



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

LAYLA CARVALHO MAHNKE

**PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE UTILIZANDO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE
AZOCOLL E SUA CARACTERIZAÇÃO.**

RECIFE
2022

LAYLA CARVALHO MAHNKE

**PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE UTILIZANDO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE
AZOCOLL E SUA CARACTERIZAÇÃO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Departamento de Bioquímica, CB/UFPE;

Instituto Keizo Asami – iLIKA

Co-Orientadora:

Dra. Maria Helena Menezes Estevam Alves

Instituto Keizo Asami – iLIKA

RECIFE
2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Mahnke, Layla Carvalho

Purificação de collagenase utilizando compósito magnético de Azocoll e sua caracterização / Layla Carvalho Mahnke. – 2022.

95 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.

Coorientadora: Dra. Maria Helena Menezes Estevam Alves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2022.

Inclui referências e apêndices.

1. Proteínas. 2. Enzimas. 3. Biotecnologia. I. Carvalho júnior, Luiz Bezerra de (orientador). II. Alves, Maria Helena Menezes Estevam (coorientadora). III. Título.

572.7

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-216

LAYLA CARVALHO MAHNKE

**PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE UTILIZANDO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE
AZOCOLL E SUA CARACTERIZAÇÃO.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para obtenção de título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 30/08/2022

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Mariana Paola Cabrera (1º Titular)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. David Fernando Moraes Neri (2º Titular)
Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel de Amaral (3º Titular)
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (4º Titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

RECIFE
2009

Dedico ao Universo por toda iluminação,
sabedoria e resiliência para compreender,
escolher e aprender com os diferentes caminhos.

Om Sai Ram.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos para todos que contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

À Deus por me fortalecer.

À toda minha família pelo suporte e apoio.

Ao Professor Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela paciência, orientação e por contribuir para o meu aperfeiçoamento profissional.

À Dra. Maria Helena Alves, minha co-orientadora e amiga, que me resgatou e nunca deixou de acreditar em mim.

Ao iLIKA – Instituto Keizo Asami pela estrutura que tornou o desenvolvimento deste trabalho possível.

À CAPES pelo investimento na pesquisa e apoio financeiro.

À Universidade Federal de Pernambuco.

"The scientific man does not aim at an immediate result. He does not expect that his advanced ideas will be readily taken up. His work is like that of the planter: for the future. His duty is so lay the foundation for those who are to come, and point the way. He lives and labors and hopes".

(Nikola Tesla, 1 Janeiro 1900, Problem of Increasing Human Energy)

RESUMO

Colagenase (EC 3.4.24.3), enzima proteolítica capaz de degradar a tríplice hélice do colágeno, foi purificada, neste trabalho em uma etapa mediante o emprego de um compósito magnético contendo o ligante azocoll, colágeno impregnado com azocorante, amplamente utilizada como substrato específico para colagenases. A colagenase purificada utilizando o compósito MPs-Azocoll apresentou purificação de 16,6 vezes e rendimento de 33,1%. O peso molecular da colagenase purificada de *O. mossambicus* foi estimado em 30 kDa, corroborando valores de colagenase de peixe relatados na literatura. O reuso da MPs-Azocoll apresentou purificações de 15,9-14,9 vezes, com rendimentos entre 33-31%. Os resultados de caracterização da MPs-Azocoll sugerem a presença do azocoll nas partículas, observado pelos picos característicos do colágeno na Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); através do deslocamento angular na Difração de Raio-X (DRX) e na presença do carbono na análise elementar pela Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia (EDX). Foi utilizado o planejamento fatorial com análise estatística de variância (ANOVA) para aperfeiçoamento do processo de purificação com MPs-Azocoll. Os parâmetros analisados foram: (A) quantidade de partícula magnética usada na purificação; (B) quantidade de azocoll usado na síntese da partícula; (C) volume de extrato bruto; e (D) tempo de incubação. O modelo estatístico foi significativo de acordo com os valores de p e F. As variáveis estatisticamente significativas foram: (B) quantidade de azocoll usado na síntese da partícula e (D) tempo de incubação. A MPs-Azocoll otimizada foi testada na purificação de collagenase de outras fontes utilizando extratos brutos de vísceras do peixe (*Scomber japonicus*) e caldo de cultivo fúngico (*Penicillium sp.*) obtendo resultados de purificação (20; 22,2 vezes e rendimento de 35,8; 94,5% respectivamente) superiores aos testados anteriormente. A colagenase caracterizada de *S. japonicus* foi determinada como uma serino-protease, alcalina, com melhor atividade no pH 8,0, e a 50°C. Estas características garantem a possibilidade de aplicação da colagenase. Estes resultados demonstram que a partícula magnética contendo azocoll pode ser aplicada na purificação de colagenase em um processo de etapa única, empregando compósito de fácil síntese, baixo custo e reutilizável.

Palavras-chave: Proteases; Partícula magnética; Víscera peixe; Colagenase.

ABSTRACT

Collagenase (EC 3.4.24.3), a proteolytic enzyme capable of degrading the triple helix of collagen, was purified in this work in one step using a magnetic composite containing the azocoll ligand, collagen impregnated with azodye, widely used as a specific substrate for collagenases. Collagenase purified using the MPs-Azocoll composite showed, respectively, a 16.6-fold purification and a 33.1% yield. The molecular weight of the purified enzyme from *O. mossambicus* was estimated at 30 kDa, corroborating the fish collagenase values reported in the literature. The reuse of MPs-Azocoll showed purifications of 15.9-14.9 times, with yields between 33-31%. The MPs-Azocoll characterization results suggest the presence of azocoll in the particles, observed by the characteristic peaks of collagen in the Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR); through the angular displacement of the X-ray Diffraction (XRD) and the presence of the element carbon in the Energy-dispersive X-ray spectroscopy analysis (EDX). The factorial design with statistical analysis of variance (ANOVA) was used to improve the MPs-Azocoll. The parameters analyzed were: (A) amount of magnetic particle used for purification; (B) amount of azocoll used on the particle synthesis; (C) volume of crude extract; and (D) incubation time. The statistical model was significant according to the p and F values. The statistically significant variables were: (B) amount of azocoll used on the particle synthesis and (D) incubation time. Optimized MPs-Azocoll was tested for collagenase purification from other sources using crude extracts of fish viscera (*Scomber japonicus*) and fungal culture broth (*Penicillium* sp.) obtaining results purification higher than those previously tested (20; 22.2-fold purified and yield of 35.8; 94.5% respectively). The collagenase characterized from *S. japonicus* was determined as a serine protease, alkaline, with better activity at pH 8.0, and at 50°C. These characteristics guarantee a high possibility of application of collagenase in industry. These results demonstrate that the azocoll-containing magnetic particle can be applied in the purification of collagenase in a one-step process, employing an easy-to-synthesize, low-cost, and reusable composite.

Keywords: Proteases; Magnetic particle; Fish viscera; Collagenase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1 - Estrutura molecular da collagenase de Homo sapiens.....	18
Figura 2 - Imagem ilustrativa da fibra de colágeno.....	20
Figura 3 - Imagem ilustrativa da cadeia polipeptídica do colágeno.	21
Figura 4 - Imagem ilustrativa da hidrólise do colágeno.....	22
Figura 5 - Nanocápsula híbrida contendo collagenase na superfície para melhor penetração do tecido e liberação do medicamento na área desejada.....	24
Figura 6 - Esquema exemplificando o tratamento utilizando collagenase.....	25
Figura 7 - Imagem esquemática do tratamento da contratura de Dupuytren.....	26
Figura 8 - Etapas/técnicas de purificação convencional.....	27
Figura 9 - Etapas de purificação utilizando partícula magnética.....	28
Figura 10 - Exemplo de purificação de biomoléculas por partícula magnética.....	29
Figura 11 - Estrutura da Hematita, Magnetita e Maghemita.....	30
Figura 12 - Azocoll: Colágeno impregnado com azocorante vermelho brilhante.	31
Figura 13 - Principais aplicações biotecnológicas das partículas magnéticas.....	32

ARTIGO 1 - PARTÍCULA MAGNÉTICA DE ÓXIDO DE FERRO COM LIGANTE ESPECÍFICO PARA A RÁPIDA PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE

Figura 1 - Processo de síntese e purificação utilizando MPs-Azocoll.....	39
Figura 2 - SDS-PAGE da collagenase purificada da víscera de tilápia usando MPs-Azocoll (E) comparada com o extrato bruto em diferentes diluições (B, C, and D) e marcador molecular (A).....	44
Figura 3 - FTIR da MPs (preto), MPs-Azocoll (vermelho) and Azocoll (azul).....	45
Figura 4 - XRD da MPs (preto) e MPs-Azocoll (vermelho).....	47

Figura 5 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura da MPs (A) e MPs-Azocoll (B) e análise de energia dispersiva de raios-X (C).....	49
--	----

ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO PARTÍCULA MAGNÉTICA COM AZOCOLL

Figura 1 - Efeito do pH na atividade colagenolítica (A: <i>Scomber japonicus</i> ; B: <i>Clostridium histolyticum</i>).....	73
--	----

Figura 2 - Efeito da temperatura na atividade colagenolítica (A: <i>Scomber japonicus</i> ; B: <i>Clostridium histolyticum</i>).....	74
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - PARTÍCULA MAGNÉTICA DE ÓXIDO DE FERRO COM LIGANTE ESPECÍFICO PARA A RÁPIDA PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE

Tabela 1 - Purificação de colagenase de *O. mossambicus* com MPs-Azocoll.....40

Tabela 2 - Reuso das partículas MPs-Azocoll.....41

Tabela 3 - Resultados da purificação de colagenase de peixe e microrganismo.....43

ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO PARTÍCULA MAGNÉTICA COM AZOCOLL

Tabela 1 - Níveis usados para o planejamento experimental.....63

Tabela 2 - Valores para Atividade Específica, Purificação e Rendimentos usando planejamento fatorial 24 para MPs-Azocoll.....67

Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo representativo na faixa de parâmetros estudada.....68

Tabela 4 - Confirmação dos modelos com dados dos ensaios previstos e experimentais.....69

Tabela 5 - Purificação de colagenase otimizada usando MPs-Azocoll.....70

Tabela 6 - Purificação de colagenases de peixes e microorganismos relatados na literatura.....71

Tabela 7 - Efeito de íons e inibidores na atividade colagenolítica.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Azocoll	Colágeno impregnado com azocorante
MPs	Partículas magnéticas
MPs-Azocoll	Partículas magnéticas de azocoll
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
XRD	Difração de Raio-X
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
EDX	Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia
A.Esp.	Atividade específica
ANOVA	Análise de variância
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
TLCK	Tosil lisina clorometil cetona
TPCK	Tosil fenilalanina clorometil cetona
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 OBJETIVOS.....	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos Específicos.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 INDÚSTRIA DE ENZIMAS.....	17
2.2 COLAGENASE.....	18
2.2.1 Fontes de colagenase.....	19
2.2.2 Colágeno.....	20
2.2.2.1 Tipos de colágeno.....	21
2.2.2.2 Hidrólise do colágeno.....	22
2.2.3 Aplicação da colagenase.....	23
2.3 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS.....	26
2.3.1 Purificação por partículas magnéticas.....	27
2.4 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	29
2.5 LIGANTE: AZOCOLL.....	30

2.6 APLICAÇÃO DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	31
3 ARTIGO 1 - PARTÍCULA MAGNÉTICA DE ÓXIDO DE FERRO COM LIGANTE ESPECÍFICO PARA A RÁPIDA PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE.....	33
4 ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO PARTÍCULA MAGNÉTICA COM AZOCOLL.....	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A - THE ENZYMES IN COVID-19: A REVIEW	87
APÊNDICE B - PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE AZOCOLL E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE.....	95

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores altamente eficientes utilizados em diversos campos biotecnológicos. Proteases são industrialmente importantes e amplamente empregadas na biomedicina, representando 65% das enzimas comerciais (COELHO et al., 2016; DIAS & CARVALHO, 2017). Colagenases (E.C. 3.4.21.32) são proteases com potenciais aplicações em diversas áreas. Na medicina e na indústria de cosmética, as colagenases são utilizadas em formulações de pomadas para limpeza de feridas infectadas, tratamento de lesões necrosadas, abscessos e queimaduras, como no preparo de cremes para o tratamento de acne e rugas, limpeza e clareamento da pele (HELLING et al., 2017; ABOOD et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2020; FERREIRA et al. 2020).

Em geral, as colagenases são obtidas por via microbiológica e de extratos de plantas e animais. Fungos e bactérias são potenciais produtores de colagenase, pela possibilidade de indução de produção enzimática e são as principais fontes desta enzima para uso comercial. Extratos de plantas ou de animais, como resíduos gerados no processamento do peixe, são ricos em biomoléculas e podem ser fontes alternativas de enzimas com novas formas de aplicação (ABOOD et al., 2018; OLIVEIRA et al. 2020; FERREIRA et al. 2020). A aplicação de enzimas como a colagenase para fins terapêuticos exige um elevado grau de pureza, submetendo-a a onerosos processos de purificação e encarecendo o produto final.

As usuais técnicas de purificação compreendem diversas fases dentre elas a precipitação, cromatografias, diálise, ultrafiltração, eletroforese, entre outros (GÄDKEA et al., 2017; ALVES et al. 2017). Por isso o desenvolvimento de novos métodos de obtenção e purificação de enzimas devem ser eficientes e simples para que sejam economicamente viáveis (WU et al., 2015).

Assim, para melhorar processos de purificação, o uso de compósitos magnéticos ganha dimensão e relevância neste campo (GÄDKEA et al., 2017; ALVES et al., 2017; CABRERA et al., 2019). As utilizações de partículas magnéticas são interessantes por exibirem propriedades únicas, tais como alta área de superfície, baixa toxicidade e fácil separação de uma mistura utilizando um campo magnético externo (ALVES et al., 2017; CABRERA et al., 2019) tornando-se

possível separar magneticamente enzimas de diversos extratos (SHAABANI et al., 2016; KURTA et al., 2017) e ainda reutilizar a partícula magnética para novas purificações. Assim, este trabalho almeja desenvolver e aperfeiçoar a síntese das partículas magnéticas de azocoll, caracterizar e aplicá-las na purificação de colagenase de diferentes fontes.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e aperfeiçoar a síntese das partículas magnéticas de azocoll, caracterizar e aplicá-las na purificação de colagenase de diferentes fontes.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver o método para síntese do compósito magnético contendo azocoll (MPs-Azocoll);
- Sintetizar as partículas magnéticas contendo azocoll;
- Caracterizar físico-quimicamente as MPs-Azocoll utilizando MEV, EDX, DRX e FTIR;
- Aperfeiçoar a síntese da partícula magnética e o processo de purificação utilizando planejamento fatorial;
- Purificar colagenase de origem animal e microbiológica utilizando os MPs-Azocoll;
- Investigar o efeito de temperatura, pH, inibidores e íons metálicos na atividade da colagenase purificada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INDÚSTRIAS DE ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos encontrados em todos os sistemas biológicos. Elas são proteínas que por séculos foram inconscientemente usadas na forma de extratos bacterianos ou vegetais para fabricação de vinho, queijo, pão, cerveja e vinagre e para fabricação de mercadorias como couro e linho (RAVINDRAN & JAISWAL, 2016). Entretanto, somente algumas décadas atrás suas formas purificadas encontraram ampla aplicação em processos industriais (ADRIO & DEMAÏN, 2014). O grande desafio ainda consiste nos custos associados ao emprego delas em processos industriais. Os processos de purificação estão entre eles.

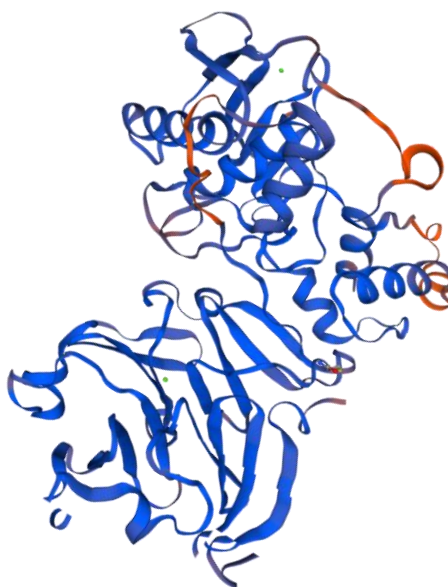
Atualmente, os fabricantes de detergentes são os maiores consumidores de enzimas, que também são muito utilizadas na produção de rações, alimentos e bebidas. Elas desempenham papel central na biotecnologia e na saúde, sendo utilizadas em diversos processos para aumentar a eficiência e especificidade e reduzir gastos. No Brasil, uma das líderes do setor atende diversos perfis de clientes, com produtos assim distribuídos: 41% para mercado de detergentes, 26% de alimentos, 8% de rações e 25% de outros setores como, por exemplo, o terapêutico. Em decorrência destas necessidades e tendências, prevê-se um aumento significativo do consumo de enzimas a nível internacional. A produção destas biomoléculas atingiu aproximadamente US\$ 11,4 bilhões em 2021, devendo chegar a US\$ 12,2 bilhões em 2022. Com taxa de crescimento anual de 6,5%, espera-se que o mercado global de enzimas atinja 20,3 bilhões até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022).

A América do Norte dominou o mercado de enzimas com uma participação de 37,6% em 2021. Isso se deve ao aumento da demanda do setor farmacêutico nos EUA (GRAND VIEW RESEARCH, 2022; EMBRAPA & NOVOZYME, 2015; DIAS & CARVALHO, 2017).

2.2 COLAGENASES

As collagenases (EC 3.4.24.3) atuam na manutenção e regeneração de órgãos e tecidos, capazes de clivar o colágeno nativo ou desnaturado em condições fisiológicas de pH e temperatura *in vivo* ou *in vitro*, não apresentando atividade para qualquer outra proteína (FERREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017a).

Figura 1 - Estrutura molecular da collagenase de *Homo sapiens*.



Fonte: Swiss-Model (2019).

Do ponto de vista fisiológico, as collagenases dividem-se em: metalocollagenases que são collagenases de vertebrados designadas de verdadeiras; e serinocollagenase que são collagenases que possuem a capacidade de clivar a parte não helicoidal do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017a; SORUSHANOVA et al., 2018).

Metalocollagenases são da família das metaloproteases capazes de degradar a matriz extracelular. Todos os membros desta família são secretados como pro enzimas ligadas à membrana celular. Apresentam massa molecular entre 30 e 150 kDa e são dependentes de zinco e cálcio que as mantêm estáveis. Enzimas dessa matriz participam dos mais variados processos

fisiológicos que envolvem reparação tecidual e cicatrização de feridas (DABOOR et al., 2010; SORUSHANOVA et al., 2018).

As serinocolagenases são geralmente ativas em pH alcalino e neutro, cálcio dependentes, apresentando massa molar entre 24 e 30 kDa. Enzimas desse grupo são capazes de clivar a tripla hélice de alguns tipos de colágeno e muitas vezes estão relacionadas à produção de hormônios, degradação de outras proteínas e coagulação sanguínea (DABOOR et al., 2010; FERREIRA et al., 2016; SORUSHANOVA et al., 2018). Ambos os tipos de collagenases participam de diversos processos fisiológicos, podendo ser utilizadas no desenvolvimento de pomadas tópicas ou biofilmes, atuando em processos de regeneração da derme ou aceleração da cicatrização de queimaduras.

2.2.1 Fontes de collagenases

Existe um grande interesse na busca de collagenases de fontes alternativas. Os fungos produtores de enzimas se caracterizam por produzir enzimas extracelulares, sendo considerados mais seguros no que se refere às questões sanitárias do que o uso de bactérias. A afinidade por vários sítios ao longo da cadeia de colágeno torna as collagenases de origem microbianas uma das fontes promissoras para pesquisas e aplicações biotecnológicas (FERREIRA et al., 2016; ABOOD et al., 2018).

A principal fonte utilizada industrialmente é de origem bacteriana utilizando como produtor o microrganismo *Clostridium histolyticum* encontrado nas fezes e no solo, é uma bactéria gram-positiva, patogênica em muitas espécies, incluindo camundongos, coelhos e seres humanos.

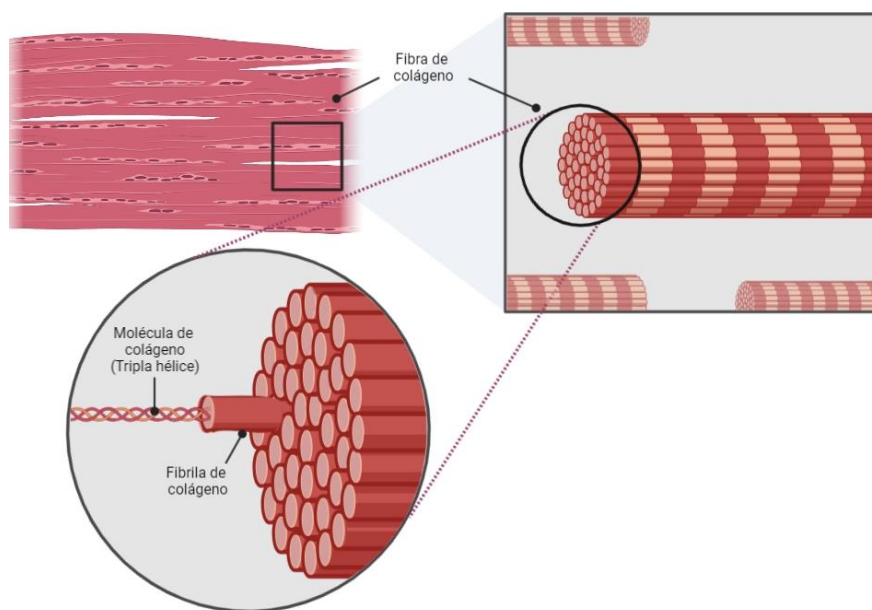
Outra fonte promissora é o uso de peixe e outros organismos aquáticos como fonte de collagenases e de enzimas que apresentam atividade collagenolítica (DABOOR et al., 2012; FERREIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017a). A collagenase tem sido investigada a partir do reaproveitamento dos subprodutos do processamento da indústria do pescado, utilizando o fígado, estômago e intestino do peixe. A viabilidade do uso de proteases collagenolíticas extraídas a partir de resíduos do pescado já foi evidenciada em

diversas espécies que possuem um importante papel na indústria pesqueira mundial (OLIVEIRA et al., 2017a; ABOOD et al., 2018).

2.2.2 Colágeno

O colágeno constitui o principal elemento estrutural de órgãos e tecidos, representando cerca de 20 a 30% do total de proteínas corporais presente nos mamíferos. Na Figura 2 as fibras de colágeno são formadas por uma junção de várias unidades de fibrilas de colágeno, que por sua vez são formadas pela polimerização de moléculas de colágeno alongadas consistindo em três subunidades (cadeia polipeptídica) arranjadas em tripla hélice, unidas por pontes de hidrogênio formando a α -hélice. A influência na estabilização da hélice do colágeno é também devido a pequenas interações químicas como Van der Waals, hidrofobicidade e eletro estabilidade (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

Figura 2 - Imagem ilustrativa da fibra de colágeno.

