mg^{2+}	Liu *et al.,* 2016
***Bacillus cereus* IND5**	47 kDa	**MNU	8,0	50 °C	Mg^{2+} e Ca^{2+}	Biji *et al.,* 2016
Curcuma aromatica salisb.	12 kDa	Serino protease	7,5	45 °C	**MNU	Shivalingu *et al.,* 2016
Whitmania pigra whitman	26.7 kDa	Metaloprotease	8,5	55 °C	Na^{+}, Mg^{2+} e K^{+}	Chu *et al.,* 2016

**MNU: Metodologia não utilizada

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar enzimas fibrinolíticas a partir do extrato celular de *Arthrospira platensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar enzimas fibrinolíticas produzidas por *Arthrospira platensis* utilizando métodos cromatográficos;
- Estipular o peso molecular da proteína utilizando métodos cromatográficos e eletroforéticos;
- Caracterizar bioquimicamente a protease fibrinolítica quanto a temperatura e ao pH ótimos, avaliando a estabilidade da referida enzima em relação a esses fatores;
- Determinar o efeito de íons e surfactantes na atividade fibrinolítca;
- Determinar o tipo de protease com atividade fibrinolítica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MEIO DE CULTURA

Arthrospira platensis obtida da Coleção de Cultura de Algas da Universidade do Texas (AUSTIN, TX, EUA) foram cultivadas em meio padrão (Schlösser, 1982) sem nitrato de sódio ($NaNO_3$) suplementado com 0,20% de milhocina (BARROS *et al*., 2016), previamente tratada (LIGGETT e KOFFLER, 1948).

4.2 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

A. platensis foi cultivado em 100 mL de meio de cultura em frascos Erlenmeyers de 250 mL. Os cultivos foram realizados a uma concentração celular inicial de 50 mg L^{-1} (PELIZER *et al*., 2003) em mesa agitadora e frequência de agitação 100 rpm, temperatura de 30 ± 2 °C e intensidade luminosa de 50 ± 5 µmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$. No final da fase exponencial do crescimento celular, as células foram centrifugadas, liofilizadas e armazenadas a uma temperatura inferior a 4 °C para as análises seguintes.

4.3 EXTRATO ENZIMÁTICO

A biomassa foi ressuspendida numa concentração de 50 mg L^{-1} em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e homogeneizada em agitador magnético à temperatura ambiente por 30 minutos (MATSUBARA *et al.*, 2000). O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante resultante foi usado como extrato enzimático bruto.

4.4 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA FIBRINOLÍTICA

O extrato enzimático bruto foi precipitado com sulfato de amônio (40-70%) e centrifugado a 15.000 rpm e 4 °C por 10 minutos. O precipitado foi

ressuspendido em tampão Tris-HCl 20 mM e pH 8,0, carregado numa coluna DEAE-Sephadex (10x3 cm) e eluído com o mesmo tampão a um fluxo de 1 mL/min. As frações com atividade fibrinolítica foram reunidas, liofilizadas e ressuspendidas em tampão Tris-HCl 20 mM e pH 8,0; posteriormente carregadas na coluna de gel filtração Superdex 75 HR10/300 GL previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM e pH 8,0 e eluídas a um fluxo de 0,5 mL/min. A fração ativa purificada foi usada para estudos posteriores.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

A atividade fibrinolítica foi quantificada pelo método espectrofotométrico (WANG *et al*., 2011) e a absorbância medida a 275 nm. Neste ensaio, 1 unidade de atividade fibrinolítica (FU) foi definida como a quantidade de enzima responsável por um aumento de 0,01 na absorbância por minuto.

4.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

O teor total de proteína foi determinado pelo ensaio do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al*., 1985) a 562 nm.

4.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA ENZIMA FIBRINOLÍTICA

4.7.1 Efeito do pH e Temperatura na Estabilidade da Protease Fibrinolítica

O pH ótimo da enzima foi determinado utilizando diferentes tampões numa faixa de pH entre 4,0 e 10,0, a citar: acetato de sódio (pH 4,0-5,0), fosfato de sódio (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0) e Carbonato-Bicarbonato (pH 10,0). Para verificação da estabilidade ao pH, a enzima foi incubada nos tampões supracitados por 120 minutos e 24 horas, e sua atividade enzimática residual analisada. O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi avaliado por incubação da enzima purificada em temperaturas variantes entre 10°C e 60°C. Para este propósito, alíquotas foram retiradas a cada 30 minutos por um período de 180 minutos e submetidas à determinação da atividade fibrinolítica.

4.7.2 Efeito de Íons Metálicos na Atividade Enzimática

O efeito de diferentes íons metálicos na atividade enzimática foi avaliado em concentrações de íons equivalentes a 2,5, 5,0 e 10,0 mM. A enzima foi incubada a 37°C durante 60 minutos com os seguintes sais: $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $CaCl_2$, NaCl, e KCl.

4.7.3 Efeito de Inibidores na Atividade Enzimática

A enzima foi incubada durante 60 minutos a 37°C na presença dos seguintes inibidores: 10,0 mM de fluoreto de metilfenilsulfonilo (PMSF), 10,0 mM de 2-mercaptoetanol, 10,0 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1,0 mM de pepstatina A e 10,0 mM de ácido iodoacético.

4.7.4 Efeito de Surfactantes na Atividade Enzimática

A enzima foi incubada durante 60 minutos a 37°C na presença dos seguintes surfactantes: Triton X-100, Tween 20, Tween 80 e dodecil sulfato de sódio (SDS). O efeito destes surfactantes foram testados em três diferentes concentrações, nomeadamente: 0,5, 1,0 e 2,0% (v/v).

