



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ROMUALDO BRANDÃO COSTA JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UMA COLAGENASE

PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* UCP1276

Recife, junho de 2023

ROMUALDO BRANDÃO COSTA JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UMA COLAGENASE
PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* UCP1276

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Aplicada à Saúde (PPGBAS) da
Universidade Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do Título de Doutor.

Discente: Msc. Romualdo Brandão Costa Júnior

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto

Recife, junho de 2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Costa Júnior, Romualdo Brandão
Avaliação do potencial biotecnológico de uma colagenase produzida por *Aspergillus terreus* UCP1276. /
Romualdo Brandão Costa Júnior. – 2023.

88 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade
Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Biocatálise. 2. Bioconversão. 3. Atividade enzimática. 4. Ultrassom. 5. Cicatrização. 6. Biofilme.
I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (Orient.). II. Título.

570

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-090

ROMUALDO BRANDÃO COSTA JÚNIOR

TESE DE DOUTORADO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE UMA COLAGENASE
PRODUZIDA POR *Aspergillus terreus* UCP1276

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do Título de Doutor.

Aprovado em: 30/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Prof^a. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Presidente) - UFRPE

Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento (Examinador Externo) -UFPI

Prof^a. Juanize Matias da Silva Batista (Examinador Externo) – UFRPE

Profa. Marcia Nieves Carneiro da Cunha (Examinador Externo) – UFRPE

Profa. Marllyn Marques da Silva (Examinador Externo) – UFRPE

Suplentes:

Prof. Valdemiro Amaro da Silva Junior

Profa. Raquel Pedrosa Bezerra – UFRPE

EPÍGRAFE

Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Venho por meio deste realizar um agradecimento conjunto a todos os meus familiares e amigos que contribuíram com a execução desse projeto. O meu muito obrigado por todos os conselhos úteis, bem como as palavras motivacionais que me fizeram transcender barreiras e concluir essa etapa profissional, a qual tenho profundo respeito e admiração.

É com muita admiração e enorme respeito que venho mostrar toda minha gratidão a minha Orientadora Professora Ana Porto por total incentivo e confiança durante todos os momentos deste trabalho. Sempre presente, agradeço profundamente por sua participação em minha vida e por me conduzir no âmbito profissional e pessoal.

DEDICATÓRIA

Não há como não ser grato e devolver tamanha
gratidão, e assim, não dedicar este trabalho a
minha FAMÍLIA! Por vocês, para vocês.

RESUMO

Nos últimos anos, o ultrassom (US) tem sido usado com sucesso em um grande número de Bioprocessos na área da biotecnologia, tais como no melhoramento (upregulation) da hidrólise enzimática (biocatálise). O uso do US no tratamento ou pré-tratamento é supostamente visto para ativar/acelerar a catálise enzimática e consequentemente melhorar a formação do produto. As collagenases são proteases capazes de degradar o colágeno nativo e desnaturado, com aplicações relevantes em couro, alimentos, indústrias farmacêuticas e cosméticas, bem como na área médica visando o tratamento de queimaduras e feridas. Os filmes ou membranas para revestimentos são definidos como matrizes preparadas a partir de biomateriais e amplamente utilizadas desde a área farmacêutica até a alimentícia. Quitosanas e galactomanana apresentam propriedades físicas particulares para diferentes formulações filmogênicas, sugerindo sua promissora utilização como curativo tópico de feridas, por exemplo. A presente pesquisa mostra a potencial aplicação do US na enzima collagenase purificada de *Aspergillus terreus* UCP1276 como uma técnica biotecnológica para melhorar suas aplicações biomédicas, e produzir um biofilme formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), atóxico, hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de acesso fácil, associado às nanopartículas de prata, com características antibacterianas, oriundas de bioativos de origem microbiana, os quais podem potencializar o efeito cicatrizante de feridas. Os resultados demonstraram um real e significativo aumento na atividade da collagenase sendo percebida pela degradação do colágeno tipo I associada a um aumento da atividade da enzima mesmo na presença de inibidores. Além disso, quando a collagenase purificada foi submetida à exposição ao US, tornou-se mais eficaz para degradar o colágeno tipo I e produzir peptídeos biologicamente ativos em ensaios de atividade anticoagulante. Ainda, o novo produto descrito e formulado, composto por um blend de polissacarídeo, enzima, peptídeos e nanopartículas foi capaz de regenerar tecidos expostos à lesão. Os resultados evidenciaram a eficiência dos peptídeos oriundos do colágeno na redução do período de tratamento das lesões, sugerindo que a permeabilidade celular.