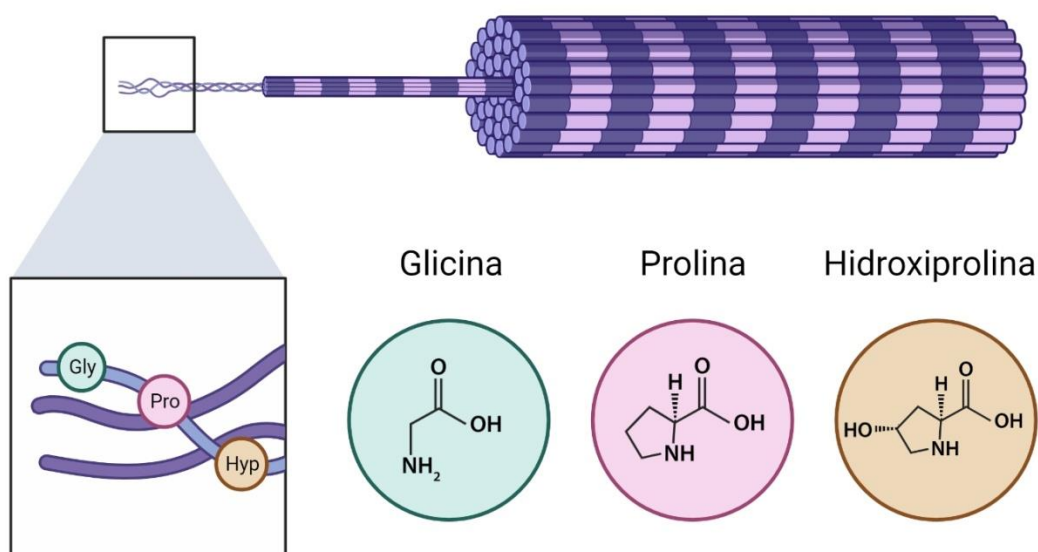


Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

De uma forma generalizada, como na Figura 3, as cadeias polipeptídicas do colágeno se apresentam sequência de aminoácidos tripeptídica: glicina-X-

prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, sendo o X composto por um dos 20 aminoácidos existentes. Aminoácidos como a hidroxiprolina e hidroxilisina são formados nos ribossomos durante a tradução do RNA mensageiro do colágeno a partir da hidroxilação da prolina e lisina. A estrutura simples do colágeno se apresenta de forma insolúvel devido a grande quantidade de aminoácidos hidrofóbico presentes na sua estrutura (SILVA & PENNA, 2012).

Figura 3 - Imagem ilustrativa da cadeia polipeptídica do colágeno.



Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender

2.2.2.1 Tipos de colágeno

Cerca de 29 tipos diferentes de colágeno foram identificados atualmente, divididos em duas classes: os fibrilares e não fibrilares. Apenas nove entre os diferentes tipos são facilmente encontrados (Tipo I, II, III, IV, V, VII, IX, XI e XII) (DABOOR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2017b; SORUSHANOVA et al., 2018).

O biopolímero mais abundante no corpo dos animais é o colágeno do tipo I. Este colágeno tipo I possui uma elevada biocompatibilidade e propriedades biodegradáveis tornando-os aplicáveis na área de engenharia de tecidos para produção de biomateriais. Alguns colágenos são responsáveis pela formação de fibrilas (I, II, III, V e X), organizado em um entrelaçamento

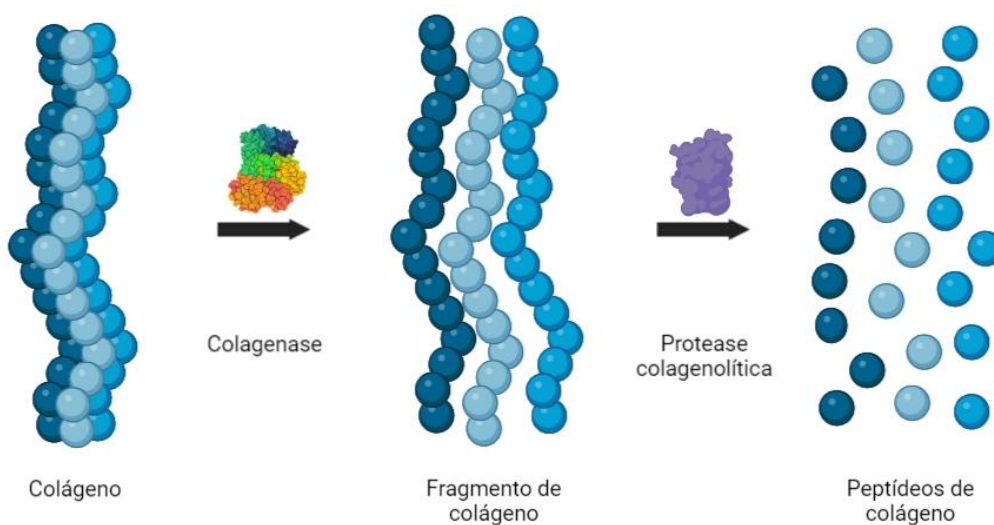
dentro das membranas basais (IV e VII) (DABOOR et al., 2010; HELLING et al., 2017).

A derme humana é composta por cerca de 80% e 10% de colágenos dos tipos I e III respectivamente. As fibras de colágenos fortalecem e organizam a matriz extracelular, enquanto as fibrilas de colágeno fornecem a principal biomecânica para fixação celular e ancoragem de macromoléculas (OLIVEIRA et al., 2017b; SORUSHANOVA et al., 2018).

2.2.2.2 Hidrolise do colágeno

A tripla hélice do colágeno nativo é altamente resistente à ação da maioria das proteases, porém, a collagenase torna a molécula do colágeno um alvo fácil para outras enzimas que possuem propriedades collagenolíticas como a tripsina e quimiotripsina. As collagenases são capazes de degradar a hélice tripla do colágeno em cerca de três quartos do comprimento da molécula no N-terminal, em Gly775-/Ile na cadeia alfa1 (OLIVEIRA et al., 2020) A clivagem do colágeno por collagenases leva à formação de fragmentos de colágenos que por sua vez podem ser hidrolisados por proteases de atividade collagenolítica, formando os peptídeos de colágeno como representado na Figura 4 (LIMA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2017b).

Figura 4 - Imagem ilustrativa da hidrólise do colágeno.



Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

Entre todos os tipos de collagenases, as metalocolagenases desempenham um papel importante clivando de forma rápida o colágeno dos tipos I, II e III. A conformação da tripla hélice do colágeno está relacionada à ação deste tipo de collagenase que atua em um local definido (SILVA et al., 2018; SORUSHANOVA et al., 2018). As ligações peptídicas presentes nos vários tipos de colágeno também podem ser hidrolisadas por proteases que possuem propriedade collagenolíticas, quando, por exemplo, o colágeno é desnaturado e hidrolisado por proteases como a tripsina e quimiotripsina (HELLING et al., 2017; SORUSHANOVA et al., 2018).

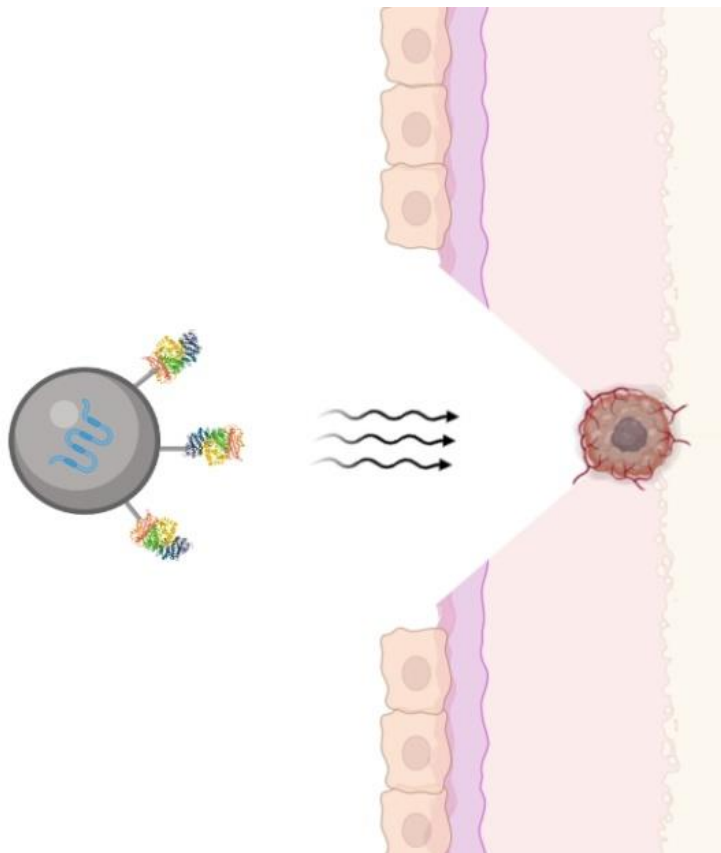
O colágeno também interage com enzimas envolvidas na sua biossíntese e/ou degradação. No processamento alimentício industrial, o colágeno e/ou seus fragmentos podem ser utilizados na preparação de alimentos e bebidas, para melhorar a elasticidade, consistência e estabilidade do produto, aumentando a qualidade dos produtos voltados para nutrição e saúde (HELLING et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017b).

2.2.3 Aplicação da collagenases

Na indústria, collagenases podem ser encontradas nos segmentos alimentício, têxtil, farmacêutico, terapêutico e médico. Podem ser utilizadas de duas formas: na aplicação direta em soluções tópicas a partir da adição de collagenase em pomadas ou biofilmes e na utilização do produto gerado a partir da sua reação na hidrólise do colágeno, como peptídeos bioativos (SILVA et al., 2018; ABOOD et al., 2018).

No estudo de Villegas et al. (2015), foi utilizado com êxito uma nanocápsula híbrida contendo collagenase em sua superfície para auxiliar na penetração do tecido, resultando na entrega de medicamentos na área desejada como ilustrado na Figura 5. Esta estratégia pode melhorar a eficácia terapêutica dos atuais nanomedicamentos, permitindo uma distribuição mais homogênea e profunda nos tecidos.

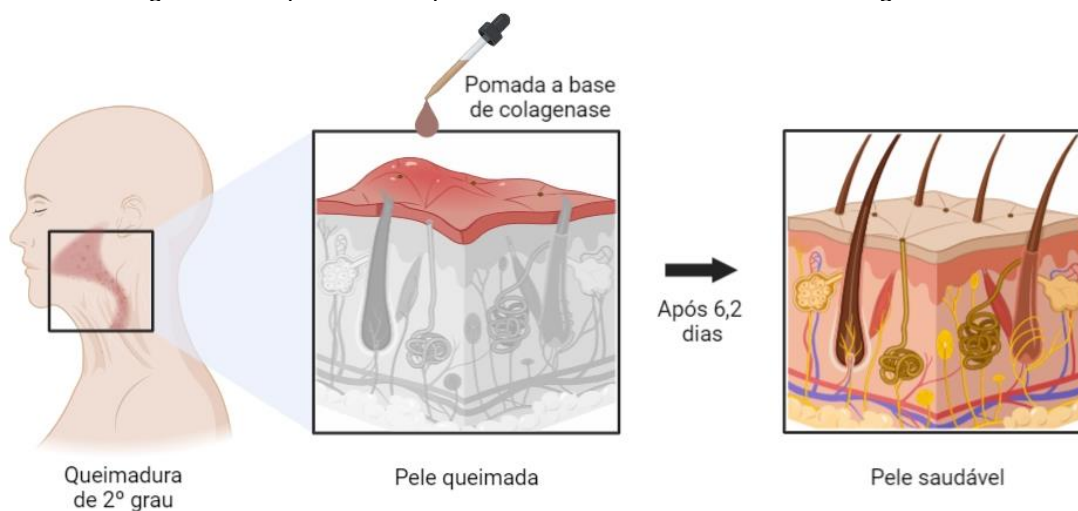
Figura 5 - Nanocápsula híbrida contendo collagenase na superfície para melhor penetração do tecido e liberação do medicamento na área desejada.



Fonte: Villegas et al. (2015). Adaptado. Criado com BioRender.

Teles et al. (2012) utilizaram a collagenase tópica para o tratamento de queimaduras de segundo grau no rosto e pescoço, avaliando o tempo de cicatrização e taxa de infecção (Figura 6). As bolhas da queimadura e as feridas foram higienizadas, e posteriormente aplicada uma fina camada de collagenase, 1 vez por dia. Os autores concluíram que o uso da collagenase reduziu o tempo da cicatrização epidérmica de 10,5 dias para 6,2 dias sem evidências de infecções, viabilizando o uso da enzima para tratamento de queimaduras.

Figura 6 - Esquema exemplificando o tratamento utilizando collagenase.

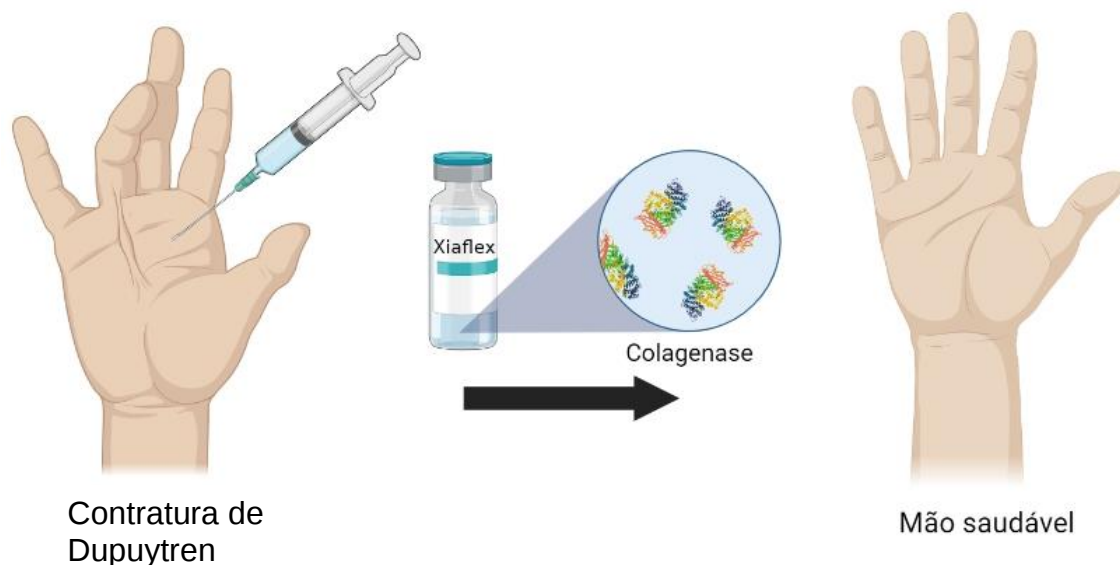


Fonte: Teles et al. (2012). Adaptado. Criado com BioRender.

São inúmeras as vantagens do uso de collagenase no tratamento de feridas por possuir capacidade de hidrolisar vários tipos de colágeno, removendo o tecido necrosado com maior eficiência de forma indolor e não-hemorrágica, atraindo macrófagos e fibroblastos para o local da ferida estimulando a formação de tecidos de granulação, provendo a cicatrização. A collagenase pode ser usada por longos períodos em associação com outros medicamentos (HELLING et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017a).

A collagenase vem se destacando na medicina pela sua capacidade de decompor o colágeno sem afetar as propriedades de outras proteínas, sendo utilizada no tratamento de doenças como a Peyronie, caracterizada pelo desenvolvimento de uma placa de colágeno que se instala no corpo cavernoso impedindo a sua expansão, afetando cerca de 65 a 120 mil pessoas todos os anos; na doença de Dupuytren (Figura 7), uma condição progressiva que faz com que os dedos se dobrem em direção à palma da mão, resultado da acumulação de depósitos de colágeno na fáscia formando cordões impedindo que os dedos se endireitem normalmente; na osteoartrite; no tratamento de miomas uterinos e no câncer colorretal (LIMA et al., 2013; ABOOD et al., 2018).

Figura 7 - Imagem esquemática do tratamento da contratura de Dupuytren usando Xiaflex.



Fonte: Clinical Trials Arena (2019). Adaptado. Criado com BioRender.

Como observado na Figura 7, o paciente obteve redução significativa dos sintomas da contratura de Dupuytren utilizando aplicação local de Xiaflex, medicamento injetável a base de colagenase liofilizada de *Clostridium histolyticum* aprovado e comercializado nos Estados Unidos, Canadá e Europa. Xiaflex custa cerca de 4 mil dólares a injeção, podendo atingindo acima de 24 mil dólares o tratamento (CLINICAL TRIALS ARENA, 2019). A colagenase age hidrolisando o cordão de colágeno acumulado na fáscia da palma da mão, permitindo a normalização dos movimentos dos dedos do paciente portador da contratura de Dupuytren.

2.3 PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS

Produtos comerciais como enzimas, proteínas, anticorpos, moléculas orgânicas, entre outros necessitam passar por processos de concentração e purificação, principalmente se a molécula extraída possuir como objetivo final o uso terapêutico, onde é necessário um grau de pureza considerável. As técnicas tradicionais de concentração e purificação se resumem a processos de precipitação, centrifugação, diálise e cromatografias (Figura 8).

Figura 8 - Etapas/técnicas de purificação convencional.



Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

Para se obter um elevado grau de pureza, é necessário aplicar estas etapas sucessivamente, demandando tempo, reduzindo o rendimento e elevando os custos do processo. Cada etapa aplicada apresenta um custo alto de operação, elevando o custo final do produto comercializado. Cerca de 80% do valor final está relacionado a etapas de produção e purificação, indicando a necessidade de desenvolvimento de novos métodos mais simples e eficientes (ALVES et al., 2017; SILVA et al., 2018).

2.3.1 Purificação de biomoléculas por partícula magnética

O método de purificação por partícula magnética possui várias vantagens em comparação com as tradicionais. Essa técnica reduz o gasto desnecessário de tempo e pode ser utilizada na purificação de enzimas sem tratamento prévio, diretamente do extrato bruto. No campo da biologia molecular, química e medicina de diagnóstico as micro e nanopartículas magnéticas são usadas para purificação de extratos variados por possuírem propriedades magnéticas somente na presença de um campo magnético externo, podendo o alvo ser facilmente separado de outras soluções, eliminando etapas utilizada nos processos convencionais (Figura 9) (ALVES et al., 2017; LIU et al., 2018).

Figura 9 - Etapas de purificação utilizando partícula magnética.



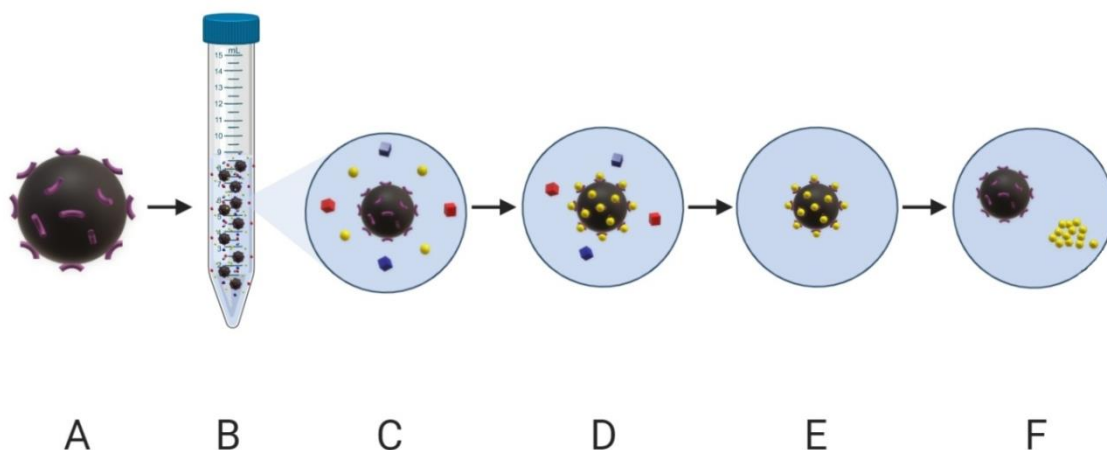
Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

Em geral, a purificação de biomoléculas por partícula magnética baseia-se no princípio da separação por afinidade (CAO et al., 2012) como exemplificado na Figura 10.

Quando a partícula magnética possui mais de um componente em sua estrutura, chamamos de composto magnético, formado por dois componentes básicos: o material magnético (óxido de ferro, níquel, cobre, etc) e o ligante, elemento que possui afinidade com a biomolécula de interesse, componente chave para obter êxito na purificação. A partícula magnética é exposta ao extrato bruto, o ligante reconhece a biomolécula e o complexo partícula magnética-biomolécula é formado. Após lavagens para excluir o extrato excedente, o complexo pode ser desfeito com aumento de força iônica, obtendo a biomolécula purificada e a partícula magnética que poderá ser utilizada em outros processos de purificação.

O uso de partícula magnética mostrou um potencial específico para o isolamento enzimático, mais fácil de operar, de baixo custo e mais eficiente que quando comparados aos métodos tradicionais já existentes, obtendo melhor estabilidade, podendo ser utilizado e reutilizado para purificar biomoléculas complexas.

Figura 10 - Exemplo de purificação de biomoléculas por partícula magnética. (A) Partícula magnética com ligante específico em sua superfície; (B) Extrato bruto contendo a biomolécula de interesse para purificação; (C) Partícula magnética exposta ao extrato bruto; (D) O ligante presente na superfície da partícula reconhece a biomolécula formando o complexo partícula magnética-biomolécula; (E) O complexo partícula magnética-biomolécula é coletado por um campo magnético externo, e o restante do extrato bruto removido; (F) Eluição do complexo partícula magnética-biomolécula, obtendo a separação da proteína purificada.



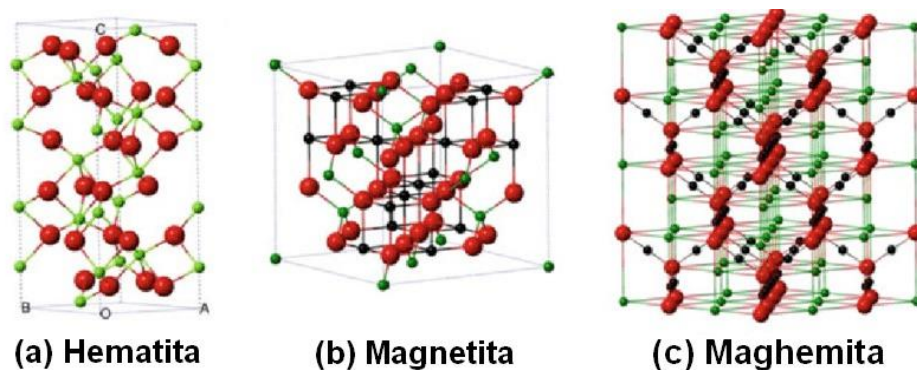
Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

2.4 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As partículas magnéticas possuem um núcleo magnético composto por cristais de metal, liga metálica ou óxido metálico, podendo conter uma estrutura com um ou mais metais que sejam magnéticos como o ferro, cobre, cobalto, níquel, zinco, entre outros. Algumas partículas magnéticas possuem características únicas que são obtidas de acordo com a morfologia e tamanho da partícula. É o caso da magnetita (Fe_3O_4), óxido de ferro geralmente formado pelo método de co-precipitação de cloreto ferroso (Fe^{+2}) e cloreto férrico (Fe^{+3}) em meio alcalino; a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) geralmente obtida por meio da oxidação da magnetita, podendo ser um processo natural ou induzido; ou até mesmo a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), uma transição de fase da magnetita obtida através da variação de temperatura do meio, estruturas que podem ser observadas na Figura 11 (WU et al., 2015; TÍQUIA-ARASHIRO &

RODRIGUES, 2016; ROTH et al., 2016; LIU et al., 2018; SCHWAMINGER et al., 2018; CABRERA et al., 2019).

Figura 11 - Estrutura da Hematita, Magnetita e Maghemita.



Fonte: Wu et al. (2015). Adaptado. Copyright 2015, Taylor e Francis.

Esses óxidos de ferro possuem propriedades magnéticas, elétricas e físico-químicas únicas, tornando-os partículas interessantes para aplicação nas diversas áreas biotecnológicas. Comumente, as partículas magnéticas são revestidas com um material polimérico que auxilia na sua funcionalidade e pode facilitar na adsorção de um ligante (CAO et al., 2012; ROTH et al., 2016; QU et al, 2017).

2.5 LIGANTE: AZOCOLL

O êxito obtido na purificação de biomoléculas por partículas magnéticas é atribuído ao ligante: elemento que possui afinidade com a biomolécula a ser purificada. O ligante é a peça chave para um bom funcionamento da técnica e na obtenção de resultados satisfatórios na purificação, como: rendimento e elevação de atividade da biomolécula. O ligante deve preferencialmente ser insolúvel, possuir um peso molecular razoável, e ter afinidade com a proteína alvo.