4.8 SDS – ZIMOGRAFIA DE FIBRINA

A atividade fibrinolica da enzima purificada foi verificada por meio de um zimograma em gel de fibrina, realizado de acordo com a metodologia descrita por Kim *et al.* (1998).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PURIFICAÇÃO E ZIMOGRAMA DE FIBRINA

Uma enzima fibrinolítica extraída de *Arthrospira platensis* foi purificada usando passos sequenciais descritos na Tabela 3. Através da utilização de colunas de troca iônica e gel filtração obteve-se uma única proteína, sendo a atividade fibrinolítica utilizada como índice de purificação. Aproximadamente 0,07 mg de frações proteicas ativas foram obtidas do extrato bruto após cromatografia em DEAE-sephadex (Figura 3). Os picos contendo a enzima fibrinolica foram reunidos, concentrados e submetidos a filtração em gel numa coluna Superdex 75 exibindo um único pico com atividade enzimática (Figura 4). A eficácia deste processo de purificação é demonstrada por um elevado fator de purificação, equivalente a 32,72, e atividade fibrinolítica específica (7988,34 U/mg) superior às reportadas para outras enzimas fibrinolíticas (BIJI *et al*., 2016; MOON *et al*., 2014; MONTRIWONG *et al*., 2012; WANG *et al*., 2011; KOH *et al*., 2001). Finalmente, a enzima purificada foi submetida a zimografia em gel de fibrina, que permitiu calcular o peso molecular da enzima purificada como sendo 72,6 kDa (Figura 5 e Tabela 3). Se comparado com as enzimas fibrinolíticas supracitadas, a enzima extraída da *Arthrospira platensis* possui maior peso molecular, no entanto, este foi semelhante a outra protease produzida pela *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* com 80 kDa (YADA *et al.*, 2005). Ademais, os resultados obtidos através do zimograma evidenciam que a atividade fibrinolítica encontrada na enzima purificada é semelhante a de outros estudos (NASCIMENTO *et al.*, 2017; MOON *et al*., 2014; HUANG *et al*., 2013; JU *et al*., 2012; MANDER *et al*., 2011), bem como a plasmina comercial, clivando diretamente a fibrina artificial (Figura 5). Isso sugere que, comparados aos ativadores do plasminogênio utilizados na terapia trombolítica, como o ativador do plasminogênio tecidual (tPA), a estreptoquinase e a uroquinase, a protease fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* teria a vantagem de menos efeitos colaterais, entre eles a hemorragia e a reoclusão dos vasos (WANG *et al.,* 2008).

Figura 3 - Perfis de eluição da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis* em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephadex)

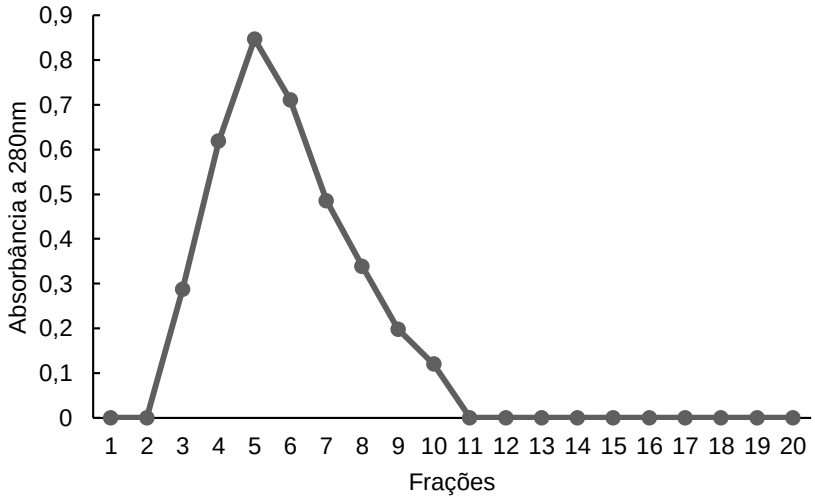


Figura 4 - Perfis de eluição da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis* em cromatografia de gel filtração (Superdex 75)

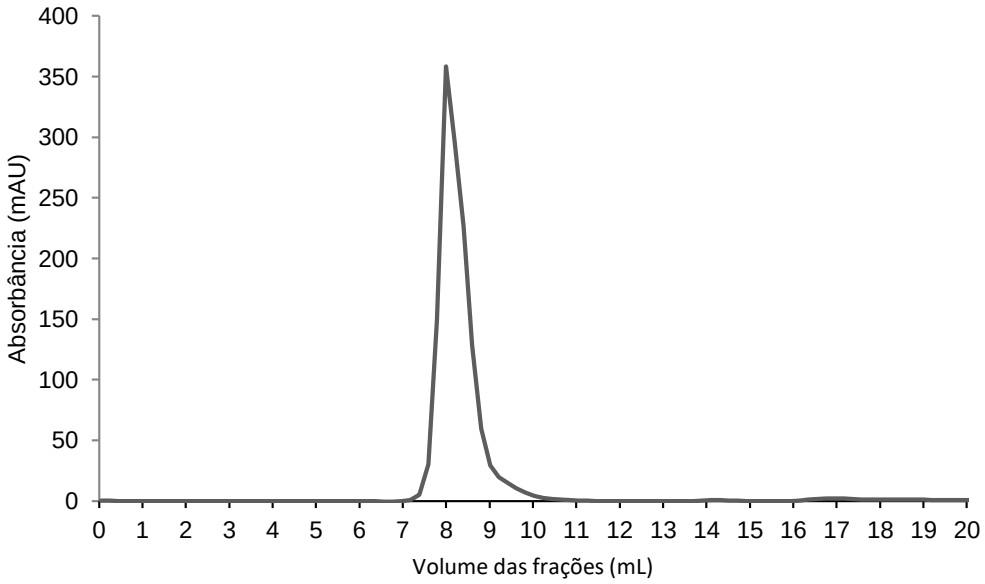
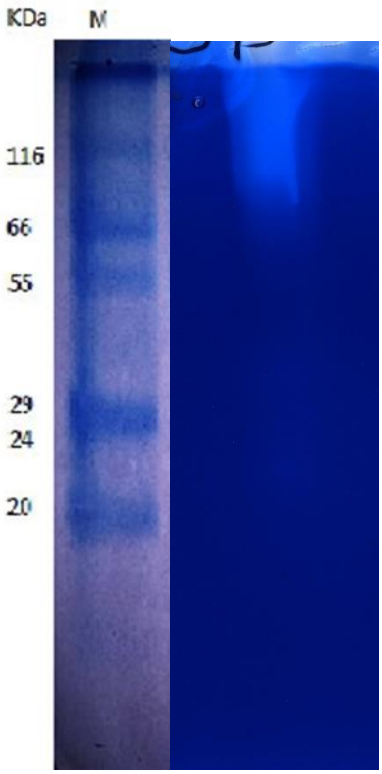