Palavras-chave: Biocatálise; bioconversão; atividade enzimática; ultrassom; cicatrização; Biofilme.

ABSTRACT

In recent years, ultrasound (US) has been successfully used in many bioprocesses in the area of biotechnology, such as in the improvement (upregulation) of enzymatic hydrolysis (biocatalysis). The use of US in treatment or pre-treatment is supposedly seen to activate/accelerate enzymatic catalysis and consequently improve product formation. Collagenases are proteases capable of degrading native and denatured collagen, with relevant applications in leather, food, pharmaceutical and cosmetic industries, as well as in the medical field for the treatment of burns and wounds. The films or membranes for coatings are defined as matrices prepared from biomaterials and widely used from the pharmaceutical to the food area. Chitosan and galactomannan have particular physical properties for different filmogenic formulations, suggesting their promising use as a topical wound dressing, for example. The present research shows the potential application of US in the purified collagenase enzyme of *Aspergillus terreus* UCP1276 as a biotechnological technique to improve its biomedical applications, and to produce a biofilm formulated based on a polysaccharide blend (chitosan and galactomannan), non-toxic, hydrophilic, biocompatible, biodegradable and easily accessible, associated with silver nanoparticles, with antibacterial characteristics, derived from bioactives of microbial origin, which can potentiate the healing effect of wounds. The results demonstrated a real and significant increase in collagenase activity being perceived by the degradation of type I collagen associated with an increase in enzyme activity even in the presence of inhibitors. In addition, when purified collagenase was subjected to US exposure, it became more effective at degrading type I collagen and producing biologically active peptides in anticoagulant activity assays. In addition, the new product described and formulated, composed of a blend of polysaccharide, enzyme, peptides and nanoparticles, was able to regenerate tissues exposed to the lesion. The results showed the efficiency of peptides from collagen in reducing the treatment period of lesions, suggesting that cellular permeability.

Keywords: Biocatalysis; bioconversion; enzymatic activity; ultrasound; wound healing; Biofilm.

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	10
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PROTEASES	14
2.2 ENZIMAS COLAGENOLÍTICAS	17
2.2.1 COLAGENASE PURIFICADA DE <i>ASPERGILLUS TERREUS</i>	19
2.3 COLAGENASES PRODUZIDAS POR FUNGOS	19
2.4 COLÁGENO - SUBSTRATO	20
2.5 ULTRASSOM: PRINCÍPIOS BIOFÍSICOS E APLICAÇÕES	21
2.6 EFEITOS DO ULTRASSOM EM PROPRIEDADES DE ENZIMAS	23
2.7 CICATRIZAÇÃO, BIOFILMES, COLAGENASES E PEPTÍDEOS DE COLÁGENO EM PROCESSOS CICATRICIAIS	25
3. OBJETIVO GERAL	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO I - ARTIGO PUBLICADO ULTRASOUND-ASSISTED ENZYME-CATALYZED HYDROLYSIS OF COLLAGEN TO PRODUCE PEPTIDES WITH BIOMEDICAL POTENTIAL:COLLAGENASE FROM ASPERGILLUS TERREUS UCP1276	46
CAPÍTULO II - PEDIDO NACIONAL DE INVENÇÃO, MODELO DE UTILIDADE, CERTIFICADO DE ADIÇÃO DE INVENÇÃO E ENTRADA NA FASE NACIONAL DO PCT	55
TÍTULO DA INVENÇÃO OU MODELO DE UTILIDADE (54): BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO	
CONSIDERAÇÕES FINAIS	84

LISTA DE FIGURAS

Figuras – Revisão de Literatura

Figura 1. Esquema do local de ação das proteases nas cadeias polipeptídicas.