O azocoll é um conjugado entre colágeno e um azo corante (vermelho brilhante), insolúvel, que apresenta uma cor roxa na solução (Figura 12). Este conjugado é um substrato amplamente utilizado para dosagem específica de atividade collagenolítica. O colágeno presente no conjugado é hidrolisado pela

colagenase liberando moléculas solúveis do azo corante na solução. O aumento na intensidade da cor está diretamente relacionado à quantidade de protease presente na solução. Relatos anteriores mostraram que a hidrólise de azocoll progrediu em função do tempo, com taxas lineares em função da concentração da enzima (CHAVIRA et al., 1984).

Figura 12 - Azocoll: Colágeno impregnado com azocorante vermelho brilhante.



Fonte: A autora (2022).

2.6 APLICAÇÃO DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Características como inércia química, maior superfície de interação/adsorção, baixa toxicidade, alta biocompatibilidade (quando revestidos com um polímero, por exemplo), melhor estabilidade da biomolécula alvo imobilizada, o superparamagnetismo (resposta magnética observada apenas após a aplicação do campo magnético) podendo ser recuperada pelo uso de um ímã, e um método de síntese efetivo, são algumas das vantagens do uso de nanopartículas (IYPEA et al., 2017; QU et al., 2017; SCHWAMINGER et al., 2018; CABRERA et al., 2019) em processos biotecnológicos quando comparada com outras partículas magnéticas.

As partículas magnéticas têm despertado cada vez mais atenção, não apenas pela sua fácil separação por um campo magnético externo, mas

também pelas suas potenciais aplicações em vários domínios como a biomedicina, o diagnóstico e o setor alimentício, exemplificados na Figura 13. A conjugação de partículas magnéticas com biomoléculas como proteínas, DNA, enzimas, anticorpos, etc. tem muitas aplicações diferentes, incluindo catálise, biossensibilidade, administração direcionada de fármacos, purificação e imobilização de proteínas (CAO et al., 2012; SCHWAMINGER et al., 2018; LIU et al., 2018).

Figura 13 - Principais aplicações biotecnológicas das partículas magnéticas.



Fonte: Cabrera et al. (2019). Adaptado. Criado com BioRender.

3 ARTIGO 1 – PARTÍCULA MAGNÉTICA DE ÓXIDO DE FERRO COM LIGANTE ESPECÍFICO PARA A RÁPIDA PURIFICAÇÃO DE COLAGENASE

Layla C. Mahnke^a, Maria Helena M. Estevam Alves^a, Roberto A. da Silva^a, Iasmim L. de Lima^a, Vagne M. Oliveira^b, Ana Lúcia F. Porto^{a,b}, Ranilson S. Bezerra^c, Luiz B. de Carvalho Júnior^{a,*}

^a Instituto Keizo Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Departamento de Bioquímica (Laboratório de Enzimologia - LABENZ), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Corresponding author: lbcj.br@gmail.com

Resumo

As colagenases podem ser rapidamente purificadas a partir de extratos brutos por afinidade usando uma partícula magnético contendo azocoll (colágeno ligado covalentemente a um azocorante) (MPs-Azocoll). Neste trabalho, colagenase foi purificada de vísceras de tilápia (*Oreochromis mossambicus*). Obteve-se uma preparação contendo 306,7 U/mg de proteína; 16,6 vezes purificada e um rendimento de 33% em comparação com o extrato bruto, bem como uma única banda de proteína foi exibida na eletroforese correspondendo a um peso molecular de aproximadamente 30 kDa. MPs-Azocoll também foi analisado por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (XRD), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia (EDX). O compósito apresentou a magnetita como fase dominante com morfologia heterogênea e presença de Azocoll.

Palavra-chave: Azocoll; Compósito magnético; Colagenase; Purificação.

1 Introdução

O desenvolvimento de partículas magnéticas (MPs) vem se tornando cada vez mais importante em diferentes ramos da biomedicina e da biotecnologia [1]. O controle preciso das condições de síntese é essencial para a produção de compósitos magnéticos funcionais. Além disso, é indispensável conhecer suas estruturas e outros detalhes de características quanto à aplicabilidade dessas MPs [2].

Em nosso laboratório, MPs foram sintetizadas contendo um ligante específico e utilizadas para purificação de enzimas [3]. Várias enzimas foram identificadas e purificadas a partir de vísceras de peixes: pepsina e serina proteases [4, 5]; tripsina [6-13]; quimotripsina [14]; acetilcolinesterase [15-20] e collagenases [21-23]. Esses materiais geralmente são descartados e a obtenção dessas enzimas a partir deles pode agregar valores econômicos para as indústrias pesqueiras, bem como minimizar os danos ambientais causados por esses resíduos.

As espécies de peixes de água doce representarão cerca de 60% da produção total da aquicultura até 2025 [24, 25] e suas vísceras constituem aproximadamente 20% da biomassa [26].

Este trabalho propõe uma nova técnica de purificação de collagenase (EC 3.4.24.7) em apenas uma etapa baseada na afinidade de ligação usando um compósito magnético contendo como ligante específico derivado de colágeno (azocoll) (MPs-Azocoll). Como modelo, a enzima de vísceras de tilápia (*Oreochromis mossambicus*) foi purificada de suas vísceras.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Albumina de soro bovino (BSA), anilina (ACS agent), glutaraldeído (25%) e azocoll foram obtidos a partir da Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemanha). Ácido tricloroacético (TCA) foi adquirido pela Vetec Chemical (Rio de Janeiro, Brazil). Cloreto férrico hexahidratado e Cloreto férrico tetrahidratado foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2 Síntese da Partícula Magnética com Azocoll

Este procedimento foi realizado de acordo com Alves et al. [3]. Resumidamente, uma mistura aquosa (100 mL) contendo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,1 M) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,6 M) foi adicionada a uma quantidade de azocoll (10 mg), então, foi adicionado hidróxido de amônio 28,0-30,0% para atingir o pH até 11. A mistura foi aquecida a 50 °C sob agitação vigorosa. O precipitado magnético e preto foi coletado por um ímã externo, lavado com água destilada, seco a 50 °C e mantido a 25 °C para uso posterior.

2.3 Obtenção do Extrato Bruto de Peixe

Espécimes de tilápia (*O. mossambicus*) foram capturados no tanque de peixes do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil). As vísceras foram coletadas e homogeneizadas (1 mg de tecido mL⁻¹, p/v, em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) usando um homogeneizador de tecido (COLE-PARMER Modelo 04369-15). A preparação

resultante foi centrifugada a 10.000g por 25 min a 4 °C para remover a gordura. O sobrenadante (extrato bruto) foi congelado a -20 °C e usado para outras etapas de purificação.

2.4 Purificação de Colagenases e Reuso

MPs-Azocoll (0,1 g) foi incubado separadamente com o extrato bruto de peixe de *O. mossambicus* por 2 h a 4 °C sob agitação. Após esse tempo, as partículas foram coletadas com campo magnético externo e lavadas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, para remover as proteínas não complexadas. Em seguida, foi adicionado NaCl 3M (2mL). O primeiro sobrenadante e as lavagens foram coletados para determinações de proteínas e atividades enzimáticas. Para testar a reutilização do MPs-Azocoll, o processo de purificação descrito acima foi repetido quatro vezes usando um extrato bruto de peixe incubado com a mesma preparação de MPs-Azocoll.

2.5 Determinação da Atividade Colagenolítica e Proteínas Totais

A atividade da collagenase foi determinada de acordo com metodologia usando azocoll como substrato [14]. Resumidamente, uma mistura de reação, contendo 5 mg de azocoll, 500 µL de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) com 5 mM CaCl₂ e 500 µL de extrato bruto, foi incubada a 55 °C por 30 min, sob agitação. Em seguida, 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 40% foram adicionados para interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4 °C. A leitura dessas amostras centrifugadas foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Biotech Ultrospec 3000 Pro) no comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida

como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 595 nm. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. A concentração de proteína foi determinada usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão [27].

2.5 Eletroforese (SDS-PAGE)

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com a metodologia usando gel de empilhamento de 6% (p/v) e gel de separação de 12,5% (p/v) [28], bem como empregando marcadores de peso molecular Amersham ECL rainbow. Os géis foram corados por nitrato de prata [29].

2.6 Caracterização de MPs-Azocoll

2.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Dispersão de energia por Raio-X (EDX)

Um microscópio eletrônico de varredura FEI Nova 200 com analisador de raios-X dispersivo de energia integrado foi usado para estudos morfológicos. As amostras foram revestidas com Au (para análise SEM), a 100 kV e para EDX, as amostras não foram revestidas.

2.6.2 Difração de Raio-X (XRD)

As propriedades estruturais das partículas magnéticas foram caracterizadas por difração de raios-X, que foi realizada em um difratômetro de raios-X Siemens D5000. Amostras representativas em pó foram analisadas na faixa de $10^\circ < 2\theta < 90^\circ$ usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), em etapas de

0,02° e com tempo de contagem de 1,0 s por etapa. O tamanho dos cristalitos formados foi estimado usando a equação de Scherrer descrita abaixo:

$$(1) \quad D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta}$$

D é o tamanho do cristalito;

K é o fator de forma de cristalito;

λ é o comprimento de onda utilizado no raio-X;

β é a largura a meia altura do pico de difração de raios-X em radianos;

θ é o ângulo (Bragg) de difração dos picos analisados.

2.6.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro FTIR IFS-66 (Bruker, Billerica, MA, EUA) na faixa de 4000-600 cm⁻¹ usando pellets de KBr. Normalmente, 100 varreduras foram gravadas com uma resolução de 4 cm⁻¹.

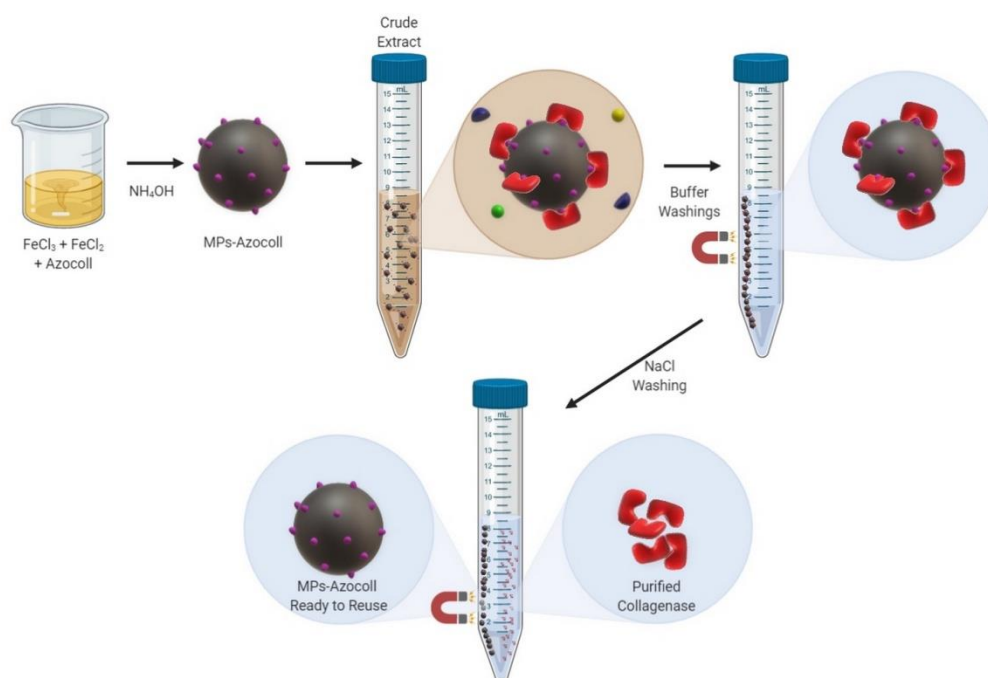
3 Resultados e Discussão

3.1 Purificação de Colagenase

As colagenases são enzimas proteolíticas capazes de degradar a tripla hélice do colágeno em cerca de três quartos do comprimento da molécula no N-terminal, em Gly775-/Ile na cadeia alfa1(I) [23]. Por outro lado, o colágeno compõe uma família de proteínas fibrosas insolúveis e estruturais de

fundamental importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo [30]. Aqui, o colágeno ligado covalentemente ao um azo corante foi usado como substrato para a medição enzimática ou como ligante introduzido nas partículas magnéticas de óxido de ferro (MPs-Azocoll). As collagenases têm sido sugeridas na terapia enzimática para o tratamento de condições associadas ao colágeno [31]. As collagenases de vísceras de *O. mossambicus* foram purificadas por um procedimento de uma etapa usando MPs-Azocoll. O princípio deste método é mostrado esquematicamente na Figura 1.

Figura 1 - Processo de síntese e purificação utilizando MPs-Azocoll.



Fonte: A autora (2022). Criado com BioRender.

Primeiramente, as partículas são facilmente sintetizadas produzindo o composto magnético (MPs-Azocoll) e o extrato bruto é incubado com elas. A

colagenase presente no extrato bruto reconhece o substrato azocoll na MPs-Azocoll e se liga a ele. O complexo de MPs-Azocoll-colagenase é formado, com auxílio de um campo magnético externo, as partículas são coletadas e as lavagens são realizadas para remover as proteínas não complexadas. Por fim, o complexo MPs-Azocoll-colagenase é desfeito utilizando o aumento de força iônica (3M NaCl), as MPs-Azocoll são coletada novamente pelo campo magnético externo, obtendo a colagenase purificada. É importante registrar que o MPs-Azocoll pode ser reutilizado.

A Tabela 1 resume o desempenho da purificação da colagenase usando MPs-Azocoll.

Tabela 1 - Purificação de colagenase de *O. mossambicus* com MPs-Azocoll.

Amostra	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato Bruto	1.50	27.8	18.5	100	1
MPs-Azocoll	0.03	9.2	306.7	33.1	16.6
MPs	0.05	1.06	21.2	3.8	1.14

Todas as operações foram realizadas a 4 °C

Uma preparação com atividade 16,6 vezes maior do que a encontrada no extrato bruto foi obtida com atividade específica de 306,7 U/mg de proteína e rendimento de 33,1%. O extrato bruto também foi incubado com MPs sem ligante como controle e uma purificação insignificante foi observada (1,14 vezes). Este achado é a favor da afinidade enzima-substrato. A ausência de liberação de cor das MPs-Azocoll pela enzima

complexada sugere que nesta condição ela não catalisou a hidrólise do substrato. Provavelmente, o impedimento estérico evitaria a ação catalítica.

O MPs-Azocoll recuperado após a purificação foi reutilizado conforme sugerido na Figura 1 e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Reuso das partículas MPs-Azocoll.

Amostra	Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato Bruto	1.45	45.4	31.5	100	1
1º Reuso	0.03	15	500	33	15.9
2º Reuso	0.03	14.6	486.7	32.2	15.5
3º Reuso	0.03	14.2	473.3	31.2	15.02
4º Reuso	0.03	14.1	470	31	14.92

Todas as operações foram realizadas a 4 °C

Após o quarto reuso com a mesma preparação de MPs-Azocoll foi mantida cerca de 90% da eficiência de purificação, observado-se a efetividade na purificação de collagenases de vísceras de peixes. Desempenho semelhante entre os reusos foram observados: atividade específica, rendimento e purificação foram de $482,61 \pm 13,63$ U/mg, $32 \pm 1,41\%$ e $15,34 \pm 0,45$ vezes, respectivamente. Resultados comparáveis de reutilização foram relatados usando a partícula magnética de azocaseína para purificar tripsina quatro vezes [3] corroborando a vantagem reutilizável das MPs como outra característica deste material [32].

As técnicas usuais de purificação de enzimas abrangem várias etapas, são caras e demoradas, portanto, MPs representam uma alternativa

interessante e muito promissora para etapas de purificação, como baixo custo, alta reutilização e recuperação [3, 33]. Cerca de 80% do custo total de uma enzima comercializada está relacionado às etapas de produção e purificação, levando ao desenvolvimento de novos métodos inovadores [33].

A Tabela 3 lista os métodos de purificação de collagenases de vísceras de peixes e microorganismos relatados na literatura, que são comparados com os resultados atuais.

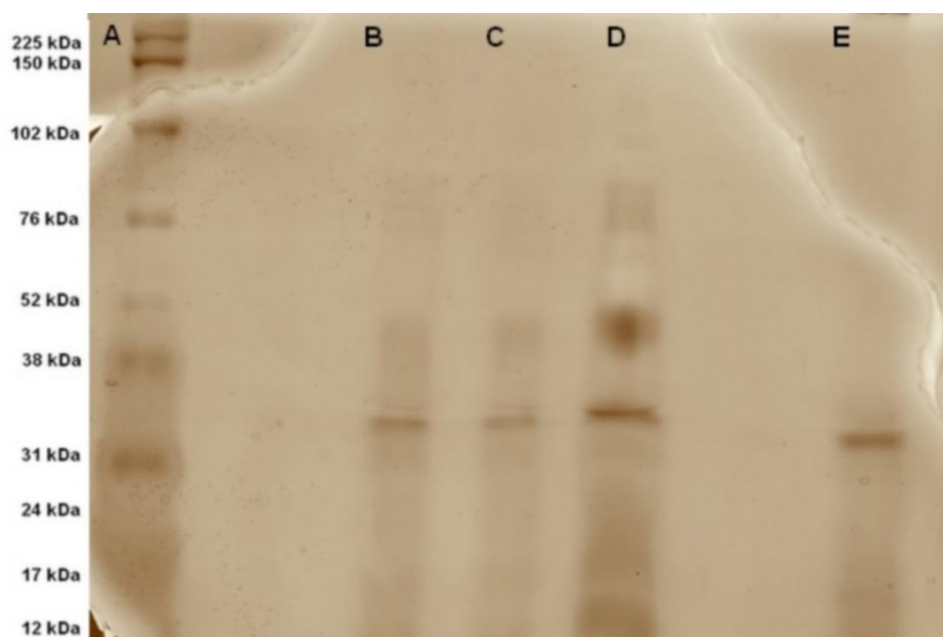
Tabela 3 - Resultados da purificação de colagenase de peixe e microorganismo.

Nome Científico	Espécie	Método de Purificação	Purificação	Rendimento (%)	Peso Molecular (kDa)	Referência
<i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269	Microorganismo	ATPS polyethylene glycol-PEG + Citrate	7.8	157.5	N/I	[45]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Microalga	ATPS polyethylene glycol-PEG + Phosphate	10.7	244.4	N/I	[46]
<i>Cichlaocellaris</i>	Peixe	TPP t-butanol ratio of 1:0.5 (v/v) + 30% (NH ₄) ₂ SO ₄	5.07	239.2	Duas subunidades 60 e 10	[23]
<i>Scomber japonicus</i>	Peixe	Acetone precipitate + DEAE Sephadex A-50 + Sephadex G-100 + DEAE Sephacel + Sephadex G-75	39.5	0.1	N/I	[34]
Muscles, fins and bones of mixed fish samples of haddock, herring, ground fish and flounder	Peixe	Ammonium sulfate + Free solution + Sephadex G-100	15.7	22.77	Duas subunidades 50 e 10	[35]
<i>Pseudomonas</i> sp.	Microorganismo	Ammonium sulfate + Octyl-sepharose + Chromatography	13	3.6	34	[49]
<i>Sardinella aurita</i>	Peixe	Ammonium sulfate + Sephadex G-100	3.82	6.8	14.2	[50]
<i>Bacillus licheniformis</i> F11.4	Microorganismo	Ammonium sulfate + DEAE Sephadex A-50	26.3	2.6	Duas subunidades 124 e 26	[51]
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Microorganismo	ATPS polyethylene glycol-PEG + Phosphate	5.3	48.1	39.16	[52]
<i>Aspergillus</i> sp. UCP1276	Microorganismo	Acetone precipitate + DEAE-Sephadex G-50 + Superdex-75 AKTA control	2.09	22.85	28.7	[53]
<i>Scorpaenanotata</i>	Peixe	Ammonium sulfate + Gel filtration + Ion exchange	4.89	6.69	24	[54]
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> NRC2aza	Microorganismo	Ammonium sulfate + Sephacryl S-200 + DEAE-Sepharose	6.23	3.33	Duas subunidades 35 e 40	[55]
<i>Aspergillus tamari</i> URM4634	Microorganismo	Acetone precipitate + DEAE-Sephadex A50	2.8	25.1	49.3	[56]
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Peixe	MPs-Azocoll	16.6	33.1	~30	Este trabalho

N/I: Dados não informados pelo autor

A enzima purificada do peixe cavala (*Scomber japonicus*) foi purificada 39,5 vezes apresentando um rendimento de apenas 0,1% [34]. Os autores empregaram cinco etapas. O método proposto nesta contribuição utiliza apenas uma etapa e apresentou maior rendimento (cerca de 33%). A collagenase de uma mistura de resíduos de pescado apresentou purificação (15,7) e rendimento (22,7%) semelhantes em comparação com os resultados deste trabalho [35]. No entanto, os autores empregaram três etapas, incluindo alguns passos para obter a solução livre antes de aplicar na coluna Sephadex G-100. Os demais trabalhos apresentaram resultados inferiores em relação ao método proposto nesta contribuição. A Figura 2 apresenta o SDS-PAGE para a collagenase purificada por MPs-Azocoll. O peso molecular aproximado de 30 kDa pode ser estimado comparando a banda de proteína única (Figura 2-E) com os marcadores padrão.

Figura 2 - SDS-PAGE da collagenase purificada da víscera de tilápia usando MPs-Azocoll (E) comparada com o extrato bruto em diferentes diluições (B, C, and D) e marcador molecular (A).



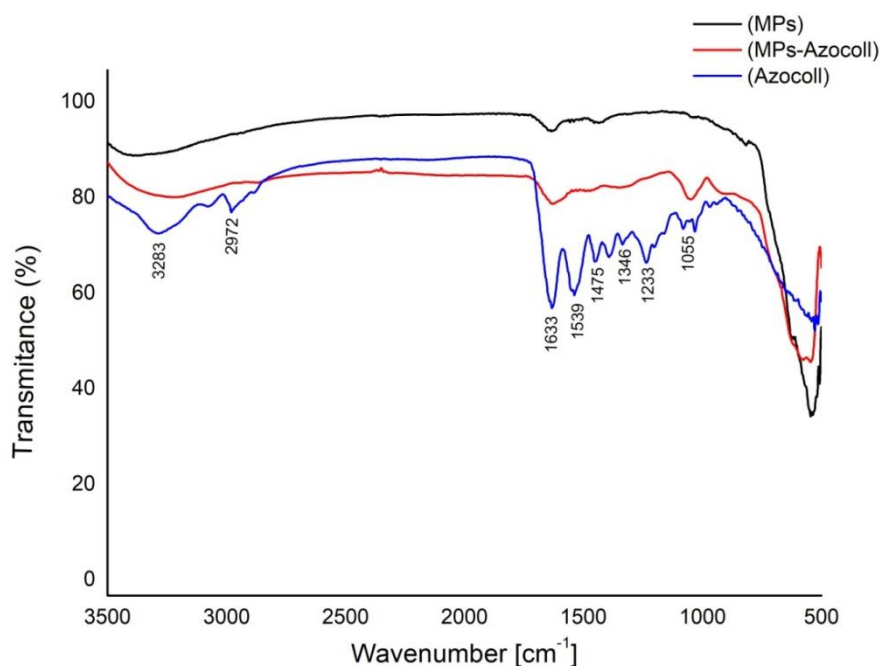
Este valor está de acordo com a maior parte do peso molecular da collagenase relatado na Tabela 3. As collagenases apresentam uma ampla faixa de pesos moleculares. Esses valores amplos são esperados porque as collagenases não possuem uma única estrutura ou uma única fonte [35]. Muitos estudos relataram peso da collagenase variando de 30 a 150 kDa [36].

3.2 Caracterização da MPs-Azocoll

3.2.1 Análise de FTIR

Azocoll é um substrato insolúvel em água composto de colágeno ligado covalentemente a um corante azo vermelho que é liberado após a hidrólise de peptídeos. É amplamente utilizado na quantificação da atividade collagenolítica. Para confirmar a presença de azocoll no MPs-Azocoll, a análise FTIR foi comparada com MPs e Azocoll na Figura 3.

Figura 3 - FTIR da MPs (preto), MPs-Azocoll (vermelho) and Azocoll (azul).