Tabela 3 - Etapas de purificação da enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*

Etapa de purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade fibrinolítica total (U)	Atividade fibrinolítica específica (U/mg)	Fator de purificação (%)	Recuperação
Extrato bruto	2,29 ± 0,02	560,40 ± 24,60	244,07 ± 10,71	1,00	100,00
Precipitatação – Sulfato de amônio (40-70%)	0,62 ± 0,02	543,00 ± 44,12	869,41 ± 70,64	3,56	96,89
DEAE-Sephadex (troca iônica)	0,07 ± 0,00	337,20 ± 36,48	4283,31 ± 463,47	17,54	60,17
Superdex 75 (gel filtração)	0,02 ± 0,00	161,70 ± 4,66	7988,34 ± 230,55	32,72	28,85

Figura 5 - Zimograma de fibrina (12%) da enzima fibrinolica purificada por cromatografia em gel de exclusão (Superdex 75)



5.2 EFEITOS DA TEMPERATURA E PH NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA E ESTABILIDADE

As Figuras 6-8 mostram o efeito do pH na atividade enzimática e sua estabilidade. A enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis* apresentou atividade máxima no intervalo entre os pHs 6,0 e 7,0, sendo este intervalo considerado ótimo para atividade catalítica da enzima. A mesma não sofreu alterações extremas na faixa de pH variante de 6,0 a 8,0, indicando que a enzima estudada atua preferencialmente na faixa neutra do pH. Além disso, após três horas a enzima exibiu atividade máxima apenas no pH 7,0 que foi mantida por 24 horas, demonstrando ser este o pH mais estável para a atividade catalítica. Esta característica bioquímica pode ser tida como vantagem no que tange a utilização

futura dessa enzima fibrinolítica como um possível fármaco, tendo em vista que apresentou ampla estabilidade na faixa fisiológica do pH humano.

Figura 6 - pH ótimo da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis*

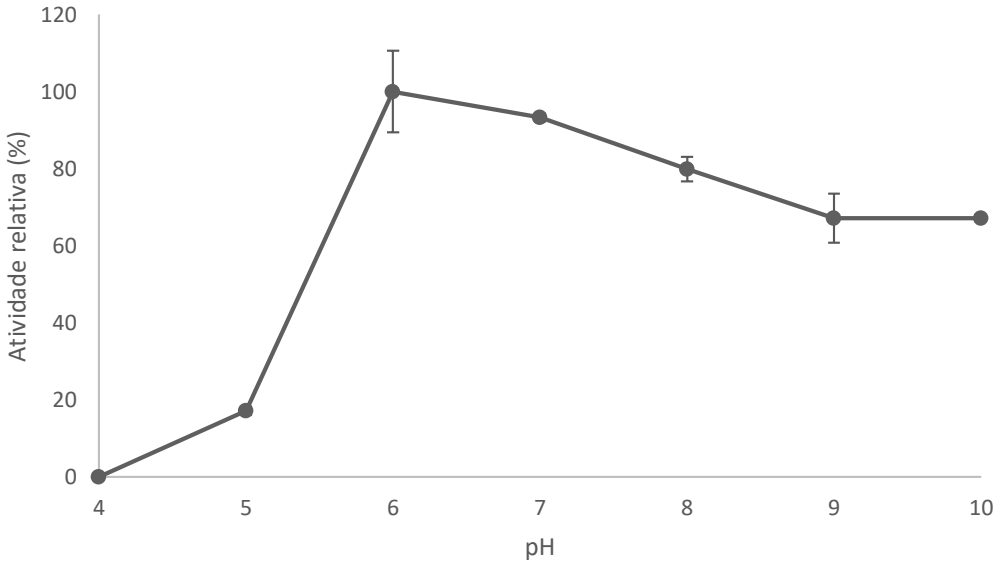


Figura 7 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* após 120 minutos

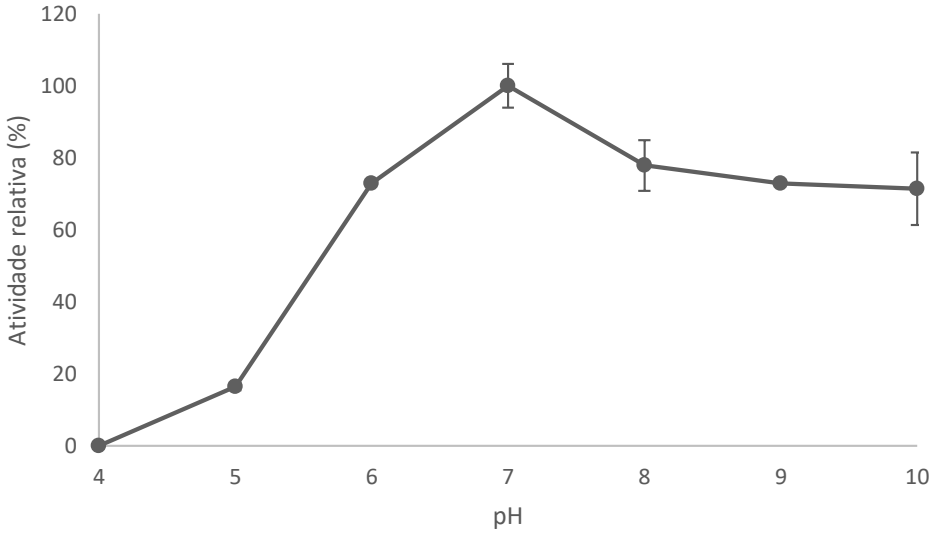
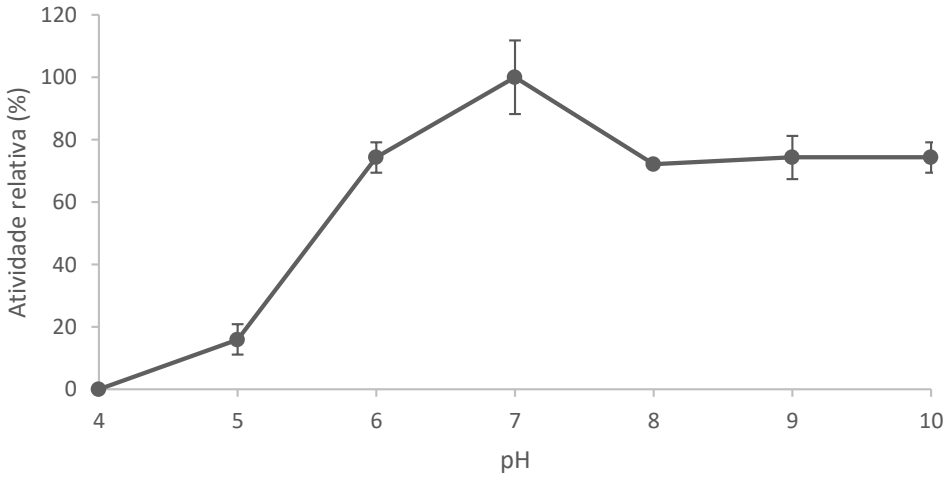