Figura 2 – Estrutura de tripla hélice de colágeno: A (Adaptado de Morris e Gonsalves, 2010) e B (Adaptado de TQS, 2004). Fonte: Am. J. Biochem. & Biotech, 6 (4):. 239-263 de 2010p.

Figura 3. Ultrassom de uso laboratorial. A) Banho ultrassônico termostatizado com frequência fixa em 40kHz. B) Mecanismo de ação das ondas através da água para gerar alteração na atividade da Enzima Collagenase.

Figura 4. Esquema cronológico do processo de cicatrização tecidual.

Figura 5. Indução do processo de cicatrização por aumento da permeabilidade vascular e celular.

Figuras – Capítulo I

Figure 1. Spatial distribution of the samples in the ultrasonic water bath.

Figure 2. Elution profile of collagenase from *Aspergillus* UCP 1276 through gel filtration chromatography on Superdex 75 column (ÄKTA avant).

Figure 3. a) Effects of ultrasound exposure on the purified collagenase using Azocool as substrate. The reaction time was evaluated until 200 min. The assays were divided by reactions partially inhibited and non-inhibited by PMSF inhibitor (10 mM) and by the US treatment (dashed line) or Absence (continuous line). They are also classified by the moment of US exposure: before the protease reaction (—■—), during the protease reaction (—★—), native enzyme (—◆—), the control (○) and negative control (+). **b)** Collagenase previously purified without US conditions. Native collagenase obtained from gel filtration.

Figure 4. Hydrolysis of Collagen by collagenase protease over time. **A)** Hydrolysis of Collagen type I without US conditions at different times (0, 5, 15 and 30 min). **B)** Ultrasound exposure time 5, 15

and 30 minutes. During these time intervals the samples were analyzed by 12% SDS-PAGE. M – Markers.

Figure 5. The effect of peptides produced by collagen hydrolysis on anticoagulant activity was assayed. Time of US exposure were determined and assayed according to: (●) 30min; (*) 15 min; (■) 5min of exposure.

Figure 6. (A) Photographs of macroscopic appearance of wound repair covered with the chitosan-only film (control group), chitosan + 2.5mg of peptides (group 1), and chitosan + 5.0mg of peptides (group 2). Scale bar = 1 cm. (B) Histological micrographs (larger—40× and smaller—400×) from control and film-treated animals, (c) crust, (gt) granulation tissue, (ta) transition area, (ep) epithelization, (v) vascularization, (r) remodeling). Double arrows—new tissue, white arrow—fibroblast, and dark arrow—differentiated remodeling tissue. Hematoxylin-eosin staining

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, as proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas ou peptídeos, liberando oligômeros de tamanho variável ou aminoácidos livres. Proteases collagenolíticas possuem a capacidade de hidrolisar tanto colágeno nativo quanto desnaturado, e estão tornando-se cada vez mais importantes comercialmente (LIMA et al., 2009). As collagenases produzidas por microrganismos são preferíveis, quando comparadas com as dos mamíferos ou plantas, por causa da diversidade bioquímica e susceptibilidade à manipulação genética que suas fontes possuem (PANDEY et al., 2019).