Os picos de Azocoll em 3283 cm^{-1} , 2972 cm^{-1} , 1539 cm^{-1} e 1475 cm^{-1} são característicos de azocoll representando, respectivamente, amida A, amida B, amida II e amida III, bandas típicas do colágeno [37]. A ligação --N=N-- do grupo azo é representada no pico em 1633 cm^{-1} [38] e os picos 1346 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} e 1055 cm^{-1} podem ser atribuídos à presença de compostos aromáticos e amina terciária revelado por FTIR em azocoll [39, 40]. Picos semelhantes com menor intensidade podem ser observados para MPs-Azocoll devido à menor quantidade de azocoll nas partículas magnéticas, mas são evidência da presença de azocoll nas MPs-Azocoll. Esses picos estão ausentes nos MPs.

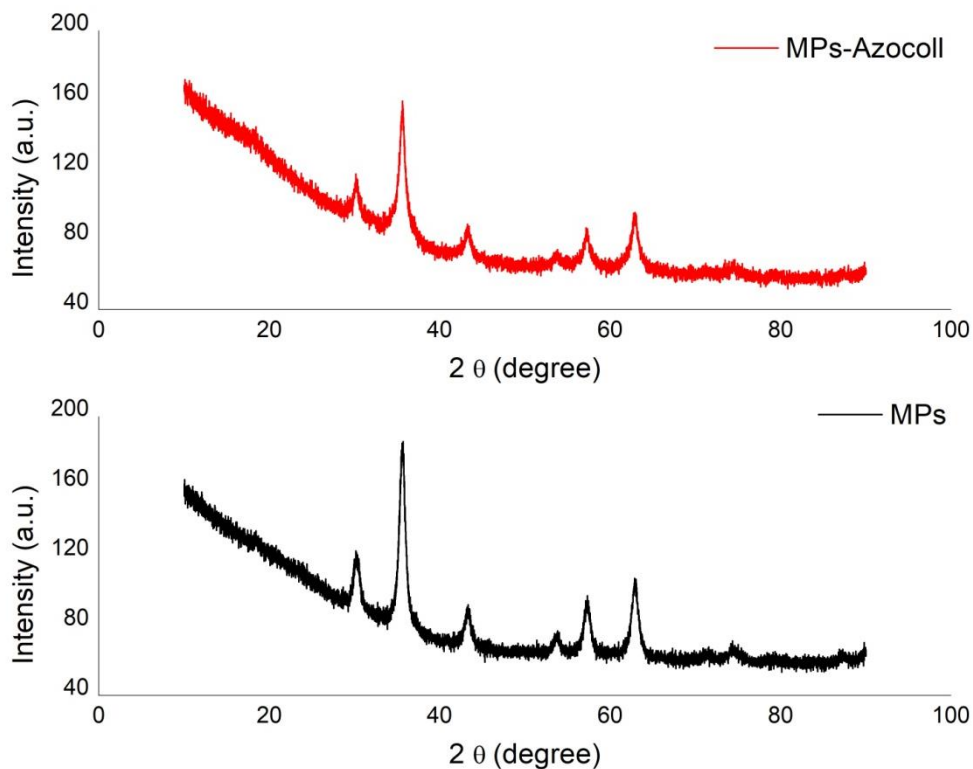
3.2.2 Difração de Raio-X

O XRD é usado para determinar as diferentes estruturas cristalinas apresentadas nas partículas magnéticas. Os MPs eram muito escuros e magnéticos, sugerindo que a magnetita poderia ser a fase dominante, embora a maghemita não possa ser excluída [41]. A Figura 4 mostra o XRD para MPs e MPs-Azocoll.

Em ambos os difratogramas é possível observar seis picos proeminentes. Os picos para MPs foram encontrados no ângulo 2θ igual a $30,2$; $35,5$; $43,3$; $53,8$; $57,3$ e $62,8$ podem ser atribuídos aos planos cristalinos em (220), (311), (400), (422), (511) e (440), que podem se referir a magnetita e maghemita, de acordo com o Centro Internacional para Dados de Difração [42, 43, 44]. Para MPs-Azocoll observou-se um leve deslocamento angular e uma

diminuição na intensidade dos picos apresentados com ângulo 2θ de 30; 35,6; 43,1; 53,8; 57,2 e 62,6.

Figura 4 - XRD da MPs (preto) e MPs-Azocoll (vermelho).



Quando Fe_3O_4 são sintetizados com outros elementos é esperado um pequeno deslocamento de pico em relação aos MPs, provavelmente devido a tensões na estrutura cristalina da magnetita ocorridas durante a síntese do material [44]. A concentração desses componentes também influencia nos deslocamentos e na intensidade de dos picos no difractograma. Desta forma, os resultados de XRD confirmam os resultados de FTIR.

Uma ferramenta muito utilizada na caracterização de cristalitos é a equação de Scherrer que relaciona a largura dos picos da difração de raios-X com o tamanho dos cristalitos [45, 46]. De acordo com a Eq. (1), o tamanho aproximado do cristalito de MPs-Azocoll foi estimado entre 7-10 nm. O

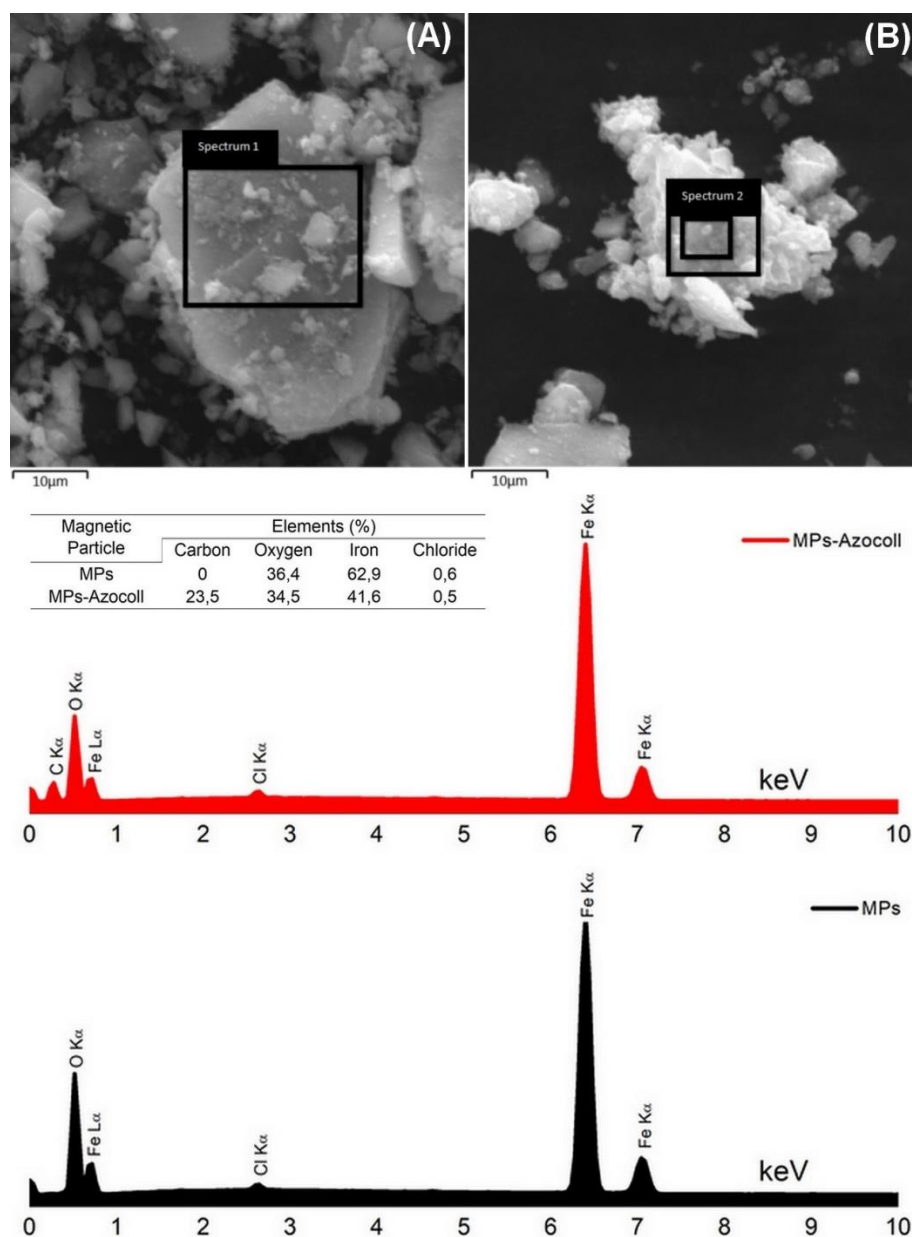
alargamento do pico de difração diminui com o aumento do tamanho do cristalito [45].

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Raio-X por dispersão em energia

A Figura 5 apresenta SEM de MPs (A) e MPs-Azocoll (B) mostrando ambas as partículas em aglomerados com uma morfologia heterogênea. Sob esta resolução não é possível distinguir qualquer diferença substancial.

A Figura 5-C apresenta a análise de energia dispersiva de raios-X (EDX) de MPs e MPs-Azocoll. Como previsível, o elemento carbono está presente apenas no MPs-Azocoll (23%). Obviamente, ferro e oxigênio são identificados em ambas as preparações (41% e 34% respectivamente). O cloreto também está presente como uma contaminação durante a síntese.

Figura 5 - Imagens da microscopia eletrônica de varredura da MPs (A) e MPs-Azocoll (B) e análise de energia dispersiva de raios-X (C).



4 Conclusão

A partir dos resultados apresentados acima, pode-se concluir que a utilização e o reuso de MPs-Azocoll mostrou-se eficiente na purificação da colagenase, purificando em apenas uma etapa com valores de rendimento e de

purificação, 33,1% e 16,6, respectivamente. A presença de azocoll nas partículas magnéticas é sugerida por bandas de absorção características de FTIR e pelo deslocamento dos picos obtida a partir de difratogramas de DRX. Portanto, MPs-Azocoll pode ser proposto como alternativa para purificação de proteases, por apresentar uma técnica mais rápida, eficaz e de baixo custo.

Conflito de interesses

Todos os autores declaram não haver conflito de interesse.

Financiamento

Este trabalho foi inteiramente executado no Instituto Keizo Asami – iLIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, e apoiado pelo CNPq (Bolsa LBCJ 301830/2017-7), CAPES e FACEPE (Bolsa LCM: 88882.380416/2019-01; MHMEA Bolsa: 88887.175808/2018-00).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao iLIKA, CNPq, CAPES e FACEPE.

Referências

- [1] M.P. Cabrera, D.F.M. Neri, F. Soria, L.B. Carvalho Jr, Magnetic Bio-Derivatives: Preparation and Their Uses in Biotechnology, Applied Surface Science, GurrappaInjeti, Intech Open, (2019).
<https://doi.org/10.5772/intechopen.85748>.
- [2] M. Munoz, Z.M. De Pedro, J.A. Casas, J.J. Rodriguez, Preparation of magnetite-based catalysts and their application in heterogeneous Fenton oxidation – A review, Applied Catalysis B: Environmental, 176–177, (2015) 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2015.04.003>

- [3] M.H.M. Estevam Alves, G.A.F. Nascimento, M.P. Cabrera, S.I.C. Silverio, C. Nobre, J.A.C. Teixeira, L.B. Carvalho Jr., Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite, *Food Chemistry*, 223, (2017), 75-78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094>
- [4] R.D.S. Bezerra, S.F.D. Santos, M.A.D.S. Lino, V.L.A. Vieira, L.B. Carvalho, Characterization of Stomach and Pyloric Caeca Proteinase of Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, (2000), 24, 189-199. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2000.tb00695.x>
- [5] R.S. Bezerra, J.F.E. Lins, R.B. Alencar, P.M.G. Paiva, M.E.C. Chaves, L.C. Coelho, L.B. Carvalho, Alkaline Proteinase from Intestine of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochemistry*, (2005), 40 (5), 1829-1834. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.066>.
- [6] R.S. Bezerra, J.F. Santos, P.M. Paiva, M.T. Correia, L.C. Coelho, V.L. Vieira, L.B. Carvalho, Partial Purification and Characterization of a Thermostable Trypsin from Pyloric Caeca of Tambaqui (*Colossoma Macropomum*). *Journal of Food Biochemistry*, (2001), 25, 199-210. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2001.tb00734.x>
- [7] A.A.G. Souza, I.P.G. Amaral, A.R. Espírito Santo, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Trypsin-like Enzyme from Intestine and Pyloric Caeca of Spotted Goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). *Food Chemistry*, (2007), 100 (4), 1429-1434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.12.016>.
- [8] T.S. Espósito, I.P.G. Amaral, D.S. Buarque, G.B. Oliveira, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Fish Processing Waste as a Source of Alkaline Proteases for Laundry Detergent. *Food Chemistry*, (2009), 112 (1), 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.049>.
- [9] T.S. Espósito, M. Marcuschi, I.P.G. Amaral, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Trypsin from the Processing Waste of the Lane Snapper (*Lutjanus synagris*) and Its Compatibility with Oxidants, Surfactants and Commercial Detergents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010), 58 (10), 6433-6439. <https://doi.org/10.1021/jf100111e>

- [10] M. Marcuschi, T.S. Espósito, M.F.M. Machado, I.Y. Hirata, M.V. Silva, L.B. Carvalho, V. Oliveira, R.S. Bezerra, Purification, Characterization and Substrate Specificity of a Trypsin from the Amazonian Fish Tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (2010), 396 (3), 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.155>.
- [11] A.C.V. Freitas-Júnior, H.M.S. Costa, M.Y. Icimoto, I.Y. Hirata, M. Marcondes, L.B. Carvalho, V. Oliveira, R.S. Bezerra, Giant Amazonian fish Pirarucu (*Arapaima gigas*): Its viscera as a Source of Thermostable Trypsin. *Food Chemistry*, (2012), 133 (4), 1596-1602. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.056>.
- [12] H.M. Costa, A.C. Freitas Júnior, I.P. Amaral, I.Y. Hirata, P.M.G. Paiva, L.B. Carvalho, V. Oliveira, R.S. Bezerra, Metal-sensitive and Thermostable Trypsin from the Crevalle jack (*Caranx hippos*) Pyloric Caeca: Purification and Characterization. *Chemistry Central Journal*, (2013), 7, 166. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-166>
- [13] R.C.P. França, C.R.D. Assis, J.F. Santos, R.J.S. Torquato, A.S. Tanaka, I.Y. Hirata, D.M. Assis, M.A. Juliano, R.O. Cavalli, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Immobilized onto Sepharose as a New Strategy to Purify a Thermostable Alkaline Peptidase from Cobia (*Rachycentron canadum*) Processing Waste. *Journal of Chromatography B*, (2016), 1033–1034, 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.028>.
- [14] V.M. Oliveira, T.P. Nascimento, C.R.D. Assis, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Study on Enzymes of Industrial Interest in Digestive Viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Journal of coastal life medicine*, (2017), 5, 233-238. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J6-300>
- [15] C.R.D. Assis, P.F. Castro, I.P.G. Amaral, E.V.M.M. Carvalho, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Characterization of Acetylcholinesterase from the Brain of the Amazonian Tambaqui (*Colossomamacropomum*) and in Vitro Effect of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (2010), 29, 2243-2248.

<https://doi.org/10.1002/etc.272>

- [16] K.C.C. Silva, C.R.D. Assis, V.M. Oliveira, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Kinetic and Physicochemical Properties of Brain Acetylcholinesterase from the Peacock bass (*Cichla ocellaris*) and in Vitro Effect of Pesticides and Metal ions. *Aquatic Toxicology*, (2013), 126, 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.001>.
- [17] M.C. Araújo, C.R.D. Assis, L.C. Silva, D.C. Machado, K.C.C. Silva, A.V.A. Lima, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, M.B.M. Oliveira, Brain Acetylcholinesterase of Jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From Physicochemical and Kinetic Properties to its Potential as Biomarker of Pesticides and Metal ions. *Aquatic Toxicology*, (2016), 177, 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.05.019>.
- [18] M.C. Araújo, C.R.D. Assis, K.C.C. Silva, K.S. Souza, R.S. Azevedo, M.H.M.E. Alves, L.C. Silva, V.L. Silva, M.L. Adam, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, M.B.M. Oliveira, Characterization of Brain Acetylcholinesterase of Bentonite fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of Application in Pesticides and Metal ions Biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, (2018), 205, 213-226. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.10.017>.
- [19] P.R. Souza, K.S. Souza, C.R.D. Assis, M.C. Araújo, K.C.C. Silva, J.F.X. Silva, A.C.M. Ferreira, V.L. Silva, M.L. Adam, L.B. Carvalho, R.S. Bezerra, Acetylcholinesterase of Mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae*: A Highly Thermostable Enzyme with Promising Features for Estuarine Biomonitoring. *Aquatic Toxicology*, (2018), 197, 109-121. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.008>.
- [20] D.F.C. Lopes, C.R.D. Assis, M.C.S. Sant'Anna, J.F. Silva, R.S. Bezerra, F.L. Frédou, Brain Acetylcholinesterase of Three Perciformes: From the Characterization to the in Vitro Effect of Metal Ions and Pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2019), 173, 494-503. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.047>.
- [21] C.R.D. Assis, V.M. Oliveira, J. Silva, Q.J. Silva, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Recovery of Fibrinolytic and Collagenolytic Enzymes from Fish

and Shrimp Byproducts: Potential Source for Biomedical Applications. Boletim Do Instituto De Pesca, (2019), 45, 389.

<https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/1340>

(Accessed 2021-09-06)

- [22] V.M. Oliveira, T.P. Nascimento, C.R.D. Assis, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Study on Enzymes of Industrial Interest in Digestive Viscera: Greateramberjack (*Serioladumerili*). Journal of Coastal Life Medicine 5, (2017), 233-238. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J6-300>
- [23] V.M. Oliveira, M.N.C. Cunha, C.R.D. Assis, J.M.S. Batista, T.P. Nascimento, J.F. Santos, C.A. Lima, D.A.V. Marques, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Separation and Partial Purification of Collagenolytic Protease from Peacock bass (*Cichlaocellaris*) Using Different Protocol: Precipitation and Partitioning Approaches. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, (2020), 24, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101509>.
- [24] FAO - The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA), 2018. ISBN: 978-92-5-130562-1, Rome, Italy, page: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>
- [25] FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture, Sustainability in action 2020. ISBN 978-92-5-132692-3, Rome, Italy. DOI: 10.4060/ca9229en
- [26] N. Bhaskar, N.S. Mahendrakar, Protein Hydrolysate from Visceral Waste Proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of Hydrolysis Conditions for a Commercial Neutral Protease. Bioresource Technology, 2008, 99 (10), 4105-4111. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.006
- [27] M.M. Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72 (1), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [28] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 1970, 227, 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

- [29] B.R. Oakley, D.R. Kirsch, N.R. Morris, A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 1980, 105, 361-363. DOI: 10.1016/0003-2697(80)90470-4
- [30] L.M. Soroushanova, Z. Delgado, N. Wu, A. Shologu, R. Kshirsagar, A.M. Raghunath, Y. Mullen, A. Bayon, M. Pandit, D.I. Raghunath, The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv. Mater.*, 2018. DOI: 10.1002/adma.
- [31] A.B. Shekhter, A.L. Fayzulin, M.N. Vukolova, T.G. Rudenki, V.D. Osipycheva, P.F. Litvitsky, Medical Applications of Collagen and Collagen-based Materials. *Current Medicinal Chemistry*, 2019, 26 (3), 506-516. DOI: 10.2174/0929867325666171205170339
- [32] Z. Liu, Y. Liu, S. Shen, D. Wu, Progress of Recyclable Magnetic Particles for Biomedical Applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6, 366. DOI: 10.1039/C7TB02941A
- [33] M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, W.W. Yu, Food Related Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Enzyme Immobilization, Protein Purification, and Food Analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 2012, 27 (1), 47–56. DOI: 10.1016/j.tifs.2012.04.003
- [34] J.P. Park, S.H. Lee, H.G. Byun, S.H. Kim, S.K. Kim, Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*, *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35, (2002), 576–582. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.576>
- [35] S.M. Daboor, S.M. Budge, A.E. Ghaly, M.S. Brook, D. Dave, Isolation and activation of collagenase from fish processing waste, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, (2012), 191-209. <http://doi.org/10.4236/abb.2012.33028>
- [36] S.K. Kim, P.J. Park, J.B. Kim, F. Shahidi, Purification and Characterization of a Collagenolytic Protease from the Filefish, *Novodonmodestrus*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 35(2), 165-171. DOI: 10.5483/BMBRep.2002.35.2.165

- [37] T. Riaz, R. Zeeshan, F. Zarif, K. Ilyas, N. Muhammad, S.Z. Safi, A. Rahim, S.A.A. Rizvi, I.U. Rehman, FTIR Analysis of Natural and Synthetic Collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2018, 53, 703-746. DOI: 10.1080/05704928.2018.1426595
- [38] G.S. Ghodake, A.A. Talke, J.P. Jadhav, S.P. Govindwar, Potential of Brassica Juncea in Order to Treat Textile-effluent-contaminated Sites. *International Journal of Phytoremediation*, 2009, 11, 297–312. DOI: 10.1080/15226510802429518
- [39] F. Ahmed, R. Dewani, M.K. Pervez, S.J. Mahboob, S.A. Soomro, Non-destructive FTIR Analysis of Mono azo Dyes. *Bulgarian Chemical Communications*, 2016, 48, 71–77. Page: http://www.bcc.bas.bg/BCC_Volumes/Volume_48_Number_1_2016/BC-C-48-1-2016-3791-Ahmed-71-77.pdf (Accessed 2021-09-06)
- [40] M.E.S. Mirghani, N.A. Kabbashi, I.Y. Qudsieh, F.A.A. Elfaki, New Method for the Determination of Toxic Dye using FTIR Spectroscopy. *IJUE Engineering Journal*, 2008, 9. DOI: 10.31436/ijuej.v9i2.98
- [41] J.C. Maciel, A.A.D. Mercês, M. Cabrera, W.T. Shigeyosi, S.D. Souza, M. Olzon-Dionysio, J.D. Fabris, C.A. Cardoso, D.F.N. Neri, M.P.C. Silva, L.B. Carvalho, Magnetic Nanoparticles Coated with Polyaniline to Stabilize Immobilized Trypsin. *Hyperfine interact*, 2016, 237. DOI: 10.1007/s10751-016-1264-y
- [42] S.P. Schwaminger, P. Fraga-garcía, F. Selbach, F.G. Hein, E.C. FuB, R. Surya, H.C. Roth, S.A. Blank-Shim, F.E. Wagner, S. Heissler, S. Berensmeier, Bio-nanointeractions: Cellulase on Iron Oxide Nanoparticle Surfaces, *Adsorption*, 2017, 23, 281-292. DOI: 10.1007/s10450-016-9849-y
- [43] A.L. Andrade, M.A. Valente, J.M.F. Ferreira, J.D. Fabris, Preparation of Size-controlled Nanoparticles of Magnetite. *Journal of Magn. Magn. Materials.*, 2012, 324, 1753–1757. DOI: 10.1016/j.jmmm.2011.12.033
- [44] J.C. Chen, C.C. Hu, Quantitative Analysis of YIG, YFeO₃ and Fe₃O₄ in LHPG - grown YIG rods. *Journal of Crystal Growth*, 2003, 249, 245–250. DOI: 10.1016/S0022-0248(02)02128-0

- [45] U. Holzwarth, N. Gibson. The Scherrer equation versus the 'Debye-Scherrer equation'. *Nature nanotech.*, (2011), 6, 534. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.145>
- [46] M. A. R. Miranda, J. M. Sasaki. The limit of application of the Scherrer equation, *Acta Cryst.* (2018), A74, 54-65. <https://doi.org/10.1107/S2053273317014929>
- [47] L.M.G. Fernandes, M.N.C. Cunha, J.C. Silva, A.L.F. Porto, T.S. Porto, Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate, *Journal of Molecular Liquids*, 317, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113957>
- [48] M.C.A. Wanderley, J.M.W. Duarte, A.F. Andrade, R.G. Melo, D.A.V. Marques, R.P. Bezerra, A.L.F. Porto, First report on *Chlorella vulgaris* collagenase production and purification by aqueous two-phase system, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100202>
- [49] M. Gautam, W. Azmi, Purification of Extracellular Collagenase from *Pseudomonas* sp: Remarkable Collagenolytic Activity, *Adv Biotech & Micro.*, 4(2), (2017), 555. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.04.555633>
- [50] B.K. Hayet, N. Rym, B. Ali, G. Sofiane, N. Moncef, Low molecular weight serine protease from the viscera of sardinelle (*Sardinella aurita*) with collagenolytic activity: Purification and characterization, *Food chemistry*, 124, (2011), 788-794. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.096>
- [51] A. Baehaki, M.T. Suhartono, D. Syah, A.B. Sitanggang, S. Setyahadi, F. Meinhardt, Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *African Journal of Microbiology Research*, 6(10), (2012), 2373-2379. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1379>
- [52] C.A. Lima, A.C.V. Freitas Junior, J.L. Lima Filho, A. Convertti, D.A.V. Marques, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto, Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis,

- Biochemical Engineering Journal, 75, (2013), 64–71.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.012>
- [53] C.M.O. Ferreira, P.C. Correia, R.M.P. Brandão-Costa, W.W.C. Albuquerque, T.P.S.L. Liu, G.M. Campos-Takaki, A.L.F. Porto, Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue, *Biomedical Chromatography*, 31, (2016).
<https://doi.org/10.1002/bmc.3882>
- [54] N. Aissaoui, M.N.M. Marzouki, F. Abidi, Purification and biochemical characterization of a novel intestinal protease from *Scorpaennotata*, *International Journal of Food Properties*, 20(2), (2017), 2151–2165.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1368550>.
- [55] A.A. Abood, M.M. Asmaa, B. Salman, M. Azza, A.E. Abdelfattah, A.M. Hashema, Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardia* sp. NRC2aza and its application in wound healing, *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, (2018) 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.030>
- [56] O.S. Silva, E.M. Almeida, A.H.F. Melo, T.S. Porto, Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamari* URM4634, *International Journal of Biological Macromolecules*, 117, (2018), 1081-1088.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.002>.