Figura 8 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* após 24 horas



Os efeitos da temperatura na atividade fibrinolítica e na termoestabilidade da enzima são ilustrados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A temperatura a que esta enzima apresentou máxima atividade fibrinolítica foi de 40°C, o que corrobora com os resultados relatados para proteases fibrinolíticas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO *et al.*, 2017), *Pheretima posthumous* (VERMAA e PULICHERLA, 2017), *Bacillus subtilis* C142 (CHOI *et al*., 2017), *Lyophyllum shimeji* (MOON *et al*., 2014), *Neanthes japonica* (DENG *et al*., 2010), *Pleurotus eryngii* (CHA *et al.*, 2010), *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 (LU *et al.*, 2010) e *Bacillus subtilis* TKU007 (WANG e YEH, 2006). No entanto, acima de 60°C a atividade da enzima foi completamente perdida, indicando uma possível desnaturação enzimática devido a alta temperatura (Figura 9).

Embora a atividade fibrinolítica tenha diminuído aproximadamente 30%, permaneceu praticamente inalterada em seu valor durante 150 minutos de

incubação na temperatura de 40°C (Figura 10). A enzima teve decrescimo drástico de sua atividade para 8% após 180 minutos e em temperaturas mais altas (resultados não mostrados), novamente evidenciando desnaturação térmica da enzima. A perda de atividade a 60–65°C foi mencionada para enzimas fibrinolíticas de *Cordyceps militaris* (LIU *et al.,* 2017), *Xylaria curta* (MESHRAM *et al.*, 2017), *Virgibacillus halodenitrificans* (MONTRIWONG *et al*., 2012), *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 (LU *et al*., 2010) e *Oidiodendron flavum* (THARWAT, 2006).

Figura 9 - Temperatura ótima da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis*

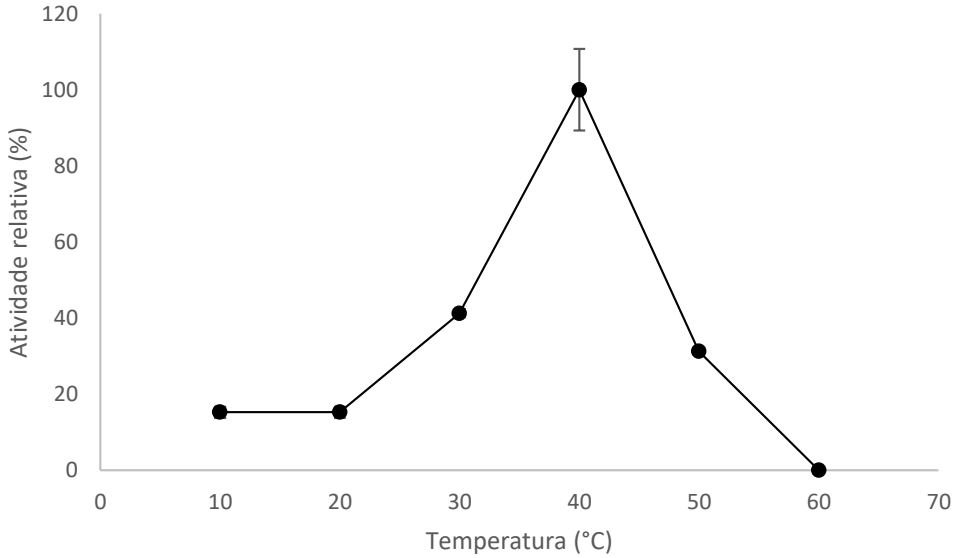
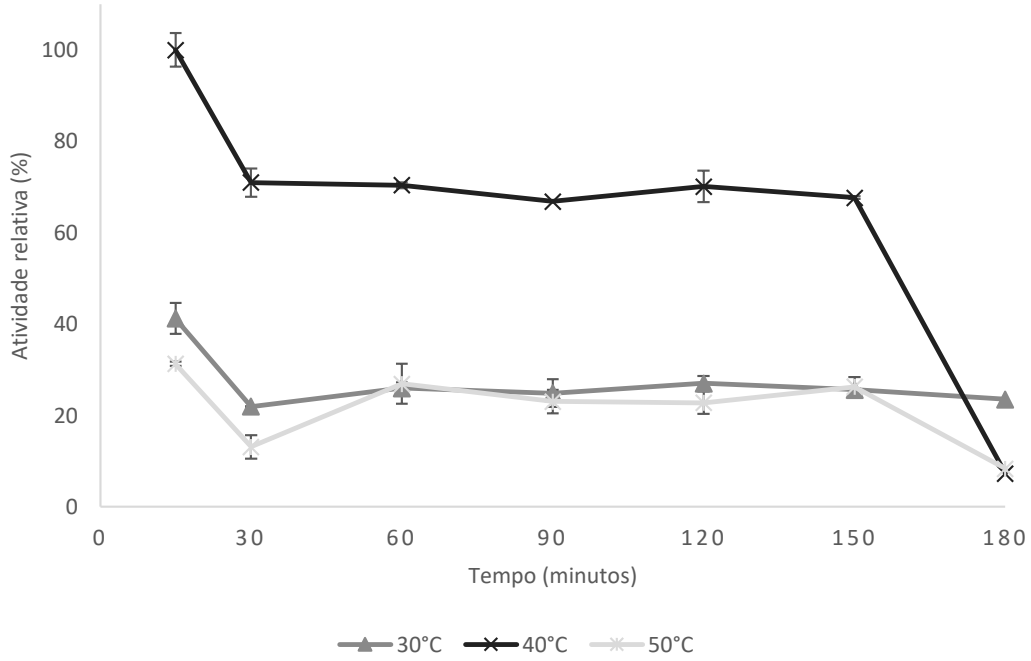