Os fungos possuem grande vantagem dentre os microrganismos produtores de enzimas collagenolíticas, uma vez que a sua engenharia genética, tem demonstrado maior habilidade em sintetizar esse tipo de protease apresentando características de termo-estabilidade e maior rendimento. A produção enzimática ocorre extracelularmente, o que torna particularmente mais fácil a sua recuperação após o final da fermentação (SANDHYA et al., 2020). Collagenases têm sido descritas na utilização em diversos segmentos biotecnológicos e biomédicos, envolvendo áreas como: medicinal, farmacêutico, alimentício, cosmético e têxtil (KANTH et al., 2018). Quanto à aplicação médica, há relatos na literatura de sua aplicação no tratamento de úlceras e queimaduras (PÜLLEN et al., 2019), na aceleração da cicatrização de feridas por pressão (SHMOILOV et al., 2006), na produção de peptídeos bioativos com atividades antioxidante e antimicrobiana (LIMA et al., 2014), além de possuírem um importante papel no sucesso de cirurgias para transplantes de alguns órgãos (SHMOILOV et al., 2016).

Diversos processos têm sido desenvolvidos para otimizar a atividade de proteases, devido ao seu vasto potencial de aplicações biotecnológicas. Isso acontece, uma vez que na reação enzimática a catálise tradicional pode apresentar desvantagens, tais como baixa taxa de utilização da enzima, baixa taxa de conversão do substrato, o tempo de reação longo, e consumo extenso em termos energéticos. Isto está diretamente relacionada, por exemplo, com a conformação inadequada da proteína, reduzindo a susceptibilidade em atacar as ligações enzima-substrato. O ultrassom exerce

os seus efeitos, principalmente, através de um fenômeno chamado cavitação. A cavitação é a formação, crescimento e, às vezes, a implosão de microbolhas criado num líquido quando as ondas de ultrassom tentam propagar através dele. Um desses métodos é o uso do Ultrassom de ondas curtas (ABADÍA-GARCÍA ET al., 2016). A tecnologia de ultrassom, como uma nova tecnologia de processamento e melhoramento, tem atraído muita atenção na extração assistida de componentes bioativos e na hidrólise enzimática assistida.

A utilização do ultrassom em reações de hidrólise pode ser uma ferramenta importante no controle sobre agregação ou dispersão de partículas, proporcionando mudanças conformacionais na estrutura das proteínas, assim como aumentando a transferência de massa entre substrato-enzima (YU; ZENG; LU, 2013). Tendo em vista, o colapso cavitacional ocasionado pelas ondas ultrassônicas, o qual proporciona aumento da pressão e temperatura em regiões determinadas, muitos estudos começaram a ser desenvolvidos, sugerindo que os efeitos mecânicos e químicos gerados durante a sonicação desempenham um papel importante na ativação de enzimas (ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014;). Em reações enzimáticas o ultrassom pode agir alterando as condições do meio, e perturbando as ligações fracas, induzindo mudanças conformacionais na estrutura das proteínas. Isso pode levar a ativação de muitas enzimas, devido às pequenas alterações na estrutura e nas condições ambientais, como temperatura, pressão, tensão de cisalhamento e pH (ISLAM; ZHANG; ADHIKARI, 2014). Os efeitos cavitacionais em combinação com a frequência de irradiação podem promover a formação de radicais livres, que atuam alterando as células e enzimas presentes no meio. No caso de proteínas globulares, como no caso das enzimas, frequências entre 0-100 kHz são fortemente absorvidas e podem levar ao rompimento da estrutura. Com a formação de radicais hidroxila (OH) e a geração de calor durante o colapso de bolhas, pode-se afetar a estabilidade do biocatalisador, sendo este um fator limitante para aplicações combinadas de ultrassom/enzimas (MAWSON et al., 2011).

A descoberta de microrganismos produtores de moléculas bioativas, a escassez de técnicas que possam gerar aceleração das reações catalíticas e o potencial biotecnológico de fungos,

direcionam e norteiam o objetivo deste trabalho em gerar uma ferramenta que possa minimizar o tempo das reações enzimáticas e consolidar no setor industrial de produtos farmacêuticos - atualmente em expansão com a implantação do pólo Farmacoquímico de Pernambuco, o uso da enzima Colagenase purificada de *Aspergillus* com potencial biomédico na produção de peptídeos ativos e tratamento de feridas.