4 ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FATORES NO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO UTILIZANDO PARTÍCULA MAGNÉTICA COM AZOCOLL

Layla C. Mahnke^a, Maria Helena M. Estevam Alves^a, Ana Lúcia F. Porto^{a,b}, Luiz B. de Carvalho Júnior^{a,*}

^a Instituto Keizo Asami (iLIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Avenida professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author: lbcj.br@gmail.com

Resumo

Colagenases (EC 3.4.24.7) são enzimas proteolíticas capazes de degradar a tripla hélice do colágeno, possuindo atuação na regeneração tecidual, tornando-se essencial na área médica, cosmética e farmacêutica. A colagenase de extratos brutos pode ser rapidamente purificada utilizando compósito magnético contendo como ligante de afinidade o azocoll (colágeno ligado covalentemente ao azocorante). Este trabalho apresenta uma técnica de purificação em uma etapa mais rápida, de baixo custo e eficaz para colagenases à base de partículas magnéticas (MPs) contendo azocoll. Propõe-se um desenho experimental 2⁴ para otimizar o processo de purificação utilizando MPs-Azocoll, apresentando uma colagenase 43 vezes purificada com atividade específica 2866 U/mg, utilizando 100 mg de MPs-Azocoll feito com apenas 50 mg de Azocoll, incubado por 1 hora com 6 mL de extrato bruto. Os resultados estatísticos das análises elegem as variáveis Azocoll e Tempo significativas com o valor de p menor que 0,05. O modelo é significativo com valor de p 0,0159 e valor de F 3,32, rejeitando a hipótese nula. A atividade ótima da colagenase purificada foi observada em pH 8,0 e 50 °C. A atividade colagenolítica foi inibida por PMSF, um indicativo de uma serina-protease.

Palavra-chave: Planejamento fatorial; Variáveis; Design Expert; Colagenase.

1 Introdução

O colágeno compõe uma família de proteínas fibrosas estruturais e insolúveis de fundamental importância na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo [1]. Já as collagenases (EC 3.4.24.7) são enzimas proteolíticas capazes de degradar a tripla hélice do colágeno. A capacidade de quebrar o colágeno sem afetar as propriedades de outras proteínas tornou as collagenases uma ferramenta útil na medicina para limpar feridas necróticas, cicatrizes pós-operatórias, queimaduras, entre outras, sendo ainda usado no tratamento da doença de Peyronie, doença de Dupuytren, osteoartrite e no tratamento de miomas uterinos. As collagenases agem removendo o tecido necrosado pela hidrólise do colágeno, sem ação dolorosa e hemorrágica, podendo ser utilizada por longos períodos em associação com outras drogas, estimulando a cicatrização epitelial [2-4]. Portanto, para utilização da collagenase, a purificação torna-se uma questão muito importante.

As partículas magnéticas (MPs) têm atraído a atenção devido a sua ampla aplicação como separação de biomoléculas, agentes de contraste para ressonância magnética, catálise, usos biomédicos, entre outros [5]. As MPs de óxido de ferro são partículas não tóxicas que podem ser sintetizadas de forma econômica através da co-precipitação de sais de ferro [6]. Quando sintetizadas contendo um ligante específico, esses compósitos podem ser utilizados na purificação de biomoléculas [7] como é o caso da partícula magnética contendo azocoll como ligante específico para purificar collagenases (MPs-Azocoll).

As técnicas usuais de purificação de enzimas abrangem várias etapas, são caras e demoradas, portanto, MPs representam uma alternativa

interessante e muito promissora para etapas de purificação, como baixo custo, reutilização e excelente rendimento [7,8]. Cerca de 80% do custo total de uma enzima comercializada está relacionado às etapas de produção e purificação, levando ao desenvolvimento de novos métodos inovadores [8]. Por outro lado, os resíduos da indústria pesqueira são fontes auspiciosas de biomoléculas como as collagenases [9-11].

Neste estudo, é proposto um desenho experimental para otimizar o processo de purificação utilizando MPs-Azocoll para purificar collagenase de diferentes fontes e caracterizar a enzima de cavala (*Scomber japonicus*).

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Azocoll, ácido etilenodiamina tetraacético (EDTA), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), tosil lisina clorometil cetona (TLCK), tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) e Benzamidina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Collagenase de *Clostridium histolyticum* (Thermo-Fisher, EUA). O ácido tricloroacético (TCA) foi adquirido da Vetec Chemical (Brasil). O cloreto férrico hexahidratado e o cloreto ferroso tetrahidratado foram obtidos da Merck (Alemanha). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2 Síntese de MPs-Azocoll

Este procedimento foi realizado de acordo com Alves et al. [7]. Resumidamente, uma mistura aquosa (100 mL) contendo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,1 M) e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,6 M) foi adicionada a uma quantidade de azocoll (10 mg), então, foi adicionado hidróxido de amônio 28,0-30,0% para atingir o pH até 11. A

mistura foi aquecida a 50 °C sob agitação vigorosa. O precipitado magnético e preto foi coletado por um ímã externo, lavado com água destilada, seco a 50 °C e mantido a 25 °C para uso posterior.

2.3 Obtenção do Extrato bruto

Espécimes de tilápia (*O. mossambicus*) e cavala (*S. japonicus*) foram capturados no tanque de peixes do Departamento de Pesca da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil). As vísceras foram coletadas e homogeneizadas (1 mg de tecido mL⁻¹, p/v, em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,0) usando um homogeneizador de tecido (COLE-PARMER Modelo 04369-15). A preparação resultante foi centrifugada a 10.000g por 25 min a 4 °C para remover a gordura. O sobrenadante (extrato bruto) foi congelado a -20 °C e usado para outras etapas de purificação. A produção da collagenase por *Penicillium* sp. usando meio de cultura composto de extrato de malte, peptona, glicose, sais e ágar são descritos por Wanderley et al. [12]. Uma solução estoque de collagenase de *C. histolyticum* (comercial) (30 mg/mL) diluída em 20 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 foi usada como enzima padrão e comparativa.

2.4 Planejamento Experimental

Previamente, para estabelecer as melhores condições de purificação da collagenase foi realizado um planejamento experimental utilizando extrato bruto de tilápia (*Oreochromis mossambicus*). Quatro parâmetros foram analisados: a quantidade total de MPs-Azocoll utilizada na purificação (A); quantidade total de Azocoll utilizada na síntese de MPs-Azocoll (B); volume de extrato bruto (C)

e tempo de incubação (D) nas respostas selecionadas: atividade específica, rendimento e purificação. Os intervalos de nível dos parâmetros investigados estão listados na Tabela 1. Consequentemente, foi usado MPs-Azocoll (0,05 g, 0,1 g e 0,15 g) contendo diferentes quantidades de azocoll (10 mg, 50 mg e 100 mg) incubados separadamente com extrato de intestino de peixe (2 mL, 4 mL e 6 mL) de *O. mossambicus* por 60 min, 120 min e 180 min a 4 °C sob agitação. O MPs-Azocoll foi coletado com um campo magnético externo (ímã) e lavado com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Depois disso, foi adicionado NaCl 3M. O primeiro sobrenadante e as lavagens foram coletados para determinações de proteínas e atividades enzimáticas.

Tabela 1 - Níveis usados para o planejamento experimental.

Variáveis Analisadas	Níveis		
	-1	0	1
A: MPs-Azocoll (mg)	50	100	150
B: Azocoll (mg)	10	50	100
C: Extrato bruto (mL)	2	4	6
D: Tempo (min)	60	120	180

Assim, o desenho experimental foi composto por 27 ensaios e a influência foi avaliada com três repetições no ponto central conforme mostrado a seguir (Tabela 2). A análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos foi realizada com o software Design Expert 12 (Stat-Ease, Inc. 2022, Minneapolis, MN, EUA).

2.5 Purificação de Colagenase

Após o software prever as melhores condições para purificação da colagenase, extratos brutos de *S. japonicus*, *Penicillium* sp. e *C. histolyticum* foram purificados usando 0,1 g de MPs-Azocoll contendo 50 mg de azocoll, incubados por 60 min. Após esse tempo, as partículas foram coletadas com campo magnético externo e lavadas com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, para remover as proteínas não complexadas. Em seguida, foi adicionado NaCl 3M. O primeiro sobrenadante e as lavagens foram coletados para determinações de proteínas e atividades enzimáticas.

2.6 Determinação da Atividade Colagenolítica e Proteínas Totais

A atividade da colagenase foi determinada de acordo com metodologia usando azocoll como substrato [13]. Resumidamente, uma mistura de reação, contendo 5 mg de azocoll, 500 µL de 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) com 5 mM CaCl₂ e 500 µL de extrato bruto, foi incubada a 55 °C por 30 min, sob agitação. Em seguida, 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 40% foram adicionados para interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos a 4 °C. A leitura dessas amostras centrifugadas foi realizada utilizando um espectrofotômetro (Biotech Ultrospec 3000 Pro) no comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,01 a 595 nm. Os ensaios foram realizados em quadruplicata. A concentração de proteína foi determinada usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão [14].

2.7 Caracterização da Colagenase Purificada

2.7.1 Efeito do pH e Temperatura na Atividade Enzimática

Para determinar o efeito do pH na atividade colagenolítica, o pH da mistura de reação contendo 0,5% (p/v) de azocoll foi variado na faixa de 2,0 a 11,0. Os tampões utilizados foram: citrato 0,05 M (pH 2,0-6,0), Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0-9,0) e carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 10,0-11,0), e o ensaio de atividade realizado a 55 °C. Para determinar a temperatura ideal para a atividade enzimática, a mistura de reação foi incubada na temperatura selecionada (de 20 a 90°C) e pH 8,0. A atividade residual foi calculada como a razão entre as atividades enzimáticas, observadas no final de cada ciclo de incubação, e no início, e expressa em porcentagem (%).

2.7.2 Efeito de Inibidores e Ions na Atividade Enzimática

Inibidores de protease e efeito de íons foram investigados na atividade da enzima, pré-incubada por 30 min 100 µL de colagenase com 100 µL de inibidores ou íons por 30 minutos. Os inibidores testados foram: fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), tosil lisina clorometil cetona (TLCK), tosil fenilalanil clorometil cetona (TPCK) e Benzamidina na concentração de 10 mM. Os íons testados foram K⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ e Al³⁺ na concentração de 1 mM. A atividade residual foi determinada como a porcentagem da atividade proteolítica em uma amostra de controle livre de inibidor.

3 Resultados e discussão

O presente procedimento de purificação foi inspirado em publicações anteriores [7,15]. Basicamente, a partícula magnética é sintetizada na presença de um ligante (substrato/macromolécula) que possui afinidade com a enzima. Aqui, o azocoll (colágeno ligado ao um azo corante) foi fortemente adsorvido na superfície das partículas magnéticas. Uma preparação de collagenase impura quando incubada na presença do MPs-Azocoll, formando um complexo não produtivo, ou seja, foi capaz de reconhecer o substrato alterado mas não o hidrolisou. Outras lavagens foram capazes de remover as proteínas não complexadas. Aumentando a força iônica (NaCl), o complexo MPs-Azocoll-collagenase é desfeito, e a enzima purificada obtida. Todas essas lavagens foram realizadas usando um campo magnético externo (ímã). A última etapa permitiu, separadamente, a obtenção da collagenase solúvel purificada e da MPs-Azocoll para possíveis reutilizações. Compósitos magnéticos anteriores sintetizados de forma semelhante, nas mesmas condições, exceto pela mudança de substrato/macromolécula; levan em vez de azocoll [15] ou na sua ausência [16], apresentou tamanhos de 14 ± 2 nm e 20 ± 3 nm, respectivamente.

3.1 Planejamento Fatorial 2⁴

Todos os parâmetros utilizados no procedimento de purificação foram analisados sob um planejamento experimental de acordo com os valores da Tabela 1 e utilizando extrato bruto de *O. mossambicus*. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores para Atividade Específica, Purificação e Rendimentos usando planejamento fatorial 2⁴ para MPs-Azocoll.

Ensaio	Variável				Respostas		
	A	B	C	D	A.Esp.(U/mg)	Purificação	Rendimento (%)
1	-1	0	-1	0	1462	22	77
2	-1	1	0	0	2053	31	88
3	1	1	0	0	852	13	37
4	0	1	0	1	1552	23	31
5	0	-1	1	0	2253	34	41
6	0	0	-1	-1	1002	15	75
7	1	-1	0	0	2031	31	35
8	0	1	1	0	2389	36	57
9	0	-1	0	-1	934	14	50
10	0	0	1	1	1511	23	33
11	0	0	0	0	985	15	37
12	0	0	0	0	889	13	31
13	0	1	-1	0	2596	39	67
14	-1	0	0	1	2038	31	32
15	0	0	-1	1	372	5	10
16	0	1	0	-1	1968	30	53
17	-1	0	0	-1	951	14	74
18	0	0	0	0	881	13	34
19	0	0	1	-1	2866	43	67
20	-1	-1	0	0	2016	30	32
21	0	-1	0	1	977	14	24
22	1	0	1	0	2289	34	45
23	-1	0	1	0	2280	34	89
24	0	-1	-1	0	2130	32	69
25	1	0	0	-1	1877	28	60
26	1	0	0	1	1084	16	24
27	1	0	-1	0	803	12	32

A.Esp. = Atividade Específica

Todas as respostas (atividade específica, purificação e rendimento) foram incorporados no Design Expert 12 e calculados para um modelo com uma abordagem 2FI. Nos resultados estatísticos das análises do valor de p para todas as respostas, apenas as variáveis B (Azocoll) e D (Tempo) foram

significativas no valor de p ($p < 0,05$). Além disso, a interação entre as variáveis: MPs-Azocoll (A) e Azocoll (B); MPs-Azocoll (A) e Tempo (D); Azocoll (B) e Extrato bruto (C); Azocoll (B) e Tempo (D) foram significativos.

A Tabela 3 mostra a análise de variância (ANOVA), o modelo é significativo com valor de p 0,0159 e valor F 3,32. Isso significa que a hipótese nula pode ser rejeitada, ou seja, os resultados provavelmente não ocorreram por acaso. O valor F de Falta de Ajuste de 0,68 implica que Falta de Ajuste não é significativo em relação ao erro, ou seja, não podemos concluir que o modelo não se ajusta bem aos dados. A falta de ajuste não significativa é bom, significa que o modelo não precisa de ajuste, o modelo fornece a resposta esperada. As variáveis B e D apresentaram teste F também significativo (8,8; 17,6 respectivamente). Portanto, os valores do coeficiente de determinação (R^2) obtidos para os efeitos de todas as variáveis independentes nas respostas ficaram entre 0,50 e 0,37, o R^2 previsto está em boa concordância com o R^2 ajustado com a diferença menor que 0,2.

Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA) para o modelo representativo na faixa de parâmetros estudada.

Source	Sum square	Degrees of freedom	Mean square	Valor de F	Valor de p
Modelo	7949.67	10	794.9	3.32	0.0159
Residual	3826.63	16	239.16		
Falta de Ajuste	3160.63	14	225.7	0.6780	0.7378
Erro	666.0	2	333.0		
Total	11776.3	26			

Os modelos resultantes são ferramentas valiosas para a previsão de interações fatoriais e sua influência nos parâmetros de resposta dentro da área

de projeto estudada. Isso pode ser observado na Tabela 4, quando os resultados dos experimentos são comparados com os valores previstos pelos modelos. É notável que os valores previstos vão ao encontro da realidade com uma confiança superior a 95%. Observa-se que os valores previstos pelo software no Ensaio 1, por exemplo, são 1481, 23,8 e 62,9, e os valores experimentais obtidos foram 1462, 22 e 77, para atividade específica, purificação e rendimentos respectivamente, muito próximos do previsto.

Tabela 4 - Confirmação dos modelos com dados dos ensaios previstos e experimentais.

	Ensaio 1			Ensaio 2			Ensaio 25		
	A.Esp. (U/mg)	Purificação	Rendimento	A.Esp. (U/mg)	Purificação	Rendimento	A.Esp. (U/mg)	Purificação	Rendimento
Previsto	1481.1	23.8	62.9	2142.5	23.8	83.2	2080.7	23.8	53.6
95% Pi-low	239.2	2.45	23.4	422.1	2.45	43.6	360.3	2.45	14.1
95% Pi-high	3201.6	45.2	102.4	3862.9	45.2	122.7	3801.2	45.2	93.1
Experimental	1462	22	77	2053	31	88	1877	28	60

A.Esp. = Atividade Específica

O 19º ensaio apresentou o melhor desempenho com atividade específica de 2866 U/mg de proteína, rendimento de 67% e purificação de 43 vezes (Tabela 2). Rendimentos mais altos foram alcançados para o 2º e 23º ensaio (88 e 89%, respectivamente), mas atividade específica e purificação mais baixas foram observadas (2053 U/mg; 31 vezes; 2280 U/mg e 34 vezes, respectivamente). O ensaio 19 foi obtido com 100 mg de MPs-Azocoll, 50 mg de Azocoll (100 e 50 mg), 6 mL de extrato bruto e 1 h de incubação.

Vários estudos utilizaram o mesmo sistema de planejamento fatorial. A collagenase purificada de *Aspergillus heteromorphus* foi purificada 7,6 vezes [4]. O MPs-Azocoll proposto nesta contribuição usando apenas uma etapa para

purificar a collagenase e apresentou purificação seis vezes maior. O mesmo foi observado pela collagenase de *Chlorella vulgaris* que teve uma purificação menor no valor de 10,79 vezes comparado aos resultados deste trabalho [3]. Oliveira et al. [10] também obteve resultados inferiores em relação a este trabalho, obtendo em seu planejamento fatorial o melhor resultado com um valor de collagenase purificada de 8,24 vezes. Portanto, MPs-Azocoll representam uma alternativa interessante e muito promissora para reduzir etapas de purificação, com baixo custo, possibilidade de reutilização e rendimento.

3.2 Purificação de Collagenase

A Tabela 5 mostra a purificação otimizada de collagenase usando MPs-Azocoll e três fontes diferentes de collagenase: peixe (cavala; *S. japonicus*) e dois microrganismos (*Penicillium* sp. e *Clostridium histolyticum*).

Tabela 5 - Purificação de collagenase otimizada usando MPs-Azocoll.

Collagenase		Proteína Total (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
<i>Scomber japonicus</i>	Bruto	2.78	77	27.7	100	1
	Purificado	0.05	27.6	552	35.8	20
<i>Penicillium sp.</i>	Bruto	0.47	5.5	11.7	100	1
	Purificado	0.02	5.2	260	94.5	22.2
<i>Clostridium histolyticum</i>	Bruto	0.99	63	63.6	100	1
	Purificado	0.02	19.3	965	30.6	15.1

Todas as operações foram realizadas a 4 °C

Todas as collagenases foram purificadas usando MPs-Azocoll, sugerindo que este procedimento pode ser utilizado para purificar esta enzima

independente da fonte. A collagenase de *S. japonicus* foi purificada 20 vezes com rendimento de 35,8% e atividade específica de 552 U/mg. Os melhores valores de rendimento e de purificação foram para collagenase de *Penicillium* sp., respectivamente, 94,5% e 22,2. MPs-Azocoll também purificou a collagenase comercial do *Clostridium histolyticum*. O fabricante informa que esta preparação comercial (Collagenase Tipo I) possui caseinase, clostripaína e tripsina. Portanto, MPs-Azocoll foi capaz de remover essas impurezas. A Tabela 6 apresenta uma comparação entre o desempenho da presente proposta de purificação de collagenases e os relatados na literatura.

Tabela 6 - Purificação de collagenases de peixes e microorganismos relatados na literatura.

Nome Científico	Atividade Específica (U/mg)	Purificação	Rendimento (%)	Etapas	Referência
Peixes					
<i>Cichla ocellaris</i>	263.4	2.46	116.2	9	[10]
<i>Scorpaena notata</i>	675.9	4.89	6.69	3	[17]
<i>Scomber japonicus</i>	652.1	39.5	0.1	5	[18]
<i>Novoden modestrus</i>	10,553.2	92.4	10.9	4	[21]
<i>Sardinella aurita</i>	10.6	3.82	6.8	3	[24]
<i>Scomber japonicus</i>	552	20	35.8	1	This work
Microorganismos					
<i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269	N/I	7.8	157.5	1	[4]
<i>Penicillium</i> sp. UCP 1286	N/I	27.6	83	1	[12]
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> URM4622	N/I	5.23	48.1	1	[19]
<i>Aspergillus</i> sp. UCP 1276	806.2	2.09	22.8	3	[20]
<i>Nocardiosis dassonvillei</i> NRC2aza	387.2	3.33	6.23	4	[23]
<i>Penicillium</i> sp. UCP1286	260	22.2	94.5	1	This work
<i>Clostridium histolyticum</i>	965	15.1	30.6	1	This work

N/I: Dados não informados pelo autor

Em relação à colagenase de peixe, o presente método, utilizando uma única etapa, apresenta vantagens em relação a outros que empregam várias etapas, de 3 a 9, no que diz respeito à purificação e rendimento [10, 17, 18]. Aqueles que apresentam valores mais elevados carecem desse inconveniente metodológico. O rendimento superior a 100% observado para a *Cichla ocellaris* [10] deve ser atribuído à eventual remoção dos inibidores enzimáticos após nove etapas de purificação.

Resultados semelhantes foram observados em relação à purificação de colagenases a partir do caldo de fermentação microbiana [4, 12, 19]. Todos estes procedimentos de purificação foram baseados no sistema Aquoso de duas fases. Embora a presente contribuição não tenha explorado o reaproveitamento da MPs-Azocoll, apenas hipotetizou-se que, após a coleta da colagenase, tais compósitos magnéticos possam ser reutilizados. Tripsina [7, 16] e lectinas [15] foram purificadas nestas circunstâncias pelo menos quatro vezes sem perda ou desempenho. Colagenases de *Penicillium aurantiogriseum* e *Aspergillus* sp. foram relatados como purificados 5,3 vezes, rendimento de 48,1% e 2,09 vezes e 22,9%, respectivamente [19, 20]. Novamente, o rendimento relatado acima de 100% relatado para o *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 [4] deve ser atribuído à eventual remoção de inibidores enzimáticos após a purificação.