Figura 10 - Estabilidade da enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* a 30, 40 e 50 °C



5.3 EFEITO DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Vários íons em três concentrações diferentes (2,5, 5,0 e 10,0 mM) foram usados para fornecer informações sobre a possível ação específica como moduladores da enzima fibrinolítica purificada (Tabela 4). Pode-se observar que a atividade enzimática foi aumentada em maior proporção pela adição de Fe^{2+} em todas as concentrações testadas e, em proporções menores, pela adição de 5 mM de Zn^{2+} e 2,5 mM de Na^{+}. Não houve taxa de inibição significativa pela adição de qualquer uma das outras concentrações de íons utilizadas. Estes resultados indicam um provável envolvimento desses íons metálicos no mecanismo catalítico da enzima fibrinolítica, que pode estar relacionada à alterações no sítio ativo. O exposto está de acordo com o aumento da atividade fibrinolítica de *Cordyceps militaris* (LIU *et al*., 2017) e aumento da atividade da enzima fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO *et al.*, 2017) observada na presença de Fe^{2+}, mas nenhum com taxas tão

significativas quanto as exibidas pela atividade da enzima de *Arthrospira platensis*.

Tabela 4 - Efeito de íons metálicos na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*

Íons	Atividade residual (%)		
	2.5 mM	5 mM	10 mM
Controle	100.00	100.00	100.00
Zn^{2+}	98.95	120.35	99.40
Mg^{2+}	103.56[A]	100.29	94.35
Cu^{2+}	94.35[A]	103.12[A]	111.88[A]
Fe^{2+}	271.32	474.44	676.22
Ca^{2+}	108.91[A]	107.13	108.02
Na^{+}	122.58	108.32	103.41
K^{+}	108.46[A]	116.34[A]	92.86

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.4 EFEITO DE INIBIDORES NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Como mostrado na Tabela 3, a atividade enzimática foi fortemente inibida pelo PMSF (inibidor de serino proteases), inibindo completamente a atividade enzimática. O EDTA (inibidor de metaloprotease) inibiu 66,67% e os demais inibidores não mostraram efeitos inibitórios. Estes resultados sugerem que a enzima fibrinolítica em questão é uma serino protease, similar às produzidas por

Cordyceps militaris (LIU *et al.,* 2017), *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO *et al.,* 2017), *Pheretima posthumous* (VERMAA e PULICHERLA, 2017), *Lumbrineris nipponica* (YEON *et al.,* 2017), *Neurospora sitophila* (LIU *et al.,* 2016) e *Curcuma aromatica Salisb*. (SHIVALINGU *et al.,* 2016). Fica evidente a relação desta classe de proteases com a especificidade pela fibrina, principal componente proteico dos coágulos sanguíneos que é naturalmente degradada pela plasmina, uma serino protease.

Tabela 5 - Efeito de inibidores na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*

Inibidores	Atividade residual (%)
Controle	100.00
PMSF	0
2-mercaptoetanol	22.22[A]
EDTA	33.33[A]
Ácido iodoacético	100.00
Pepstatina A	100.00

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

5.5 EFEITO DE SURFACTANTES NA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

A avaliação do efeito de surfactantes na atividade fibrinolítica demonstrou que apenas o SDS foi capaz de reduzir completamente a atividade enzimática de forma diretamente proporcional à sua concentração. Segundo Wang *et al*. (2011), o SDS pode atuar como agente desnaturante devido a sua carga líquida negativa, envolvendo as moléculas da enzima impedindo assim sua atividade.

Como mostrado na Tabela 6, a enzima fibrinolítica teve atividade aumentada na presença de surfactantes não iônicos, tais como: Tween 20, Tween 80 e Triton X-100. Especialmente na presença de 2% de triton x-100, que exibiu um aumento de aproximadamente 87% na atividade enzimática. Possivelmente, este agente estabilizou a estrutura da enzima e inibiu sua agregação, levando a um aumento da atividade em comparação ao controle. Tais resultados corroboram com o relatado para uma enzima fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (NASCIMENTO *et al*., 2017).

Tabela 6 - Efeito de surfactantes na enzima fibrinolítica de *Arthrospira platensis*

Surfactantes	Atividade residual (%)		
	0.5 %	1 %	2 %
Controle	100.00	100.00	100.00
Tween 20	138.15^{A}	131.38^{A}	119.69^{A}
Tween 80	127.07^{A}	115.69 ^{A}	139.38 ^{A}
Triton x-100	100.00	160.92^{B}	187.69^{B}
SDS	100.00	51.07	0

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

6 CONCLUSÃO

Uma nova enzima fibrinolítica produzida pela cianobatéria *Arthrospira platensis* foi purificada e suas propriedades bioquímicas foram avaliadas. A enzima foi classificada como uma serino protease, que possivelmente vem a ser uma das enzimas fibrinolíticas com maior peso molecular relatada na literatura. Esta é altamente ativa a 40°C e estável no pH 7,0. A protease fibrinolítica atua de forma semelhante a plasmina, clivando diretamente a fibrina, demonstrando futuro potencial biofarmacêutico. Sua atividade enzimática demonstra considerável aumento na presença dos íons Fe^{2+}, Zn^{2+} e K^{+} e surfactantes como o Triton x-100. Portanto, é fortemente sugerido que a enzima fibrinolítica produzida por *Arthrospira platensis* possa ser uma fonte potencial para o desenvolvimento de agentes trombolíticos visando futuras aplicações medicinais para o tratamento de doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

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 Resource, v. 112, n. 5, p. 339-347, 2003.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Microbiological reviews, v. 47, n. 4, p. 551-578, Dec. 1983.