Os filmes ou membranas para revestimentos são definidos como matrizes preparadas a partir de biomateriais e amplamente utilizadas desde a área farmacêutica até a alimentícia (BEVERLYA et al., 2008). No campo farmacêutico, por exemplo, filmes preparados a base de Policaju (MONTEIRO et al., 2007) e quitosana (KATO et al., 2003) foram desenvolvidos como curativos para feridas, em virtude das suas características de liberação e de adesão. Além disso, eles têm sido aplicados no desenvolvimento de biossensores, membranas biológicas, experimentos imunológicos e fios de sutura por serem biodegradáveis e biocompatíveis (WATANABE et al., 2005). Nesse sentido, o desenvolvimento tecnológico de novas formas farmacêuticas em escala nanométrica tem sido uma estratégia promissora para aumentar, de forma controlada, a penetração de fármacos através da pele. A utilização de matrizes da quitosana e galactomanana extraída das sementes de *C. grandis* com estruturas nanométricas incorporadas (peptídeos, e nanopartículas) apresentaria, portanto, características vantajosas para a aplicação tópica, principalmente no que se refere ao contato íntimo, o que possivelmente aumentaria a quantidade de agente capaz de penetrar na pele.

2. REVISÃO DE LITERATURA

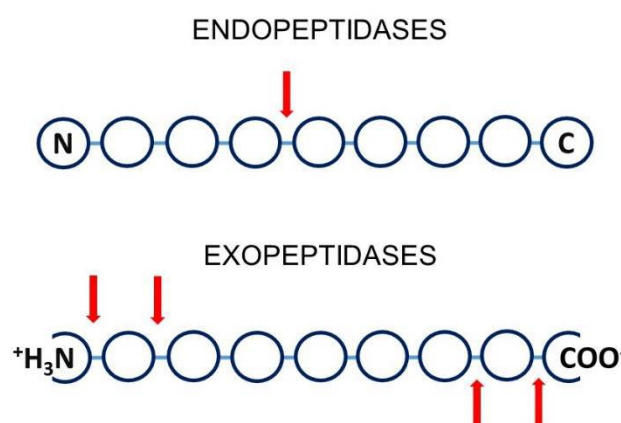
2.1 PROTEASES

As proteases (ou enzimas proteolíticas) pertencem ao grupo das hidrolases e catalisam a quebra de ligações amida em moléculas proteicas. Apesar de também serem chamadas de proteinases e peptidases, as proteinases degradam as proteínas, enquanto as peptidases estão restritas aos fragmentos de proteínas ou peptídeos (SAXENA, 2015; CAMARGO et al, 2012).

Essas enzimas são agrupadas de acordo com a especificidade com o substrato, podendo clivar as extremidades C-terminal e N-terminal (exopeptidases) ou sequências dentro da cadeia polipeptídica (endopeptidases) como demonstrado na Figura 1. A classificação das proteases pode ser feita, também, segundo a especificidade de sua cadeia lateral e da presença de grupo funcional no sítio ativo, agrupando-as em serino proteases, cisteíno proteases, aspartil proteases, treonino proteases, glutâmico proteases e metalo proteases (BARRET, 1999).

Nas serino-, treonino- e cisteíno- proteases a clivagem de ligações peptídicas ocorre através da cadeia lateral nucleofílica de um aminoácido. As aspartil-, glutâmico- e metalo- proteases, por sua vez, atuam nas ligações peptídicas através de uma molécula de água ativada (RAWLINGS; BARRETT, 2013a). As aspartil proteases possuem resíduos de aspartato como ligantes de moléculas de água ativadas, enquanto resíduos de glutamina são os ligantes das glutâmico-proteases. Todas as enzimas aspartil e glutâmicos proteases são endopeptidases (RAWLINGS; BARRETT, 2013a). Nas metalo proteases o ligante normalmente é um íon di-valente (zinco, cobalto, manganês, níquel ou cobre) ancorado por aminoácidos (RAWLINGS; BARRETT, 2013b). As cisteíno proteases atuam nas ligações peptídicas através dos grupos sulfidril de resíduos de cisteína, enquanto as serino proteases dependem de um grupo hidroxil de resíduos de serina. Esses dois tipos possuem mecanismo catalítico similar, onde um nucleófilo e um doador de prótons são requeridos.