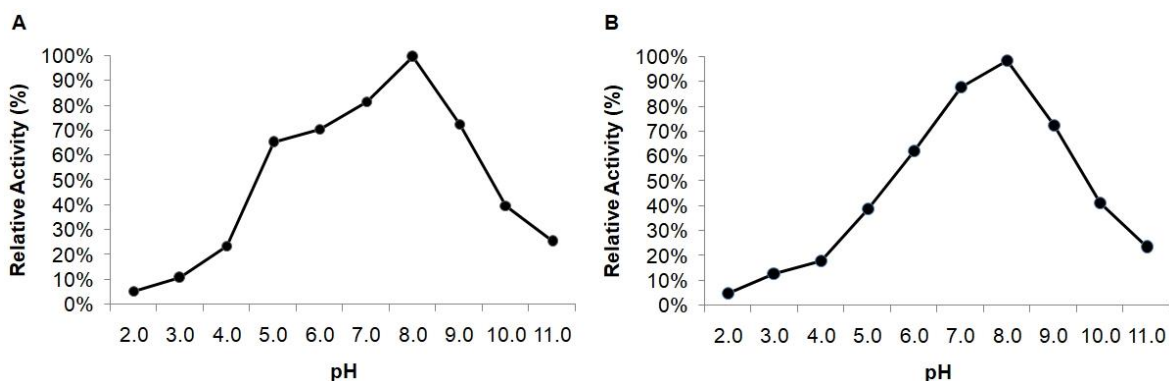
3.4 Caracterização da Colagenase

Algumas propriedades essenciais das colagenases purificadas de *Scomber japonicus* e *Clostridium histolyticum* foram investigadas. As do *Penicillium* sp. UCP 1286 já foram estabelecidos [12].

3.4.1 Efeito do pH e Temperatura na Atividade Colagenolítica

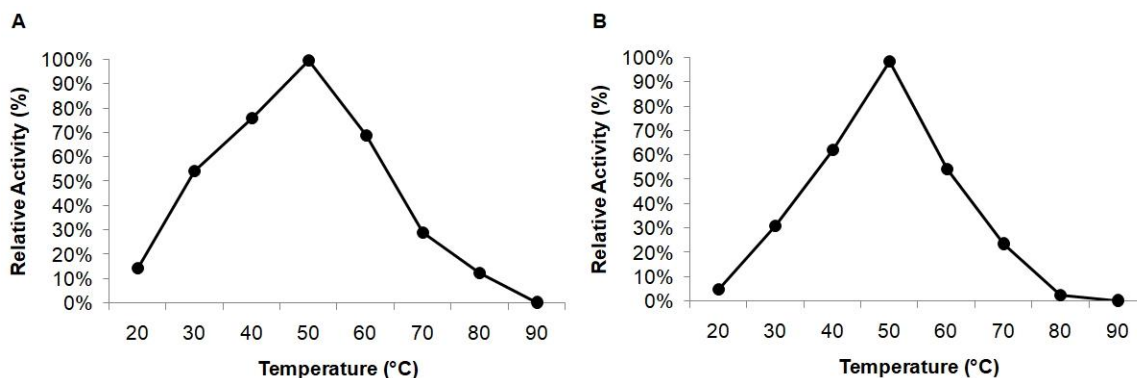
O efeito do pH (Figura 1) e da temperatura (Figura 2) sobre a atividade da colagenase foi investigado para as colagenases *Scomber japonicus* e *Clostridium histolyticum* (Colagenase comercial). Ambas as enzimas demonstraram atividade máxima em pH 8 (Figura 1). De acordo com Kim e cols. [21], o pH ótimo pode variar de 6,0 a 10,0, dependendo de vários fatores, dentre eles o tipo de organismo produtor. Alguns autores também relataram atividade ótima sob pH alcalino para colagenase de peixe [10, 13, 17, 18, 21].

Figura 1 - Efeito do pH na atividade colagenolítica (A: *Scomber japonicus*; B: *Clostridium histolyticum*).



O teste de temperatura ótima foi observado na Figura 2. A maior atividade colagenolítica exibida a 50 °C para ambas as enzimas testadas. A atividade da colagenase de *Scomber japonicus* (Figura 2-A) reduziu sua atividade residual para menos de 30% quando exposta a 70 °C chegando à desnaturação quando incubada a 90 °C. Daboor et al. [22] obtiveram resultados semelhantes, com uma temperatura ótima para filefish a 55 °C e uma desnaturação de proteínas a 70 °C.

Figura 2 - Efeito da temperatura na atividade colagenolítica (A: *Scomber japonicus*; B: *Clostridium histolyticum*).



A variação de temperatura e pH pode resultar em alterações conformacionais na enzima, como alterações no sítio catalítico, resultando em dificuldades na hidrólise do substrato [4].

A temperatura e o pH são parâmetros importantes para obter um melhor desempenho dessas proteínas que possuem propriedades colagenolíticas que podem ser exploradas nas indústrias médica, cosmética, farmacêutica e alimentícia [10, 21].

3.4.2 Efeito de Inibidores e Íons Metálicos na Atividade Colagenolítica

Alguns íons metálicos podem inibir ou ativar a atividade da collagenase como função de cofator. Para testar a sensibilidade da collagenase purificada de *Scomber japonicus*, foram utilizados íons metálicos (K^+ , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} e Al^{3+}) e inibidores específicos de proteases (TLCK, TPCK, PMSF, EDTA e Benzamidina). Também foi

caracterizada a colagenase de *Clostridium histolyticum*. Os resultados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Efeito de íons e inibidores na atividade colagenolítica.

	Atividade Residual (%)	
	<i>Scomber japonicus</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>
<i>Ions (1mM)</i>		
Controle	100	100
K ⁺	94.2	33.3
Mn ²⁺	65.3	69.1
Cu ²⁺	58.6	25.6
Mg ²⁺	120.5	22.3
Ca ²⁺	101.7	112.5
Ni ²⁺	20.2	29.3
Zn ²⁺	26.1	22.7
Ba ²⁺	70.6	22.4
Hg ²⁺	23.4	32.3
Pb ²⁺	21.2	62.8
Cd ²⁺	65.5	65.6
Al ³⁺	87.7	22.5
<i>Inibidores (10mM)</i>		
Controle	100	100
EDTA	80.3	52.1
PMSF	11.1	88.5
TLCK	36.5	33.6
TPCK	41.3	46.6
Benzamidine	48.6	54.4

(EDTA) ácido etilenodiamino tetracético, (PMSF) fluoreto de fenilmetilsulfonyl, (TLCK) tosil lisina clorometil cetona, (TPCK) tosil fenilalanil clorometil cetona

Para o teste utilizando colagenase purificada de *Somber japonicus* incubadas com íons, apenas Mg²⁺ e Ca²⁺ apresentaram um aumento de atividade (120,5 e 101,7% respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Houve inibição em ordem decrescente pelos íons: Ni²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Al³⁺ e K⁺. Em relação aos inibidores testados, houve diferença significativa entre todos os tratamentos, em relação ao

controle. A maior inibição (11,1%) foi detectada para o inibidor de serina protease (PMSF). O teste com inibidores de metaloprotease (EDTA) também demonstrou atividade reduzida (80,3%), mas em menor grau. Uma inibição substancial foi observada para Benzamidina, TPCK e TLCK. Resultados semelhantes foram descritos para a serinoprotease de peixe (*Cynoscion leiarchus*) [2].

A collagenase de *Clostridium histolyticum* foi mais afetada por íons quando comparada à collagenase de *Scomber japonicus*. Também mostrou inibição considerável para TLCK, TPCK, EDTA e Benzamidina. Enzimas da classe das metaloproteases como a collagenase de *Clostridium histolyticum* geralmente têm suas atividades reduzidas após a exposição ao EDTA.

O aumento da atividade induzida pelo Ca^{2+} e a inibição provocada pelo PMSF sugerem que a collagenase de *Scomber japonicus* pertence ao grupo das serinoproteases, corroborando com o relatado para collagenases purificadas de cavala (*S. japonicus*) [18], filefish (*Novodon modestus*) [21], Weakfish (*C. leiarchus*) [2] e tucunaré (*C. ocellaris*) [10].

Aqui, partículas magnéticas contendo azocoll foram aplicadas para purificar collagenases de peixes e microorganismos. Um desenho experimental estabeleceu as melhores condições de purificação. O resultado do método mostrou-se promissor e comparável a outros relatados na literatura, apresentando algumas vantagens. Além disso, o pH e as temperaturas ideais das enzimas purificadas foram investigados, bem como a ação de íons e inibidores sobre elas.

4 Conclusões

A partir dos resultados apresentados no planejamento fatorial, a utilização de MPs-Azocoll mostrou-se eficiente em todas as condições aplicadas para purificação de colagenase, purificando em uma etapa com melhores valores de rendimento e de purificação, 89% e 43, respectivamente. Os efeitos estimados do teste ANOVA e os valores de *p* correspondentes ficaram abaixo de 0,05, também o valor *F* e Falta de ajuste, a concordância entre os dados experimentais e os valores previstos pelos modelos podem ser considerados satisfatórios. MPs-Azocoll otimizada purificou colagenase de diferentes fontes com melhor desempenho de rendimento (94%) e purificada 22,2 vezes. De acordo com os efeitos dos íons e inibidores, a enzima de *Scomber japonicus* foi determinada como serinoprotease, alcalina com melhor atividade em pH 8,0 e térmica a 50°C. Essas características favorecem a aplicabilidade nas indústrias.

Conflito de interesses

Todos os autores declaram não haver conflito de interesse.

Financiamento

Este trabalho foi inteiramente executado no Instituto Keizo Asami – iLIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, e apoiado pelo CNPq (Bolsa LBCJ 301830/2017-7), CAPES e FACEPE (Bolsa LCM: 88882.380416/2019-01; MHMEA Bolsa: 88887.175808/2018-00).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao iLIKA, CNPq, CAPES e FACEPE.

Referências

- [1] A. Soroushanova, L.M. Delgado, Z. Wu, N. Shologu, A. Kshirsagar, R. Raghunath, A.M. Mullen, Y. Bayon, A. Pandit, M. Raghunath, D.I. Zeugolis, The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development, *Adv. Mater.* (2018). <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>
- [2] V.M. Oliveira, C.R.D. Assis, P.N. Herculano, M.T.H. Cavalcanti, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application, *Boletim do Instituto de Pesca*, 43, (2017), 52-64. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p52>
- [3] M.C.A. Wanderley, J.M.W. Duarte, A.F. Andrade, R.G. Melo, D.A.V. Marques, R.P. Bezerra, A.L.F. Porto, First report on *Chlorella vulgaris* collagenase production and purification by aqueous two-phase system, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 15, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.scp.2019.100202>
- [4] L.M.G. Fernandes, M.N.C. Cunha, J.C. Silva, A.L.F. Porto, T.S. Porto, Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate, *Journal of Molecular Liquids*, 317, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113957>
- [5] S.P. Schwaminger, S.A. Blank-Shim, I. Scheifele, V. Pipich, P.F. García, S. Berensmeier, Design of Interactions between nanomaterials and proteins: A highly affine peptide tag to bare iron oxide nanoparticles for magnetic protein separation, *Biotechnology Journal*, (2018). <https://doi.org/10.1002/biot.201800055>

- [6] H.C. Roth, S.P. Schwaminger, F. Peng, S. Berensmeier, Immobilization of cellulase on magnetic nanocarriers, *Chemistry Open*, 5, (2016), 183-187. <https://doi.org/10.1002/open.201600028>
- [7] M.H.M.E. Alves, G.A. Nascimento, M.P. Cabrera, S.I.C. Silvério, C. Nobre, J.A. Teixeira, L.B. Carvalho Júnior, Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite, *Food Chemistry*, 226, (2017), 75–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094>
- [8] M. Cao, Z. Li, J. Wang, W. Ge, T. Yue, R. Li, W.W. Yu, Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis, *Trends in Food Science & Technology*, 27(1), (2012), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.003>
- [9] FAO – Food and Agriculture Organization, The state of world fisheries and aquaculture, *The State of World Fisheries and Aquaculture*, (2016), 200pp. URL: <http://www.fao.org/documents/card/en/c/I9540EN/>. Accessed 04.10.19.
- [10] V.M. Oliveira, M.N.C. Cunha, C.R.D. Assis, J.M.S. Batista, T.P. Nascimento, J.F. Santos, C.A. Lima, D.A.V. Marques, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichla ocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101509>
- [11] A. Shavandi, Y. Hou, A. Carne, M McConnell, AEA Bekhit. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. *Advances in Food and Nutrition Research*, 87 (2019), 187-254. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.08.001>
- [12] M.C.A. Wanderley, J.M.W. Duarte Neto, W.W.C. Albuquerque, D.A.V. Marques, C.A. Lima, S.I.C. Silvério, J.L. Lima Filho, J.A.C. Teixeira, A.L.F. Porto, Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. *Protein Expr Purif.* (2017), 133:8-14. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.02.010>.

- [13] V.M. Oliveira, T.P. Nascimento, C.R.D. Assis, R.S. Bezerra, A.L.F. Porto, Study on Enzymes of Industrial Interest in Digestive Viscera: Greater amberjack (*Seriola dumerili*). *Journal of coastal life medicine*, (2017), 5, 233-238. <https://doi.org/10.12980/jclm.5.2017J6-300>
- [14] M.M. Bradford, A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1), (1976), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [15] D.L. Silva, M.P. Cabrera, I.T. Cavalcanti, G.R. Coelho, E. Beraldo-Neto, R.J.R. Padilha, C.E.S. Silva, M.T.S. Correia, D.C. Pimenta, L.B. Carvalho, Magnetite-levan nanoparticles for lectin purification: A single-step strategy for protein isolation from the seeds extract of the plant *Cratylia mollis*, *Journal of Chromatography A*, 1677, (2022). <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463292>
- [16] J.C. Maciel, A.A.D. Mercês, M. Cabrera, W.T. Shigeyosi, S.D. Souza, M. Olzon-Dionysio, J.D. Fabris, C.A. Cardoso, D.F.N. Neri, M.P.C. Silva, L.B. Carvalho, Magnetic Nanoparticles Coated with Polyaniline to Stabilize Immobilized Trypsin. *Hyperfine interact*, 2016, 237. <https://doi.org/10.1007/s10751-016-1264-y>
- [17] N. Aissaoui, M.N.M. Marzouki, F. Abidi, Purification and biochemical characterization of a novel intestinal protease from *Scorpaena notata*, *International Journal of Food Properties*, 20(2), (2017), 2151–2165. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1368550>.
- [18] J.P. Park, S.H. Lee, H.G. Byun, S.H. Kim, S.K. Kim, Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*, *Journal of biochemistry and molecular biology*, 35, (2002), 576–582. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.576>
- [19] C.A. Lima, A.C.V. Freitas Junior, J.L. Lima Filho, A. Convertti, D.A.V. Marques, M.G. Carneiro-da-Cunha, A.L.F. Porto, Two-phase partitioning and

partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, 75, (2013), 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.012>

[20] C.M.O. Ferreira, P.C. Correia, R.M.P. Brandão-Costa, W.W.C. Albuquerque, T.P.S.L. Liu, G.M. Campos-Takaki, A.L.F. Porto, Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue, *Biomedical Chromatography*, 31, (2016).

<https://doi.org/10.1002/bmc.3882>

[21] S.K. Kim, P.J. Park, J.B. Kim, F. Shahidi, Purification and Characterization of a Collagenolytic Protease from the Filefish, *Novodenmodestrus*, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(2), (2002), 165-171. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.2.165>

[22] S.M. Daboor, S.M. Budge, A.E. Ghaly, M.S. Brook, D. Dave, Isolation and activation of collagenase from fish processing waste, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, (2012), 191-209. <http://doi.org/10.4236/abb.2012.33028>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi desenvolvido e patenteado o método de síntese do compósito magnético com azocoll;
- A partícula magnética com azocoll foi sintetizada com êxito a partir do óxido de ferro e azocoll;
- Colagenase de víscera de tilápia foi purificada em apenas uma etapa utilizando a MPs-Azocoll com rendimento de 33,1% e purificada 16,6 vezes comparadas ao extrato bruto, apresentando atividade específica de 306 U/mg;
- A reutilização da MPs-Azocoll apresentou resultados semelhantes, purificando 15,9 a 14,9 vezes, com rendimento entre 33-31%;
- SDS-PAGE apresentou apenas uma banda da colagenase pura;
- A presença do azocoll nas MPs utilizada foi sugerida pelos picos característicos da XRD e FTIR; e através da presença do elemento carbono em sua composição evidenciado pelo SEM e EDX;
- Os elementos da purificação utilizando MPs-Azocoll foram otimizados através do planejamento fatorial 2⁴ mostrando-se eficiente em todas as condições testadas com rendimento de até 89% e purificando 43 vezes;
- A análise estatística de variância (ANOVA) confirmou a significância do modelo e de duas variáveis (tempo e quantidade de azocoll);
- MPs-Azocoll otimizada purificou colagenase de fontes diferentes obtendo o melhor rendimento de 94%, purificando 22 vezes;
- Colagenase de *Scomber japonicus* foi caracterizada e determinada como uma serino-protease, de caráter alcalina com pH de atividade em 8,0 e temperatura 50 °C.

REFERÊNCIAS

ABOOD, A. A.; ASMAA, M. M.; SALMAN, B.; AZZA, M.; ABDELFATTAH, A. E.; HASHEMA, A. M. Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardiopsis dassonvillei* NRC2aza and its application in wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 116, p. 801–810, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.030>

ADRIO, J. L.; DEMAİN, A. L. Microbial enzymes: Tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, n. 4, p. 117–139, 2014.

ALVES, M. H. M. E.; NASCIMENTO, G. A.; CABRERA, M. P.; SILVÉRIO, S. I. C.; NOBRE, C.; TEIXEIRA, J. A.; CARVALHO JÚNIOR, L. B. Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite. **Food Chemistry**, n. 226, p. 75–78, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094>

CABRERA, M. P.; NERI, D. F. M.; SORIA, F.; CARVALHO JR, L. B. Magnetic Bio-Derivatives: Preparation and Their Uses in Biotechnology. **Applied Surface Science**, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85748>

CAO, M.; LI, Z.; WANG, J.; GE, W.; YUE, T.; LI, R.; YU, W. W. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, n. 27(1), p. 47–56, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.04.003>

CLINICAL TRIALS ARENA. **Xiaflex for treatment of Dupuytren's contracture and Peyronie's disease** [2017]. Disponível em: <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/xiaflexdupuytens/> Acesso em: 20 nov. 2019.

COELHO, D. F.; SATURNINO, T. P.; FERNANDES, F. F.; MAZZOLA, P. G.; SILVEIRA, E.; TAMBOURGI, E. B. Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples, **BioMed Research International**, p. 1-6, 2016.

CHAVIRA, R.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with azocoll, **Analytical Biochemistry**, v. 136, p. 446-450, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90242-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90242-2)

DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S. L.; DAVE, D. Extraction and purifications of collagenase enzymes: a critical review, **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, n. 6, p. 239-26, 2010.

DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S. L.; DAVE, D. Isolation and activation of collagenase from fish processing waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, n. 3, p.191-209, 2012.

DIAS, R. F.; CARVALHO, C. A. A. Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas, **Revista virtual de química**, n. 9, p. 410-430, 2017. Disponível em: <http://static.sites.s bq.org.br/rvq.s bq.org.br/pdf/v9n1a23.pdf> Acesso em: 19 nov. 2019

EMBRAPA, **Oportunidades no mercado brasileiro de enzimas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355063/8134956/Palestra+Pedro+Fernandes/3525fcb7-42b5-420f-85cc-f47049e97213> Acesso em: 19 nov. 2019.

FERREIRA, C. M. O.; CORREIA, P. C.; BRANDÃO-COSTA, R. M. P.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; LIU, T. P. S. L.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue, **Biomedical Chromatography**, n. 31, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/bmc.3882>

FERNANDES, L. M. G.; CUNHA, M. N. C.; SILVA, J. C.; PORTO, A. L. F. PORTO, T. S. Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate, **Journal of Molecular Liquids**, n. 317, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113957>

GÄDKEA, J.; KLEINFELDTB, L.; SCHUBERTA, C.; ROHDEE, M.; BIEDENDIECKC, R.; GARNWEITNERB, G.; KRULL, R. In situ affinity purification of his-tagged protein A from *Bacillus megaterium* cultivation using recyclable superparamagnetic iron oxide nanoparticles, **Journal of Biotechnology**, n. 242, p. 55–63, 2017.

GRAND VIEW RESEARCH, **Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Lipases, Polymerases & Nucleases, Carbohydrase), By Type (Industrial, Specialty), By Source (Plants, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> Acesso em: 27 de jul, 2022.

HELLING, A. L.; TSEKOURA, E. K.; BIGGS, M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; ZEUGOLIS, D. I. In Vitro Enzymatic Degradation of Tissue Grafts and Collagen Biomaterials by Matrix Metalloproteinases: Improving the Collagenase Assay, **ASC Biomaterials science e engineering**, n. 3, p. 1922-1932, 2017.

IYPEA, T.; THOMASA, J.; MOHANB, S.; JOHNSONA, K. K.; GEORGE, L. E.; AMBATTUB, L. A.; BHATIA, A.; AILSWORTH, K.; MENON, K.; RAYABANDLAD, S. M. A novel method for immobilization of proteins via entrapment of magnetic nanoparticles through epoxy cross-linking, **Analytical Biochemistry**, n. 519, p. 42-50, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 12. ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 2013.

KURTA, B. Z.; UCKAYAB, F.; DURMUS, Z. Chitosan and carboxymethyl cellulose based magnetic nanocomposites for application of peroxidase purification, **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 96, p. 149-160, 2017.

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

LIU, Z.; LIU, Y.; SHEN, S.; WU, D. Progress of recyclable magnetic particles for biomedical applications, **Journal of Materials Chemistry B**, n. 6, p. 366, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7TB02941A>

MACIEL, Jaqueline da Costa. **Compósitos de Partículas Magnéticas e Polímeros Para Imobilização de Tripsina**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012. Disponível em: https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/12736/1/Jackeline%20da%20Costa%20Maciel_TESE.pdf Acesso em: 18 ago. 2022.

OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; ASSIS, C. R. D.; NASCIEMENTO, T. P.; HERCULANO, P. N.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. F. Collagenases do pescado e suas aplicações industriais, **Pubvet**, n. 11, p. 242-255, 2017a.

OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; NASCIEMENTO, T. P.; ASSIS, C. R. D.; BEZERRA, R. S.; PORTO, A. L. F. Colágeno: características gerais e produção de peptídeos bioativos - uma revisão com ênfase nos subprodutos do pescado, **Acta offisherries and aquaticresources**, n. 5, p. 70-82, 2017b.

OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; ASSIS, C. R. D.; BATISTA, J. M. S.; NASCIMENTO, T. P.; SANTOS, J. F.; LIMA, C. A.; MARQUES, D. A. V.; BEZERRA, R. S.; PORTO, A. L. F. Separation and partial purification of collagenolytic protease from peacock bass (*Cichlaocellaris*) using different protocol: Precipitation and partitioning approaches, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 24, (2020). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101509>

QU, Q.; TANG, W.; TANG, B.; ZHU, T. Highly selective purification of ferulic acid from wheat bran using deep eutectic solvents modified magnetic nanoparticles, **Journal Separation Science and Technology**, n. 52, 2017.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A. K. Microbial Enzyme Production Using Lignocellulosic Food Industry Wastes as Feedstock: A Review. **Bioengineering (Basel)**. n. 3 (4), 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering3040030>

ROTH, H. C.; SCHWAMINGER, S. P.; PENG, F.; BERERNSMEIER, S. Immobilization of cellulase on magnetic nanocarriers, **Chemistry Open**, n. 5, p.183-187, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/open.201600028>

SCHWAMINGER, S. P.; BLANK-SHIM, S. A.; SCHEIFELE, I.; PIPICH, V.; FRAGA-GARCÍA, P.; BERENSMEIER, S. Design of Interactions between nanomaterials and proteins: A highly affine peptide tag to bare iron oxide nanoparticles for magnetic protein separation, **Biotechnology Journal**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/biot.201800055>

SHAABANI, S.; TABATABAEI, A. T.; SHAABANI, A. Copper(I) oxide nanoparticles supported on magnetic casein as a bio-supported and magnetically recoverable catalyst for aqueous click chemistry synthesis of 1,4-disubstituted 1,2,3-triazoles. **Applied Organometallic Chemistry**, p. 1-6, 2016.