ANNAPURNA, V. V.; DEOSTHALE, Y. G.; BAMJI, M. S. *Spirulina* as a source of vitamin A. Plant foods for human nutrition, v.41, p.125-134, 1991.

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 of applied phycology, v. 28, n. 1, p. 177-180, 2016.

BALARAMAN, K.; PRABAKARAN, G. Production & purification of a fibrinolytic enzyme (thrombinase) from *Bacillus sphaericus*. Indian Journal of Medical Research, v. 126, n. 5, p. 459, 2007.

BANERJEE, A.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. Streptokinase - a clinically useful thrombolytic agent. Biotechnology Advances, v. 22, n. 4, p. 287–307, 2004.

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 of applied phycology, v. 25, n. 4, p. 1111-1122, 2013.

BARROS, P. D. S.; SILVA, P. E. C.; MARQUES, D. A. V.; HERCULANO, P. N.; BEZERRA, R. P.; PORTO, A. L. F. Subproduto agroindustrial milhocina usado como uma fonte de indução da produção de proteases por *Arthrospira platensis*. XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC 2016, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Disponíel em: <https://www.ucs.br/site/midia/arquivos/4387-enzitec2016.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2018.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology advances, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007.

BI, B.; WANG, X.; WU, H.; WEI, Q. Purification and characterisation of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. Food chemistry, v. 126, n. 1, p. 46-53, 2011.

BIJI, G. D.; ARUN, A.; MUTHULAKSHMI, E.; VIJAYARAGHAVAN, P.; ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A. Bio-prospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus cereus* IND5 in solid state fermentation. 3 Biotech, v. 6, n. 2, p. 231, 2016.

BRANGER, B.; CADUDAL, J. L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; ANCEL, P. Spiruline as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie, v. 10, n. 5, p. 424-431, 2003.

BRASIL, B. D. S. A. F.; DE SIQUEIRA, F. G.; SALUM, T. F. C.; ZANETTE, C. M.; SPIER, M. R. Microalgae and cyanobacteria as enzyme biofactories. Algal Research, v. 25, p. 76-89, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Acidente Vascular Cerebral – AVC. 2017. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidente-vascular-cerebral-avc>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Parecer Técnico-Científico: O uso do Alteplase (rt – PA) no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 664, de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas - Trombólise no Acidente Vascular Cerebral Isquêmico Agudo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 12 de Abril de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas: volume 3. Brasília, 604 p, 2014.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSC, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. Journal of Chromatography, v. 912, n. 1, p. 61-71, 2001.

CASAZZA, A. A.; FERRARI, P. F.; ALIAKBARIAN, B.; CONVERTI, A.; PEREGO, P. Effect of UV radiation or titanium dioxide on polyphenol and lipid

contents of Arthrospira (Spirulina) platensis. Algal Research, v. 12, p. 308-315, 2015.

CESARMAN-MAUS, G.; HAJJAR, K. A. Molecular mechanisms of fibrinolysis. British Journal of Haematology, v. 129, n. 3, p. 307-321, 2005.

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, n. 16, 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, n. 4, 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 Engi- neering and Technology, v. 33, n. 1, p. 177-182, 2010.

CHITTE, R. R.; DESHMUKH, S. V. Production, Purification, and Biochemical Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from Thermophilic *Streptomyces* sp. MCMB-379. Applied Biochemistry Biotechnology , v.165, p. 1406–1413, 2011.

CHOI, D.; CHA, W. S.; PARK, N.; KIM, H. W.; LEE, J. H.; PARK, J. S.; PARK, S. S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. Bioresource technology, v. 102, n. 3, p. 3279-3285, 2011.

CHOI, J. H.; KIM, J. E.; KIM, S.; YOON, J.; PARK, D. H.; SHIN, H. J.; LEE, H. J.; CHO, S. S. Purification and partial characterization of a low molecular fibrinolytic serine metalloprotease C142 from the culture supernatant of *Bacillus subtilis* C142. International journal of biological macromolecules, v. 104, p. 724-731, 2017.

CHU, F.; WANG, X.; SUN, Q.; LIANG, H.; WANG, S.; AN, D.; CUI, C.; CHAI, Y.; LI, S.; SONG, S.; JI, A. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Whitmania pigra Whitman*. Clinical and Experimental Hypertension, v. 38, n. 7, p. 594-601, 2016.

CHUNG, D. M.; CHOI, N. S.; MAENG, P. J.; CHUN, H. K.; KIM, S. H. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from chive (*Allium tuberosum*). Food Science and Biotechnology, v. 19, n. 3, p. 697–702, 2010.

CIFERRI, O. Spirulina, the edible microorganism. Microbiological reviews, v. 47, n. 4, p. 551, 1983.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. Northern clinics of Istanbul, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.

DE CASTRO OLIVEIRA, W.; DE OLIVEIRA, C. A.; CAMPOS-GALVÃO, M. E. M.; DE CASTRO, V. C.; DO NASCIMENTO, A. G. Cianobactérias: uma revisão sobre potencial nutricional e alguns aspectos biotecnológicos. BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports, v. 2, n. 1, p. 49-67, 2013.

DEEPAK, V.; ILANGOVAN, 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, n. 6, p. 297-304, 2010.

DENG, Z.; WANG, S.; LI, Q.; JI, X.; ZHANG L.; HONG, M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). Bioresource Technology, v. 101, n. 6, p. 1954-1960, 2010.

DE-SIMONE, S.G.; CORREA-NETTO, C.; ANTUNES, O.A.C.; DE-ALENCASTRO, R.B.; SILVA JR.; F.P. Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. Journal of Chromatography, v. 822, n. 1-2, p. 1-9, 2005.

DILLON, J. C.; PHUC, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. Plants in human Nutrition, v.77 , p.32-46, 1995.

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

El, A.; Hh, B.; Gs, E. Healthy benefit of microalgal bioactive substances. J. Aquat. Sci, v. 1, n. 1, p. 11-23, 2013.