Figura 1. Esquema do local de ação das proteases nas cadeias polipeptídicas.



Fonte: Adaptado de McDonald (1985).

Nos organismos vivos, as proteases estão relacionadas a processos regulatórios, regulando a localização e atividade de outras proteínas, criando novas moléculas bioativas, contribuindo para o processamento da informação celular, gerando, transduzindo e amplificando os sinais moleculares. Porém, também são responsáveis por uma variedade de condições patológicas, como o câncer, desordens neurodegenerativas e cardiopatias (CAO et al., 2021).

Na indústria, as proteases são utilizadas em diversos processos tecnológicos como no processamento de alimentos (atuando na clarificação de sucos e fermentação de bebidas e pães), papel (separando a celulose da lignina no processo de preparação da polpa), tecidos (no tratamento de lãs), formulação de detergentes (auxiliando a remoção de manchas), além de ter um importante papel no setor farmacêutico (PATIL AND RATHOD, 2021). Dentre as proteases de aplicação na área farmacêutica, um grupo de enzimas do tipo Colagenase se destacam nesse âmbito. A colagenase contribui para a formação de tecido de granulação e subsequente reepitelização de úlceras da pele. Assim, o colágeno de tecido sadio ou do tecido de granulação recentemente formado não é afetado pela colagenase (MUSTAPHA AND ZHOU, 2021).

2.2 ENZIMAS COLAGENOLÍTICAS

Colagenases são enzimas proteolíticas capazes de degradar a região helicoidal do colágeno em pequenos fragmentos. Em contraste com as colagenases de mamíferos, que clivam a hélice do colágeno em um único ponto, as colagenases microbianas atacam múltiplos sítios ao longo da hélice e por este motivo vem sendo largamente aplicadas na obtenção de peptídeos bioativos do colágeno (VILLEGAS et al., 2018). Devido ao uso potencial das colagenases microbianas na produção de peptídeos bioativos, existe um interesse em encontrar novas linhagens de fungos capazes de produzir estas enzimas com novas características e em um meio de produção com baixo custo industrial (MARTÍNEZ-LAPUENTE et al., 2022).

As collagenases verdadeiras são metalo-proteases zinco-dependentes encontradas em mamíferos e bactérias. Elas são diferenciadas das demais proteases collagenolíticas (serino-collagenases) por terem a capacidade de degradar a forma em tripla hélice do colágeno insolúvel, enquanto as outras degradam o colágeno desnaturado (CONTRERAS-HERNÁNDEZ et al., 2018).

As principais collagenases encontradas são as isoladas de tecido do trato digestivo de vários peixes e invertebrados, incluindo: girino (GROSS e NAGAI, 1965; NAGAI et al, 1966)., Pele de coelho (FULLMER e GIBSON, 1966), tecido uterino de ratos Wistar (JEFFREY e GROSS, 1967), trato digestivo de caranguejos (ZEFIROVA et al, 1996), trato digestivo de camarões (BARANOWSKI et al, 1984), trato digestivo de lagostas (GARCIA-CARRENO et al, 1994), trato digestivo de camarão tropical (*Litopenaeus vannamei*) (VAN SELOS e WORMHOUDT, 1992) e peixe-gato (*Parasilurus asotus*).