SILVA, O. S.; ALMEIDA, E. M.; MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamari* URM4634, **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 117, p. 1081-1088, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.002>.

SILVA T. F.; PENNA A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, n. 71(3), p. 530-539, 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/122273/ISSN0073-9855-2012-71-03-530-539.pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 19 nov. 2019

SORUSHANOVA, A.; DELGADO, L. M.; WU, Z.; SHOLOGU, N.; KSHIRSAGAR, A.; RAGHUNATH, R.; MULLEN, A. M.; BAYON, Y.; PANDIT, A.; RAGHUNATH, M.; ZEUGOLIS, D. I. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development, **Advanced Materials**, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>

TELES, G. G. A.; BASTOS, J. A. V.; AMARY, A.; RUFATTO, L. A.; RITTY, R. S.; BROGLIO, L. A. P.; SOUZA, L. S. Tratamento de queimadura de segundo grau superficial em face e pescoço com heparina tópica: estudo comparativo, prospectivo e randomizado, **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, n. 27, p. 383-386, 2012.

TIQUIA-ARASHIRO, S.; RODRIGUES, D. Nanoparticles Synthesized by Microorganisms, Extremophiles: Applications in Nanotechnology, **Springer International Publishing**, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45215-9_1

WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, **Science and Technology of Advanced Materials**, n. 16, 2015.

APÊNDICE A – THE ENZYMES IN COVID-19: A REVIEW

Biochimie 197 (2022) 38–48



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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



The enzymes in COVID-19: A review

Maria Helena Menezes Estevam Alves, Layla Carvalho Mahnke, Tifany Cerqueira Macedo, Thais Ketinly dos Santos Silva, Luiz Bezerra Carvalho Junior*

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 September 2021

Received in revised form

21 January 2022

Accepted 24 January 2022

Available online 26 January 2022

Keywords:

Coronavirus

S protein

SARS-CoV-2

ACE-2

ABSTRACT

COVID-19 brought a scientific revolution since its emergence in Wuhan, China, in December 2019. Initially, the SARS-CoV-2 virus came to attention through its effects on the respiratory system. However, its actions in many other organs also have been discovered almost daily. As enzymes are indispensable to uncountable biochemical reactions in the human body, it is not surprising that some enzymes are of relevance to COVID-19 pathophysiology. Past evidence from SARS-CoV and MERS-CoV outbreaks provided hints about the role of enzymes in SARS-CoV-2 infection. In this setting, ACE-2 is an enzyme of great importance since it is the cell entry receptor for SARS-CoV-2. Clinical data elucidate patterns of enzymatic alterations in COVID-19, which could be associated with organ damage, prognosis, and clinical complications. Further, viral mutations can create new disease behaviors, and these effects are related to the activity of enzymes. This review will discuss the main enzymes related to COVID-19, summarizing the findings on their role in viral entry mechanism, the consequences of their dysregulation, and the effects of SARS-CoV-2 mutations on them.

© 2022 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. SARS-CoV-2 and COVID-19	39
2. Enzyme dysregulation consequences	39
2.1. Angiotensin-converting enzyme-2	39
2.2. Transmembrane serine protease 2	40
2.3. Creatine Phosphokinase-MB	40
2.4. Thrombin	41
2.5. Dipeptidyl peptidase 4	42
2.6. Aminopeptidase-N	42
2.7. Alanine and aspartate aminotransferase	42
2.8. Lipase	43
2.9. Lactate dehydrogenase	43
3. Entrance and viral enzymes	44
4. The effect virus mutation on enzymes	45
Funding	45
Declaration of competing interest	45
Acknowledgements	45
References	45

* Corresponding author. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901, Brazil.
E-mail address: lbcj.br@gmail.com (L.B. Carvalho Junior).

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.01.015>

0300-9084/© 2022 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. SARS-CoV-2 and COVID-19

First reported in December 2019, it is possible to state that since its emergence in Wuhan, Hubei Province, China, the SARS-CoV-2 virus brought a scientific revolution in the year 2020, but not for the best reasons [1]. COVID-19 has shown in recent months how devastating and deadly a virus can be. Initially indicated as a virus affecting the respiratory system, recent studies have discovered effects in several of the organs of the human body, and biological pathway [2].

Among the 10–20% of the individuals who contracted the disease require hospitalization or admission to intensive care. SARS-CoV-2 enters the human body cells through the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) on the cell surface, which is responsible for controlling blood pressure, therefore they can be found in almost every tissue of body and the number of receptors is closely related to how the virus affects each organ [3]. After invasion, the immune system reaction is responsible for the cytokine storm, which leads to inappropriate responses that cause tissue damage and hence multi-organ failure and death [4].

A recent report demonstrated the cleavage of human proteins by the SARS-CoV-2 papain-like protease (PLpro) affected proteins, reported were: MYH7 and MYH6 (cardiac myosins linked to several cardiomyopathies), FOXF3 (transcription factor), ErbB4 (HER4) and plasma protein S (PROS1), an anticoagulation protein. Cleaving these proteins reduces their activity and may be associated with several serious complications of COVID-19 [5,6].

COVID-19 has infected up to 300 million people and have already killed more than 5.5 million around the world (World Health Organization) and the biggest challenge has been finding a cure or approved treatment for the disease. Furthermore, the detection of new variants has created a concern among the scientific community since it is not yet clear as to whether newly developed vaccines are protective against all variants.

2. Enzyme dysregulation consequences

Enzymes are indispensable to uncountable biochemical reactions in the human body, with roles in health and disease [7–9]. Thus, it is not surprising that some enzymes are of relevance to COVID-19 pathophysiology.

The SARS-CoV-2 interaction with host enzymes is responsible for a variety of physiological changes (Table 1). At the biochemical level, severe COVID-19 patients have significant disorders such as high levels of C-reactive protein (CRP) [10], Alanine, Aspartate

aminotransferase (ALT and AST) [12–14], lipase [15–17], high levels of changes in the level of thrombin [18] low levels of lymphocytes (lymphopenia) [11] and protein S [5].

It's known that SARS-CoV-2 uses ACE-2 as a viral receptor to enter the human host cell, so it is not surprising that the physiological changes and ACE-2 expression increase in some organs such as lung and stomach are present in many recent studies [19–27]. The Creatine Kinase Myocardial Band (CK-MB) elevation in some patients with COVID-19 was associated with heart failure, was suggest by Qin et al. [28] and Shafi et al., 2020 [29]. Enzymatic alterations also are evident in the brain with DPP4 and APN, but more studies are necessary, because it's not clear yet how these alterations occur [30].

Past knowledge about SARS-CoV and MERS-CoV outbreaks provided a start point to investigate SARS-CoV-2 infection mechanisms, especially regarding viral entry mediated by enzymes, such as ACE-2, TMPRSS2 and DPP4, both enzymes present on the membrane surface that is also be the coronavirus receptor for cell entry – TMPRSS2 For SARS-CoV and DPP4 for MERS-CoV [3,31,32]. A vast amount of clinical data has been revealing COVID-19 enzymatic alterations patterns, including cardiac, pancreatic, and hepatic ones associated with organ damage (Fig. 1) [12,16,28]. Beyond that, some of these alterations could have a role in prognosis [12] or cause a clinical complication directly [33].

2.1. Angiotensin-converting enzyme-2

Angiotensin-converting enzyme 2 (EC 3.4.17.23; ACE-2) is responsible for regulating the level of angiotensin II in the organism, in which it has a potent vasoconstrictor effect, promotes apoptosis, angiogenesis and cell proliferation in several cell types [34]. ACE-2 removes only the last amino acid from the protein substrate at the carboxyl end, transforming the octapeptide angiotensin II into angiotensin 1-7, which has the opposite action [35].

Several studies show that to enter human cells, the SARS-CoV-2 Spike protein interacts with human ACE-2 receptor present on the surface of alveolar epithelial cells, in venous and arterial endothelial cells, in macrophages, as well as in most organs, especially the lung, heart and kidneys [31,34,36–38].

It was observed in acute lung injury or in acute respiratory distress syndrome (ARDS) that angiotensin II participates in worsening lung damage by having a vasoconstrictor, pro-inflammatory, thrombosis and apoptotic action [38].

Table 1
SARS-CoV-2 related to host enzymes.

ORGAN	REMARKS	REFERENCES
BRAIN	Lack of ACE-2 expression in neuronal cells. DPP4 and APN as potential virus receptors.	Cheng et al., Saleki et al., 2020; Steardo et al., 2020
HEART	The MYH6/7 are dysregulated by PLpro. Elevated CK-MB were significantly increased cardiac injury and risk of COVID-19 death.	Reynolds et al., 2021; Perez-Bermejo et al., 2021; Qin et al., 2020; Shafi et al., 2020
EYES	ACE-2 is expressed in conjunctival samples at a low level, while BSG and TMPRSS2 are expressed at intermediate levels in both conjunctiva and cornea.	Leonardi et al., 2020
LIVER	Alterations in liver enzymes (ALT, AST) may correlate with worse clinical course. These changes can be due to either the use of antiviral and antibacterial agents or related to a hyper-inflammatory status and thrombotic microangiopathy.	Medetalibeyoglu et al., 2020; Bertolini et al., 2020; Boregowda et al., 2020
PANCREAS	Lipase elevation is seen in COVID-19 and associated with worse disease outcomes.	Agarwal et al., 2020; Puli et al., 2020
LUNGS	ACE-2 acts as a receptor to enter human cells. Its expression was mainly associated with innate and acquired immune responses, and regulation of B cell mediated immunity, as well as cytokines. Higher expression may prolong the virus life cycle. TMPRSS2 also facilitates entry to cells. Nonmuscle myosin MYH9 heavy chain IIA as an ACE2 coreceptor to promote infection.	Wang et al., 2020; Barlass et al., 2020. Li et al., 2020; Thunders and Delahunt, 2020; Chen et al., 2021.
KIDNEYS	ACE-2 is found in abundance in the kidney then may be one of the targets of SARS-CoV-2 infection.	Hassanein et al., 2020; Martinez-Rojas et al., 2020
BLOOD	The viral enzyme PLpro cut Protein S, a cofactor to Protein C. Thrombin function is affected resulting in pro-inflammatory events, venous thromboembolism and stroke.	Reynolds et al., 2021; Li et al., 2020

Abbreviations: ACE-2: Angiotensin-converting enzyme 2; ALT: Alanine Aminotransferase; APN: Aminopeptidase N; AST: Aspartate aminotransferase; CK-MB: Creatine kinase; DPP4: Dipeptidyl peptidase-4; LDH: lactate dehydrogenase; MYH6/7 – Cardiac myosin; PLpro – Papain-like protease and TMPRSS2 – Transmembrane serine protease 2.

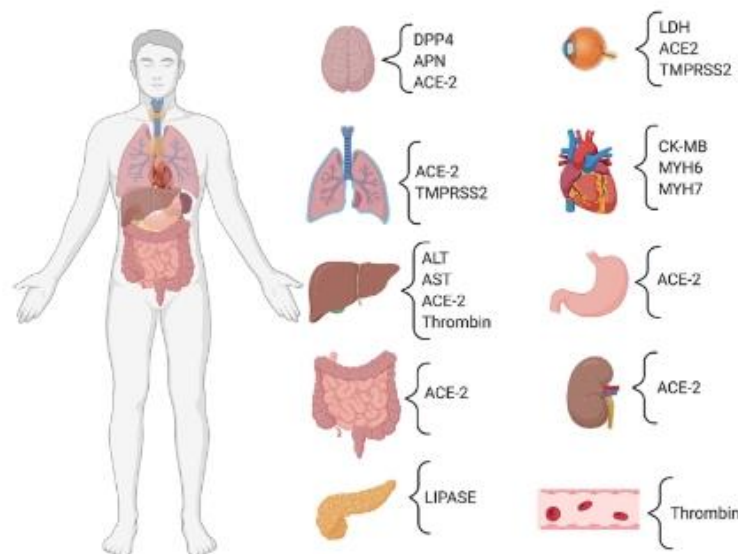


Fig. 1. Research evidence of enzymatic alterations. Made by biorender.com.

Cells infected with SARS-CoV-2 were analyzed suggesting that ACE-2 is not only the receptor, but also acts in the post-infection phase, with immune response, the amino-terminal head domain of MYH9 possesses ATPase activity and facilitates entry [6], cytokines and viral genome replication [1]. Then, the negative regulation of ACE-2 due to the action of SARS-CoV-2 results in the accumulation of angiotensin II in the body, aggravating the disease and causing lung injury [38].

Li et al. [31] showed in their work that the expression of ACE-2 increased after 24 h of SARS-CoV-2 infection and that even after 48 h, the expression of ACE-2 remained at a high level, indicating that ACE-2 acts in viral susceptibility. Still in their work, Li et al. [31] speculated that the high expression of ACE-2 resulted in the cytokine storm, further aggravating the symptoms of ARDS, as well as increasing the expression of genes involved in viral replication, which may increase the ability of the virus to enter host cells.

2.2. Transmembrane serine protease 2

Transmembrane serine protease 2 (EC 3.4.21; TMPRSS2) is a serine protease that acts on the cleavage of peptide bonds that have serine as the main amino acid at the active site. Expressed mainly on the cell surface of the respiratory and digestive endothelium, it can be found in heart, liver, and corneal cells [39–42].

TMPRSS2 is produced as a zymogen that undergoes catalytic activation. The exact biological function of TMPRSS2 is still unknown, however, several studies have been associated with physiological and pathological processes such as digestion, inflammatory responses, tumor cell invasion, apoptosis, and viral entry [39–45].

As in influenza, SARS-CoV-2 is dependent on TMPRSS2 for viral entry and spread in the host. For a better understanding, first, the viral spike protein binds to the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2), expressed in respiratory epithelial cells. Subsequently, the spike is cleaved to activate the internalization of the virus. However, this step only occurs in the presence of proteases from the host cell, particularly TMPRSS2 [39,44,45].

In some studies, healthy wild rats infected with coronavirus developed acute pneumonia, lost weight, and had a strong expression of TMPRSS2. In comparison, knockout rats with negative TMPRSS2 expression were also infected and did not develop pneumonia, presenting a lower viral replication in the lungs and reduced inflammatory responses when compared with wild type mice, suggesting that TMPRSS2 is indispensable for viral replication [46].

Also, Hoffmann et al., 2020 [44] presented a study with evidence of the dependence of ACE-2 and TMPRSS2 for the host cell entry of SARS-CoV-2. The authors also found that inhibiting the serine protease using Camostat mesylate, a drug approved in Japan for pancreatitis treatment, can block the SARS-CoV-2 entry, suggesting an attractive option to COVID-19 treatment.

Several studies mentioned the ACE-2 and TMPRSS2 presence expressed highly in intestinal epithelial cells, which are the target cells for many enteric viruses [40]. Many patients with COVID-19 have symptoms such as abdominal pain and diarrhea, often before having respiratory symptoms.

Zang et al., 2020 [47] used CRISPR/Cas9 gene editing tool to decrease TMPRSS2 expression in intestinal epithelial cells, evidencing ACE-2 and TMPRSS2 higher levels are correlated with SARS-CoV-2 infection. Also in their study, they tested the inhibition of TMPRSS2 using Camostat mesylate, reducing the viral replication and consequently the SARS-CoV-2 infection.

Recent studies have been found both ACE-2 and TMPRSS2 expressed in human corneal epithelium (at low and intermediate levels respectively) suggest ocular surface cells could also be potential viral entry points [41,42].

Thus, TMPRSS2 actively participates in the mechanism of viral entry and replication and can also be contained with the use of protease inhibitors, being the target of many future studies.

2.3. Creatine Phosphokinase-MB

COVID-19 is viral infection with predominately respiratory manifestations, but, since patients with cardiovascular comorbidities have higher mortality, and the severity of disease correlates

with cardiovascular manifestations, it is important to understand the interaction of COVID-19 and cardiovascular disease complications [29,48]. The cardiac myosin heavy chain (MYH6 and MYH7) are mechanical enzymes involved in cardiac muscular contractility. Mutations in this myosins are associated with cardio myopathies. The new reports show the MYH6/7 are cleaved with the viral PLpro resulting in myofibril damage after SARS-CoV-2 infection [5,49]. The presence of secondary myocardial injury was associated with more than 50% mortality in COVID-19, increasing the importance of monitoring cardiac biomarkers [29].

Creatine kinase or Creatine phosphokinase (EC 2.7.3.2; CK) is responsible for the conversion of creatine and uses adenosine triphosphate (ATP) to create phosphocreatine and adenosine diphosphate (ADP). This enzyme is composed by the union of two subunits: type B and/or M, which correspond to the isoenzymes CK-BB (brain), CK-MB (heart) and CK-MM (muscle) [26]. The MB isoenzyme has high sensitivity and specificity for the diagnosis of cardiac injury and the raising it correlates with the volume of injured tissue and the prognosis. In clinical medicine, CK-MB is an essential biomarker used for the diagnosis of cardiovascular diseases and has been studied in forensic medicine for approximately 20 years [27].

Qin et al. (2020) [28] demonstrated an evaluation of cardiac biomarkers included CK-MB related to COVID-19 mortality. The authors related severe symptoms and disease progression associated with elevated levels of cardiac biomarkers (troponin I and NT-pro BNP, CK-MB, and MYO) and associated those patients with increased CK-MB and other biomarkers had a decreased survival rate and more occurrences of heart failure, sepsis, or multiorgan failure compared with those with normal levels.

Many studies connect CK-MB elevated in critical patients group compared to noncritical; in 31.68% patients at admission to ICU and in 55.45% in patients at 48 h to death [29,50–52]. Thus, the authors concluded these findings are consistent with that cardiac injury biomarkers are associated with an increased risk of COVID-19 mortality.

2.4. Thrombin

Many reports address an altered coagulation status and the occurrence of thrombotic events in patients with COVID-19, like venous thromboembolism and stroke [3,31,53–55]. Thrombin (EC 3.4.21.5) is a crucial enzyme in the blood coagulation cascade, and its excessive generation can cause thrombotic complications [56]. Several stimuli, mainly vascular injury, trigger thrombin generation from prothrombin by the action of factor Xa [57].

Thrombin is well-known for converting fibrinogen into fibrin, enabling fibrin clot formation, but it also acts on multiple substrates. Thrombin cleaves protease-activated receptors (PARs) 1 and 4, leading to platelet activation; further, it activates the factors V, VIII, and XI, which create a burst of its generation [58]. Moreover, thrombin activates the fibrin-stabilizing factor (factor XIII) and the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI). All these actions contribute to clot formation and maintenance. This enzyme yet has an anticoagulant function – thrombin activates protein C down-regulating the coagulation cascade [59,60].

Severe COVID-19 patients often develop a hyperinflammatory systemic response and a cytokine storm, presenting a pronounced increase in cytokines, chemokines, and other inflammatory markers, like IL-6, IL-1, MCP-1, TNF- α , and G-CSF [18,28,61]. Although SARS-CoV-2 can directly affect the endothelium and hence the thrombin generation and the coagulation state, inflammation, as well, is likely to disrupt the pro-coagulant and anticoagulant balance in these patients [62].

Besides its coagulation action, thrombin is related to inflammation, through PARs especially. Endothelial cells, platelets, leukocytes,

fibroblasts, and vascular smooth muscle cells express these receptors, for instance. In conforming to the cell type, PARs activation drives the release of cytokines, chemokines, and adhesion molecules, such as IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, and P-selectin [63]. Thrombin also can activate PARs 1 and 4 from sources other than platelets, still activating PARs 3. This allows thrombin to modulate cell responses. Many variables, like thrombin concentration, determine whether these effects are pro-inflammatory or anti-inflammatory [64].

Likewise, inflammation stimulates the thrombin generation by expressing tissue factor, which activates coagulation. Inflammation and coagulation, therefore, are linked and affect each other [65]. More, under inflammation, coagulation participates in immunothrombosis, an element of the innate immune response. Immunothrombosis arises with the recognition of pathogens or damaged cells. Its pathways include an enhanced thrombin generation, resulting in microthrombi formation as a protective and containment mechanism against pathogens [66,67]. Such complex interactions corroborate to thrombin to play a role in some viral infections [68,69]. Immunothrombosis itself has been proposed as a mechanism in COVID-19 pathogenesis [57,70]. As the crosstalk between coagulation and inflammation is a critical element in COVID-19, thrombin exerts a significant influence in this process [33,71].

Several articles describe thrombin generation in patients with COVID-19. A prospective cohort study assessed thrombin generation (prothrombin fragment 1 + 2 (PF 1 + 2)) in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) [72,73]. Elevated thrombin generation was observed, which was similar at baseline in survivors and non-survivors. At follow-up, it was noticed a decrease in thrombin generation in survivors. However, patients that eventually evolved to death (non-survivors) maintained initial levels or even higher ones. A retrospective cross-sectional study evaluated thrombin generation (PF 1 + 2, thrombin-antithrombin complex (TAT), thrombography) in critical and noncritical COVID-19 patients, which was not significantly different between these groups [74]. These two studies possibly highlight that one could not use thrombin generation markers to discriminate disease severity with one only measure. Furthermore, their behavior through time could perhaps indicate how the disease is evolving. It remains unknown whether thrombin generation routine assessment is advantageous to COVID-19 clinical practice and clinical outcomes, requiring further research.

Thrombin indirect inhibition by heparin has been used as thromboprophylaxis for COVID-19 patients since it was associated with lower mortality [75,76]. Considering also that thrombin plays multiple roles aside from coagulation, its inhibition could maybe present anti-inflammatory and anti-viral effects [62]. However, there is yet a lack of evidence about appropriate anticoagulation therapy [5,8,77]. An investigation assessed thrombin generation (thrombography) in COVID-19 patients who received heparin thromboprophylaxis [78]. The analyzed parameters were normal, even in anticoagulation. It suggests an increased thrombin generation capacity and a procoagulant state that was still uncontrolled [79]. This result appears to agree with reports that COVID-19 patients could present thromboembolic events, despite thromboprophylaxis [80,81].

Additionally, regarding coagulation disorders in COVID-19, protein S is noteworthy. Protein S is a vitamin K-dependent glycoprotein, mainly known as an anticoagulant cofactor for activated protein C and tissue factor pathway inhibitor [82]. Still acting as an anticoagulant, this protein inhibits prothrombinase and intrinsic tenase. Its influence on coagulation is palpable since protein S deficiencies are related to elevated thrombotic risk [83]. Clinical data revealed low activity of protein S in COVID-19 patients, suggesting this may contribute to coagulopathy in COVID-19 [84,85]. Also, backing this suggestion, SARS-CoV-2 papain-like protein cleaves a sequence within protein S, and this cut may result in impaired

protein S function or secretion in the course of the viral infection [5].

2.5. Dipeptidyl peptidase 4

Dipeptidyl peptidase 4 (EC 3.4.14.5) is a serine peptidase that exists both bound in the cell surface and as a soluble form in plasma and other body fluids [86]. DPP4 is a functional entry receptor in MERS-CoV, which raised questions about its role in COVID-19 [31,32]. Its catalytic activity consists of releasing N-terminal dipeptides whenever proline or alanine is the penultimate amino acid [87,88]. DPP4 acts on several substrates through its enzymatic function, like chemokines, cytokines, and growth factors [89]. Its actions on inactivating incretin hormones allow using DPP4 inhibitors, or gliptins, as anti-diabetic drugs in type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) treatment [90].

Many cells express DPP4, such as epithelial, endothelial, and immune cells, in kidneys, lungs, liver, spleen, bone marrow, pancreas, and intestine [91]. Its expression on immune cells is broad; indeed, DPP4 is also known as T-cell antigen CD26 due to its co-stimulatory function in T-cell activation [92]. Likewise, DPP4 acts on apoptosis, chemotaxis modulation, and cell adhesion [93]. Since this enzyme participates in immune responses and inflammation, DPP4 may be involved in immune and inflammatory diseases [94]. Accordingly, DPP4 inhibitors have been related to some anti-inflammatory effects [95]. As inflammation in COVID-19 immunopathogenesis is a concern, DPP4 inhibitors could narrow disease progression to severe forms [96,97]. Further, considering diabetes is a risk factor for COVID-19 adverse outcomes, it is of interest to study the associations between clinical outcomes and gliptins use [98].