GUYTON, A. C. HALL, J. E. Tratado De Fisiologia Médica. Elsevier Brasil, 2017.

HIRANO, M.; MORI, H.; MIURA, Y.; MATSUNAGA; NAKAMURA, N. □-Linolênic acid production by microalgae. Applied Microbiology Biotechnology, v.24/25, p.183-191, 1990.

HOFF, F.; SNELL, T. Plankton Culture Manual, 6th ed. Florida Aqua Farms. Dade City, Florida, 2008.

HOUSTON, M. The Potential Application of *Spirulina (Arthrospira)* as a Nutritional and Therapeutic Supplement in Health Management, 2002.

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. 124–30, 2013.

JU, X.; CAO, X.; SUN, Y.; WANG, Z.; CAO, C.; LIU, J.; JIANG, J. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. XZNUM 00004. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 28, n. 7, p. 2479-2486, 2012.

KARIMI, Z.; BABASHAMSI, M.; ASGARANI, E.; SALIMI, A. Development of an immunoaffinity method for purification of streptokinase. Avicenna journal of medical biotechnology, v. 4, n. 3, p. 142, 2012.

KIM, D. W.; CHOI, J. H.; PARK, S. E.; KIM, S.; SAPKOTA, K.; KIM, S. J. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. International Journal of Biological Macromolecules, v. 72, p. 1159–1167, 2015

KIM, H. C.; CHOI, B. S.; SAPKOTA, K.; KIM, S.; LEE, H. J.; CHEO, J.; 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, S. H.; CHOI, N. S.; LEE, W. Y. Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic enzymes on gels. Analytical biochemistry, v. 263, n. 1, p. 115-116, 1998.

KIM, S. K.; RAVICHANDRAN, Y. D.; KHAN, S. B.; KIM, Y. T. Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 13, n. 5, p. 511-523, 2008.

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. Environmental Microbiology, v. 62, n. 7, p. 2482-2488, 1996.

KOH, Y. S.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S. Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. Toxicon, v. 39, n. 4, p. 555-560, 2001.

KUMARAN, S.; PALANI, P.; NISHANTHI, R.; SRIMATHI, S.; KAVIYARASAN, V. Purification of an intracellular fibrinolytic protease from *Ganoderma lucidum* Vk12 and its susceptibility to different enzyme inhibitors. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 10, n. 4, p. 413-420, 2011.

LANGER, B.; WOLOSKER, M. Coagulação e fibrinólise: idéias atuais e suas aplicações clínicas. Revista de Medicina, v. 85, n. 4, p. 157-164, 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, n. 2, p. 264-271, 2006.

LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn steep liquor in microbiology. Bacteriological reviews, v. 12, n. 4, p. 297, 1948.

LIU, X. I.; KUMAR KOPPARAPU, N.; CHEN ZHENG, H.; KATROLIA, P.; PING DENG, Y.; QUN ZHENG, X. 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.

LIU, X.; KOPPARAPU, N. K.; LI, Y.; DENG, Y.; ZHENG, X. Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. International journal of biological macromolecules, v. 94, p. 793-801, 2017.

LU, C. L.; CHEN, S.; CHEN, S. N. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Schizophyllum commune*. Journal of Food and Drug analysis, v. 18, n. 2, 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, n. 5, p. e349-e355, 2010.

MADHYASTHA, H. K.; RADHA, K. S.; SUGIKI, M.; OMURA, S.; MARUYAMA, M. Purification of c-phycocyanin from *Spirulina fusiformis* and its effect on the induction of urokinase-type plasminogen activator from calf pulmonary endothelial cells. Phytomedicine, v. 13, n. 8, p. 564-569, 2006.

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, n. 7, p. 1449-1455, 2011.

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: Biochemistry and Molecular Biology, v. 125, n. 1, p. 137-143, 2000.

MEDEIROS E SILVA, G. M.; MARQUES, D. A. V.; 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.

MESHRAM, V.; SAXENA, S.; PAUL, K.; GUPTA, M.; KAPOOR, N. Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation. Applied biochemistry and biotechnology, v. 181, n. 4, p. 1496-1512, 2017.

MOHAMMED, J. S. A brief review on Ion Exchange Chromatography. PharmaTutor, v. 5, n. 2, p. 30-38, 2017.

MONTRIWONG, A.; KAEWPHUAK, S.; RODTONG, S.; ROYTRAKUL, S.; YONGSAWATDIGUL, J. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. Process biochemistry, v. 47, n. 12, p. 2379-2387, 2012.

MOON, S. M.; KIM, J. S.; KIM, H. J.; CHOI, M. S.; PARK, B. R.; KIM, S. G.; KIM, D. K. Purification and characterization of a novel fibrinolytic α

chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. Journal of bioscience and bioengineering, v. 117, n. 5, p. 544-550, 2014.

MOSULISHVILI, L. M.; KIRKESALI, E. I.; BELOKOBYLSKY, A. I.; KHIZANISHVILI, A. I.; FRONTASYEVA, M. V.; PAVLOV, S. S.; GUNDORINA, S. F. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium-and iodine-containing pharmaceuticals based on blue–green algae *Spirulina platensis*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 30, n. 1, p. 87-97, 2002.

NASCIMENTO, T. P.; SALES, A. E.; PORTO, T. S.; COSTA, R. M. P. B.; BREYDO, L.; UVERSKY, V. N.; PORTO, A. L. F.; CONVERTI, A. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Bioprocess and biosystems engineering, v. 40, n. 8, p. 1209-1219, 2017.

NAVEENA, B.; GOPINATH, K. P.; SAKTHISELVAN, P.; PARTHA, N. Enhanced production of thrombinase by *Streptomyces venezuelae*: kinetic studies on growth and enzyme production of mutant strain. Bioresource technology, v. 111, p. 417–24, 2012a.

OLIVEIRA, C. C. Trombólticos: Artigo de revisão. Revista SOCERJ, v. XIV, n.1, p. 47-52, 2001.

PARIKH, P.; MANI, U.; IYER, U. Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 diabetes mellitus. Journal of Medicinal Food, v. 4, n. 4, p. 193-199, 2001.