As collagenases podem apresentar diferentes massas moleculares com base no tipo de enzima (serina ou metalo-collagenase) e a fonte (microbiana ou tecido animal). Como por exemplo, duas collagenases de *Clostridium histolyticum* que apresentam massa moleculares de 57,0 a 105,0 kDa (HARPER et al., 1965). Collagenases isoladas do *Clostridium perfringens* apresentando massas moleculares variando 80,0 a 120,0 kDa (BOND e VAN WART, 1984). No entanto, as collagenases bacterianas tem normalmente peso molecular <55,0 kDa, enquanto massas moleculares de collagenases obtidos a partir de tecidos animais tendem a ser inferior, a exemplo da collagenase isolada a partir de ossos de rato Wistar com massa molecular de 41,0 kDa (, SAKAMOTO et al.,1972), collagenase de músculo de coelho é entre 33 kDa a 35 kDa (MCCROSKERY et al, 1975), collagenases de glândulas digestivas de organismos marinhos com massas moleculares <60 kDa (KRISTJANSSON et al, 1995; ROY et al, 1996; DABOOR et al, 2010). Entretanto, para uso na indústria, a variação de massa será menos importante do que a atividade collagenolítica geral (NIRMAL et al 2011; DABOOR et al, 2010).

Serino-Colagenases, como todas as serino-proteases contém um resíduo de serina em seus sítios catalíticos. Eles têm tipicamente pesos moleculares na faixa de 24,0 a 36,0 kDa (ROY et al.,

1996). Eles são normalmente associados com o órgão digestivo (ZEFIROVA et al., 2016), são capazes de decompor a estrutura tripla hélice de colágeno tipo I, II e III, e estão frequentemente envolvidos com a produção de hormônios, a degradação protéica, coagulação do sangue e fibrinólise (NEURATH, 1984; NIRMAL et al 2011).

Metalo-colagenases são membros da família Matrix Metallo-proteinase (MMP), com pesos moleculares entre 30,0 a 150,0 kDa (HARRIS e VATAR, 2012). Como todos MMP, metalo-colagenases são enzimas dependentes de zinco e são inibidas por qualquer quelante que se liga a esses íons. Cálcio (íon divalente) é necessário para a estabilidade (STRICKLIN et al., 2017). Apenas MMP 1, 8, 13, 14 e 18 têm atividade contra os tipos de colágeno nativo de cadeia tripla I, II, III, VII e X (FREIJE et al., 1994). Metalo-colagenases são comumente recuperados de tecidos animais como ossos, barbatanas, peles e de hepato-pâncreas de caranguejo marinho (SIVAKUMAR et al., 1999; NIRMAL et al 2011; DABOOR et al, 2010).

Como enzimas proteolíticas, colagenases têm um número de aplicações industriais. No entanto, as utilizações mais comuns destas enzimas parecem estar na medicina. Elas são utilizadas para tratar queimaduras e úlceras (AGREN et al, 2017; PULLEN et al, 2018), para eliminar tecido cicatricial (SHMOILOV et al., 2016) e desempenham um papel importante no transplante bem-sucedido de órgãos específicos (KLOCK et al, 2019; KIN et al, 2020). Na Indústria farmacêutica existem várias aplicações para o uso das Colagenases, principalmente, quando envolve o tratamento de feridas. GYNO IRUXOL (colagenase e cloranfenicol) é um medicamento que envolve associação de colagenase com cloranfenicol e é utilizado como agente debridante em lesões superficiais, promovendo a limpeza enzimática das áreas lesadas, retirando ou dissolvendo, enzimaticamente, tecidos necrosados e crostas. A cicatrização da ferida é acelerada se não houver tecido necrosado no ferimento (ROMANA-SOUZA ET AL., 2023).

2.2.1 COLAGENASE PURIFICADA DE *Aspergillus terreus*

A Colagenase purificada de *Aspergillus terreus* UCP1276 foi produzida a partir de resíduos industriais de penas de galinha utilizadas como fonte de substrato em processo fermentativo submerso. Além disso, a enzima colagenolítica apresentou peso molecular de 28,7kDa, e demonstrou temperatura ótima a 40°C e pH ótimo 9,0. Quando submetida a ensaios de degradação de colágeno, mostrou-se eficiente em hidrolisar os Colágenos bovinos Tipo I e Tipo IV (FERREIRA et al., 2016).