Computational approaches predicted that SARS-CoV-2 spike protein and human DPP4 could interact, hinting DPP4 may play a role in virus entry into host cells along with ACE-2 [31,99]. Such prediction paved the way for several hypotheses about DPP4 inhibitors antiviral effects in COVID-19, besides anti-inflammatory and immunoregulatory effects already proposed [96,100,101]. Another *in silico* study suggested DPP4 inhibitor could also exert an antiviral activity by inhibiting SARS-CoV-2 main protease [102]. However, functional studies demonstrated that the spike protein and DPP4 do not bind, therefore, suggesting this enzyme does not act as a cell entry receptor for SARS-CoV-2 [103,104]. As well, gliptins did not experimentally inhibit the main protease [105]. Other pathways to SARS-CoV-2 interact with DPP4 are still being hypothesized [106,107].

Many observational studies evaluated gliptins use and COVID-19 outcomes in T2DM patients, although the results are quite contrasting [108]. Several of them couldn't associate DPP4 inhibitors use with COVID-19 evolution, such as clinical severity or death [63,109–112]. Another study reported that treatment with sitagliptin throughout hospitalization was associated with decreased mortality and improved clinical outcomes [113]. Also, DPP4 inhibitors treatment before hospitalization was associated with lower mortality risk [114]. All these studies have limitations due to their observational and retrospective nature, but the ones that presented positive results [113,114] received critics regarding methodology, confounders, or shortcomings. In this setting, there is no established evidence of DPP4 inhibitors being beneficial to COVID-19 clinical outcomes. Randomized and prospective clinical trials are required to assess this properly [106,109].

2.6. Aminopeptidase-N

Aminopeptidase N (EC: 3.4.11.2; APN), also known as CD13, is a cell-surface and zinc-dependent metalloprotease [115]. It cleaves

N-terminal amino acids from unsubstituted oligopeptides, as long as proline is not the penultimate amino acid [116]. Several cells and tissues express this ectopeptidase, like epithelial cells, endothelial cells, leukocytes, fibroblasts, mucosal cells of the small intestine, and synaptic membranes [40,115]. Also, APN exists in a soluble form in plasma [117].

Besides its enzymatic activity, APN mechanisms include endocytosis and signal transduction. These three mechanisms often overlap to achieve a function [118]. APN is extensively present in immune cells, regulating their development and activities. Further, APN catalytic action on hormones, chemokines, and cytokines modulates inflammation. Through this inflammation role, APN are related to some inflammatory conditions [119]. Of note, HCoV-229E is a coronavirus that causes common cold, and it uses human APN as a receptor to enter host cells [120,121].

Considering a possible role for APN as a SARS-CoV-2 receptor, a few studies assessed its expression in tissues, along with ACE-2. Ocular conjunctiva expressed APN at low levels, as well as ACE-2 [122]. In chronic colitis, neither ACE-2 nor APN expression in the gut was different compared to healthy controls [123]. However, evidence showed that aminopeptidase N is not a SARS-CoV-2 entry receptor [44,112]. Despite that, APN and ACE-2 coexpression in human tissues could suggest a function as an auxiliary protein [124]. In this regard, Devarakonda et al. [125] proposed that APN could affect SARS-CoV-2 pathogenesis by other pathways, such as immune response amplification and altering infectivity.

2.7. Alanine and aspartate aminotransferase

Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.57; AST) and alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2; ALT) are intracellular enzymes, found specially in the liver. They catalyze reactions inside the cells, which means that their presence in the systemic circulation might indicate liver dysfunction or damage, mainly those involved in liver cell membrane disruption [126].

It is already clear that the COVID-19 virus enters the cell from, among others, the ACE-2 (angiotensin-converting enzyme 2) receptor. ACE-2 helps the conversion of Angiotensin II (Ang II) in Angiotensin 1-7 and, therefore, helps with the vascular pressure regulation. The virus competes with Ang II and the blood pressure control stays in deficit. It is important to notice that people with some comorbidities, like hypertension, express more ACE-2 receptors, due to upregulation, which can augment the virus effect on the organs. This can also happen in the liver and the bile duct: because of ACE-2 high expression in the bile duct cells, it can lead to damage to these cells, which can promote liver injury [22]. It is important to point that it is still not clear while the damage to the liver is due to the cytokine storm or the direct cell damage promoted by the virus or both. Still, there is no denying the damage that the disease can do to the liver. It is shown that SARS-CoV-2 can produce liver damage, especially in people with other comorbidities, and therefore increase ALT and AST, which can show liver damage [12]. According to this study, the bigger the ratio between ALT and AST, the worse is the patient prognosis, which means that patients with ALT/AST >1 reported more hospital time and intensive care unit hospitalization, demonstrating the relation between liver damage and progression of the disease.

Other studies also correlated the elevation of serum ALT and AST to worse prognosis and higher mortality [13,14]. It is interesting to notice that liver abnormalities, proved by elevated ALT and AST were found in up to 54% of patients, when comparing studies. Even with the liver damage, there has been no reports on liver failure due to COVID-19 [23]. According to Boregowda et al., 2020 [14], when serum liver enzymes were analyzed among the non-survivors, they were elevated compared to survivors.

These results are important to help the treatment of COVID-19 in the Intensive Care Units, so that healthcare workers can avoid prescribing drugs that can promote liver damage and probably worsen the patient's prognosis.

2.8. Lipase

Lipase (3.1.1.3) is an enzyme produced by the pancreas and is responsible for hydrolyzing triacylglycerol into fatty acid and glycerol for absorption in the duodenum [127]. It can be normally found in the blood stream, but its elevation may indicate pancreatic injury. It is interesting to note that the pancreas has a great number of ACE-2 receptors, even more than the respiratory system [16], which would make this organ more vulnerable to SARS-CoV-2 infection, however lipase serum levels are only elevated in more severe initial presentations of COVID-19 [17]. Up to 17% of severe respiratory syndrome patients were reported with lipase serum levels higher than normal in COVID-19 [15], but severe pancreatitis has not been reported [128]. According to Wang et al., 2020 [15], the pancreas damage can be a result to a direct viral infection, a hypoxic injury due to respiratory failure or due to the cytokine storm promoted by the immune system. Patel et al., 2020 [128] also reported a pancreatic injury due to antipyretics. About the prognosis, McNabb-Baltar et al., 2020 [17] correlated an increase in lipase to severe presentations, but the outcomes were not always bad; while Barlass et al., 2020 [16] suggested worst outcomes due to lipase elevations.

It is interesting to notice that lipase elevations can happen because of nonpancreatic diseases, like gastritis and enteritis [17] due to the gastrointestinal system infection by SARS-CoV-2. This shows why pancreatic damage is not always a COVID-19 symptom, but elevated levels of serum lipase can help the diagnosis.

2.9. Lactate dehydrogenase

During glycolysis pyruvate can be converted into lactate in cases of lack of oxygen, such as hypoxia and anaerobic conditions. This reaction provides a fast source of energy and is catalyzed by lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27; LDH). After that, the produced lactate is taken to the liver, where is reconverted to glucose and can be reused to produce more energy [126].

This enzyme was previously used to evaluate damage in cardiac or skeletal muscles, because its serum levels increase substantially when there is not enough oxygen for tissue. LDH levels also get higher in severe infections [129], due to tissue damage. During COVID-19 pandemic, some systemic reactions were noticed, such as the cytokines storm, elevated lymphocyte levels and lung lesions, among others [130].

Some authors also noticed an elevation of lactate dehydrogenase levels in severe cases of COVID-19 and that this enzyme is related to worse outcomes [31,129,130]. This enzyme is released in tissue damage, the cytokines storm can explain the enzyme elevation, because the multisystemic inflammation promotes mostly lung damage, which can lead to pneumonia, but also cardiac, liver, and renal damage. LDH is also highly expressed in the lung tissue, according to Henry et al., 2020 [130], so patients with severe disease, mostly the ones affected by acute respiratory syndrome, have presented elevated LDH levels. These authors have also noticed that this enzyme elevation occurred in Middle East Respiratory Syndrome (MERS), confirming the presence of the enzyme in lung tissue.

Another author pointed LDH as a more effective marker for severe disease when compared to lymphocyte counts and D-dimer [31], with more sensitivity and specificity. Another author studied the LDH/lymphocyte ratio to evaluate worse COVID-19 outcomes

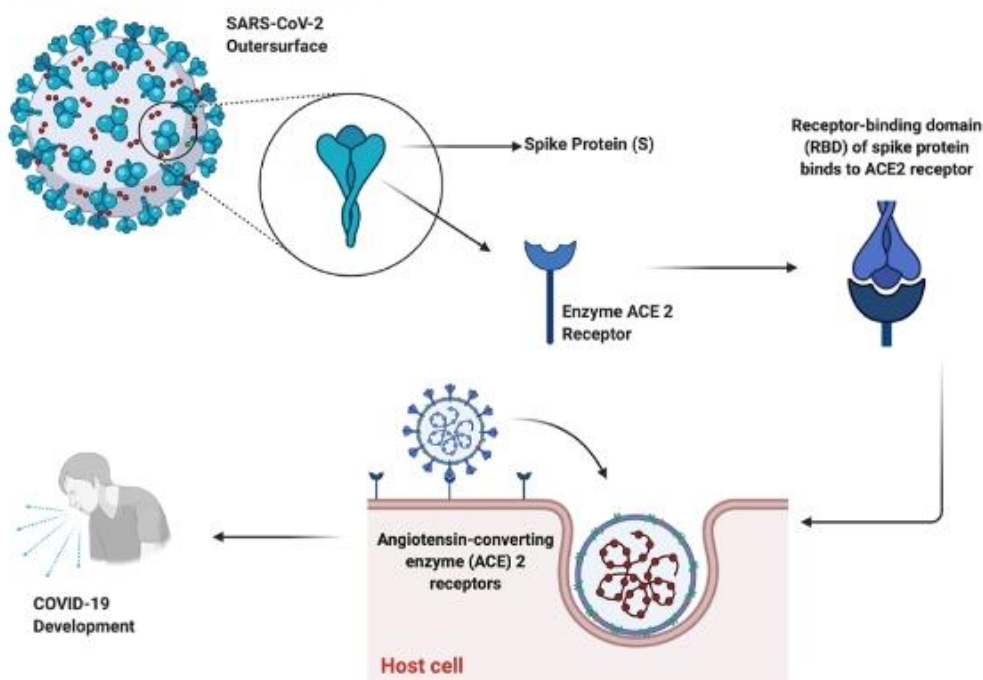


Fig. 2. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Made by biorender.com.

[131]. According to this study, the ratio can be used to facilitate diagnosis, since PCR has shown a great number of false negatives. However, it may not be used as a differential diagnosis since this ratio is not known in other diseases. Lactate dehydrogenase has shown to be a powerful biomarker and predictive to worse outcomes in COVID-19 disease, which can lead to more attention to patients presented with higher levels of the enzyme.

3. Entrance and viral enzymes

As described above, SARS-CoV-2 is a type of coronavirus which is dependent of the successful host cell entry for their replication and release of new virions.

It's widely known that the SARS-CoV-2 have the crown appearance due the spike glycoprotein presents in their envelope surface (Fig. 2). This large glycoprotein (approx. 180 kDa), Spike

protein, or S protein has two domains (S1 and S2). Initially, the S protein binds a specific cellular receptor which leads to a series of proteolytic events resulting in the fusion of cell and viral membranes. Specifically, the receptor-binding domain (RBD) present on S1, which is responsible for binding the cellular receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE-2) as mentioned above (Topic 2.1), and S2 domain is responsible for start the membranes fusion event (Fig. 3) [132,133].

For the successful viral replication occur, depending on SARS-CoV-2 strain and host cell type, several proteases as ACE-2, transmembrane serine proteases 2 (TMPRSS2) Furin and Cathepsin L is involved to active and cleavage of the S protein [134,135]. After the SARS-CoV-2 binding onto the ACE-2 receptor (Fig. 3, step 1), the S1 subunit proteolysis may facilitated by plasma membrane-bound serine protease TMPRSS2 and Cathepsin L [134]. As described previously (Topic 2.2), TMPRSS2 is a cell-surface protein which has

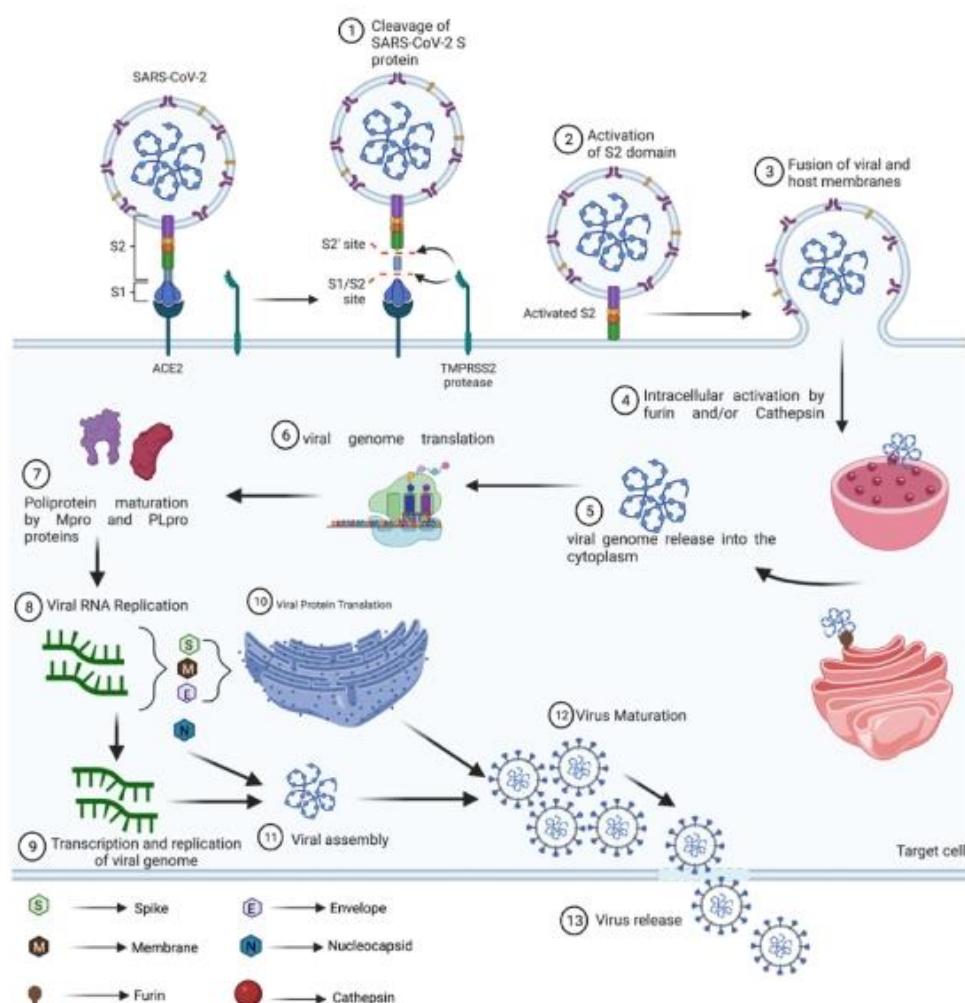


Fig. 3. Schematic representation of SARS-CoV-2 host cell entry. Adapted for Gioia et al., 2020. Made by bioRender.com.

been involved in the proteolytic activation of S protein and consequently facilitating the entry of the virus into the human cell [132,133]. Cathepsin L (EC 3.4.23.25) also mediates the membrane fusion [134].

Evidence indicates that while TMPRSS2 acts locally at the host cell plasma membrane and possibly during the formation of endocytic vesicle on neutral pH, the Cathepsin L terminate the S1 degradation in the acidic endosome and lysosome [134–136]. Both process (TMPRSS2 and Cathepsin L) may continue during virus endocytosis [134].

Mediated by cathepsin in lysosomes, cleavage induces membrane fusion, forming a pore for viral passage into the cytoplasm [132,133].

Intracellular activation of protein S can also be performed by Endoprotease Furin (EC 3.4.21.75) in the Golgi complex (Fig. 3 step 4). Among the host proteases involved in viral infection, Furin is the most widely present in a variety of cell types and for its ability to activate other cellular proteins and in SARS-CoV-2.

Among host proteases involved in the viral infection, Furin is the one most widely present in a variety of cell types. It is an endoprotease which shows ability to activate other cellular proteins, and in SARS-CoV-2 activation is not clear.

But in theory, Furin activates surface glycoproteins by fusion, attacking the cleavage site facilitating the virus entry [132,133]. Moreover, acting in the virus entry, Furin also contributes during the transport of virions improving the virus diffusion [132].

The expression profile of Furin and ACE-2 in human cells could explain why SARS-CoV-2 is so efficient in spreading virus particles, since they are present throughout the body in endothelial cells with particularly increased levels in cells lying in alveoli and small intestine [132,133].

Once inside the host cell, the life cycle of SARS-CoV-2 started with the viral genome translation (Fig. 3, step 6), which 75% is translated in polyproteins accountable for the replication [132,133].

Two enzymes are involved in the cleaving viral polyproteins process: the papain-like protease (PLpro) and the main protease (Mpro) (Fig. 3, step 7). The two proteases have an important role in the SARS-CoV-2 life cycle. Mpro (EC 3.4.22.69) in their active form is a homodimer protein and their structure resembles the cysteine protease and 3 chymotrypsin protease. PLpro (EC 3.4.22.B14) is responsible for cleavages located at the N-terminus of the replicase polyprotein [132,133]. Some enzymes like the PLpro recognize host proteins such as Ubiquitin and acts preventing mutations in the PLpro for instance.

The other 25% of viral genome is translated to accessory and structural proteins: Spike (S), Envelope (E), Membrane (M) and Nucleocapsid (N) (Fig. 3, step 8) [132,133]. The transcription and replication of viral genome starts and amplifies the number of virus genome copies. The viral protein translation starts at the endoplasmic reticulum (Fig. 3, step 10) and the virion assembly occurs. After virion maturation, the newly viral particles are release [132,133].

4. The effect virus mutation on enzymes

Mutations can happen to RNA viruses since their replicatory enzymes, like RNA polymerase, are not fail-safe like DNA viruses or DNA cells. Because of that, alterations in the RNA virus genome are much more common when compared to other viruses and cells [137,138]. SARS-CoV-2 is an RNA virus, so mutations can easily happen. Since December 2019, a new variant of the SARS-CoV-2 virus has emerged and created some questions, such as if the variant can alter in some way the disease in the human body.

The most common mutation found was in the spike protein D614G [139]. Spike proteins are the ones that make the crown shape of the

virus, and they are usually associated with the interaction between the virus and the cell [140]. This mutation affects the replication speed of the virus, but not disease severity [141,142]. It is interesting to notice that higher levels of viral RNA are found in people infected with the new variant, but the new variant is not related to more severe cases [139]. Instead, the mutation only affects the replication speed of the virus, making it much more contagious [141]. This can be explained by an increase in the affinity with the ACE-2 receptors and a more effective entry in the cells from the respiratory tract [143].

Other variants were found that justify some of the more affected organs and systems, but the mutation in the spike protein D614G was prevalent. According to Hu et al. (2020) [137] these other variants can increase respiratory symptoms, heart disease, thromboembolic events, among others, because of the affinity with each cell. It is important to point that it is not known yet if the new variant affects the effectiveness of the vaccines, but we suspect does not, since the new protein is not bind immune cells [139].

Funding

This Study was supported by CNPq (LBC) Grant 301830/2017-7), CAPES and FACEPE (LCM Scholarship: 88882.380416/2019-01; MHMEA Scholarship: 88887.175808/2018-00).

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors are thankful to LIKA, CNPq, CAPES and FACEPE.

References

- [1] A.R. Bourgonje, A.E. Abdulle, W. Timens, J.L. Hillebrands, G.J. Navis, S.J. Gordijn, M.C. Bolling, G. Dijkstra, A.A. Voors, A.D. Osterhaus, P.H. van der Voort, D.J. Mulder, H. van Goor, Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 (COVID-19), *J. Pathol.* 251 (3) (2020) 228–248, <https://doi.org/10.1002/path.5471>.
- [2] C. Robba, D. Battaglini, P. Pelosi, P.R.M. Rocco, Multiple organ dysfunction in SARS-CoV-2: MODS-CoV-2, *Expert Rev. Respir. Med.* 14 (2020) 865–868, <https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1778470>.
- [3] Y. Li, M. Li, M. Wang, Y. Zhou, J. Chang, Y. Xian, D. Wang, L. Mao, H. Jin, B. Hu, Acute cerebrovascular disease following COVID-19: a single center, retrospective, observational study, *Stroke Vasc. Neurol.* 5 (3) (2020) 279–284, <https://doi.org/10.1136/svn-2020-000431>.
- [4] M. Soy, G. Keser, P. Atagündüz, F. Tabak, I. Atagündüz, S. Kayhan, Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and overview of anti-inflammatory agents used in treatment, *Clinic. Rheumatol.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s10067-020-05190-5>.
- [5] N.D. Reynolds, M.N. Aceves, J.L. Liu, J.R. Compton, D.H. Leary, B.T. Freitas, S.D. Pegan, K.Z. Doctor, F.Y. Wu, X. Hu, P.M. Legler, The SARS-CoV-2 SSIHPS recognized by the papain-like protease, *ACS Infect. Dis.* 7 (2021) 1483–1502, <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00866>.
- [6] J. Chen, J. Fan, Z. Chen, M. Zhang, H. Peng, J. Liu, L. Ding, M. Liu, C. Zhao, P. Zhao, S. Zhang, X. Zhang, J. Xu, Nonmuscle myosin heavy chain IIA facilitates SARS-CoV-2 infection in human pulmonary cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* (50) (2021) 118, <https://doi.org/10.1073/pnas.2111011118>.
- [7] C.C. Leslie, Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease, *J. Lipid Res.* 56 (8) (2015) 1386–1402, <https://doi.org/10.1194/jlr.R057588>, Epub 2015 Apr 2, Aug.
- [8] P.K. Robinson, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem.* 59 (2015) 1–41, <https://doi.org/10.1042/bse0590001>, Erratum in: *Essays Biochem.* 2015;59:75.
- [9] D.C. Whitcomb, M.E. Lowe, Human pancreatic digestive enzymes, *Jan. Dig. Dis. Sci.* 52 (1) (2007) 1–17, <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9589-z>, Epub 2007 Jan 5.
- [10] Q. Ruan, K. Yang, W. Wang, L. Jiang, J. Song, Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China, *Intensive Care Med.* (2020), <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x>.
- [11] J.L. Frater, C. Zini, G. d' Onofrio, H.J. Rogers, COVID-19 and the clinical hematology laboratory, *Int. J. Lab. Hematol.* (2020), <https://doi.org/10.1111/ijlh.13229>.

APÊNDICE B – PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE AZOCOLL E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 016697 2

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE SÍNTESE DO COMPÓSITO MAGNÉTICO DE AZOCOLL E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE

Resumo: Biomoléculas de interesse industrial necessitam passar por processos de concentração e purificação para serem comercializadas e/ou aplicadas para fins terapêuticos, processos que demandam várias etapas, tempo, elevado custo e especificação, resultando no desenvolvimento de métodos inovadores com intuito de solucionar essa problemática. A presente patente de invenção descreve um novo método para a purificação de colagenase utilizando composto magnético de azocoll, sintetizado com cloretos férricos e azocoll, com um núcleo magnético de atividade superparamagnético, e um ligante específico para a colagenase, apresentado eficiente desempenho na purificação e/ou separação da enzima, alta especificidade, de simples utilização e síntese, baixo custo, podendo purificar colagenase diretamente do extrato de diferentes origens, sem a necessidade de etapas prévias ou posteriores, podendo ainda ser reutilizado em processos seguintes de purificação.

Figura a publicar: 2