PARK, S.; LI, M.; KIM, J.; SAPKOTA, K.; KIM, J.; CHOI, B.; YOON, Y.; LEE, J.; LEE, H.; KIM, C.; KIM, S. Purification and Characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia, Bioscience and BioTechnology Biochemistry, v. 71, n. 9, p. 2214-2222, 2007.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; DE O RANGEL, C.; SASSANO, C. E.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. Journal of Food Engineering, v. 56, n. 4, p. 371-375, 2003.

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 douche, a traditional Chinese soybean food. Elsevier Science, v. 134, p. 45-52, 2003.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria: utility and applications. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, v. 3, n. 11, p. 4123, 2012.

RANGEL-YAGUI, C. A.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. Bioresource Technology, v.92, p. 133–141, 2004.

SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von algenkulturen. Plant Biology, v. 95, n. 1, p. 181-276, 1982.

SHEN, M.H.; KIM, J.S.; SAPKOTA, K.; PARK, S.E.; CHOI, B.S.; KIM, S.; LEE, H.H.; KIM, C.S.;CHUN, H.S.; RYOO, C.I.; KIM, S.J. Purification, characterization and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* mycelia. Journal of Microbiology and BioTechnology, v. 17, n. 8, p. 1271-1283, 2007.

SHIMAMATSU, H. Mass production of Spirulina, an edible microalga. In: Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges. Springer Netherlands, p. 39-44, 2004.

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, n. 5, p. 354-364, 2012.

SHIVALINGU, B. R.; VIVEK, H. K.; PRIYA, B. S.; SOUJANYA, K. N.; SWAMY, S. N. Purification and characterization of novel fibrin(ogen)olytic protease from *Curcuma aromatica Salisb*.: Role in hemostasis. Phytomedicine, v. 23, n. 13, p. 1691-1698, 2016.

SILVA, G. M. M.; MARQUES, D. D. A. V.; 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.

SILVA, P. E. C.; de SOUZA, F. A. S. D.; 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. **J** Microbiol Res, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2017.

SIMKHADA, J. R.; MANDER, P.; CHO, S. S.; YOO, J. C. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. Process Biochemistry, v. 45, n. 1, p. 88-93, 2010.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Cardiômetro. 2018. Disponível em: <http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp>. Acessado em: 15 de janeiro de 2018.

STIE, J.; FOX, D. Induction of brain microvascular endothelial cell urokinase expression by *Cryptococcus neoformans* facilitates blood-brain barrier invasion. PloS one, v. 7, n. 11, p. 494-502, 2012.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V.; REDDY, M. C.; REDDY, M. M.; RACHAMALLU, A.; REDDANNA, P. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. Biochemical Pharmacology, v. 68, n. 3, p. 453-462, 2004.

SUETSUNA, K.; CHEN, J. R. Identification of antihypertensive peptides from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis*. Marine Biotechnology, v. 3, n. 4, p. 305-309, 2001.

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.

THARWAT, N. A. Purification and biochemical characterization of fibrinolytic enzyme produced by thermophilic fungus *Oidiodendron flavum*. Biotechnology, v. 5, n. 2, p. 160-165, 2006.

UNGSETHAPHAND, T.; PEERAPORNPISAL, Y.; WHANGCHAI, N.; SARDSUD, U. Effect of feeding *Spirulina platensis* on growth and carcass composition of hybrid red tilapia (*Oreochromis mossambicus*× *O. niloticus*).

Maejo international journal of science and technology, v. 4, n. 2, p. 331-336, 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. 254–261, 2011.

VENKATANAGARAJU, E.; DIVAKAR, G.; SWETHA, C. Overview on fibrinolytic proteases purification strategies. International Journal of Pharmacy Research & Science, v. 2, n. 3, p. 232-246, 2014.

VERMA, M. K.; PULICHERLA, K. K. Broad substrate affinity and catalytic diversity of fibrinolytic enzyme from *Pheretima posthumous* - Purification and molecular characterization study. International journal of biological macromolecules, v. 95, p. 1011-1021, 2017.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology. London, 2000. p 131–158.

VONSHAK, A.; TOMASELLI, L. Arthrospira (Spirulina): systematics and ecophysioIogy. In: The ecology of cyanobacteria. Springer Netherlands, p. 505-522, 2002.

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, n. 9, p. 750-758, 2006.

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, p. 196-202, 2011.

WANG, S. L.; YEH, P. Y. Production of a surfactant-and solvent-stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by Bacillus subtilis TKU007. Process Biochemistry, v. 41, n. 7, p. 1545-1552, 2006.

WANG, X.; ROSELL, A.; LO, E. H. Targeting extracellular matrix proteolysis for hemorrhagic complications of tPA stroke therapy. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), v. 7, n. 3, p. 235-242, 2008.

WANG, Z.; ZHANG, X. Inhibitory effects of small molecular peptides from Spirulina (Arthrospira) platensis on cancer cell growth. Food & function, v. 7, n. 2, p. 781-788, 2016.

WATSON, L.; BRODERICK, C.; ARMON, M. P. Thrombolysis for acute deep vein thrombosis. Cochrane Database Syst Rev, v. 1, n. 1, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cardiovascular diseases (CVDs). 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>. Acessado em: 15 de janeiro de 2018.

YADA, E.; NAGATA, H.; NOGUCHI, Y.; KODERA, Y.; NISHIMURA, H.; INADA, Y.; MATSUSHIMA, A. An arginine specific protease from *Spirulina platensis*. Marine Biotechnology, v. 7, n. 5, p. 474-480, 2005.

YEON, S. J. CHUNG, G. Y.; HONG, J. S.; HWANG, J. H.; SHIN, H. S. Purification of serine protease from polychaeta, *Lumbrineris nipponica*, and assessment of its fibrinolytic activity. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, v. 53, n. 6, p. 494-501, 2017.

YOSHIDA, W. B. Tratamento convencional da trombose venosa profunda proximal: ainda uma boa opção?. Jornal Vascular Brasileiro, v. 15, n. 1, p. 1-3, 2016.

ZHANG, X.; YUN, L.; PENG, L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences, v. 33, n. 1, p. 153–8, 2013.