2.3 COLAGENASES PRODUZIDAS POR FUNGOS

Colagenases microbianas são relatados a partir de bactérias, actinomicetos e fungos. Entre os fungos são relatados: *Aspergillus sclerotiorum* (KUNDU et al, 1974), *Aspergillus flavus* (SUKHOSVROVA et al 2003), *Coccidioides immitis* (LUPAN& NZIRAMASANGA 1986), *Arthrobotrys amerospora* um fungo de nematóides (SCHENCK et al 1980), fungo antártico *Arthrobotrys tortor* Jarowaja (TOSI et al 2001) e *Lagenidium giganteum* um fungo parasita-mosquito (DEAN& DOMNAS 1983). TOSI et al (2001) rastrearam espécies fúngicas pertence *Arthrobotrys* para a produção de colagenase e descobriu que a colagenase a partir de estirpe do antártico de *Arthrobotrys tortor* (ATCC 96018) era uma enzima constitutiva e produzia cerca de três vezes mais atividade do que outras espécies *Arthrobotrys tortor* B114, *Arthrobotrys conoides* CMM 1017 e *Arthrobotrys oligospora* CBS 280,86 (NIRMAL et al 2011).

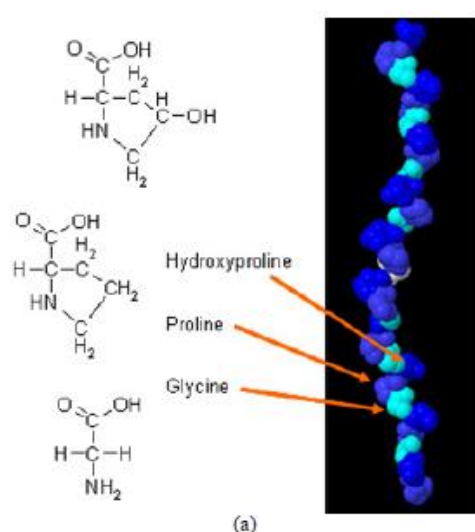
2.4 COLÁGENO - SUBSTRATO

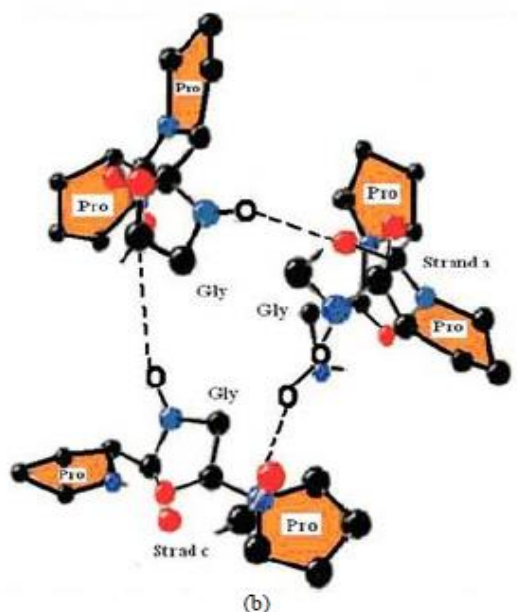
O colágeno é o substrato específico da colagenase e é encontrado nos tecidos conjuntivos de animais, tornando-se aproximadamente 30% da proteína no corpo humano (BHAGWAT et al., 2018). É composto por três cadeias peptídicas numa estrutura de hélice tripla (Figura. 2), que oferecem suporte a ambos as células e tecidos (DABOOR, 2010). Uma cadeia é sempre composta Gly X-Y, nas quais X-Y podem ser qualquer aminoácido (porém, comumente X é uma prolina e Y uma hidroxipolina) e são geralmente estabilizadas por pontes de hidrogênio intercadeias e por ligações cruzadas. Nos mamíferos, cerca de 21 tipos de colágeno foram identificados (KIELTY e

GRANT, 2002; DABOOR et al, 2010), enquanto vinte e oito tipos distintos de colágeno, foram identificados no corpo humano (RASKOVIC et al., 2014).

O percurso helicoidal da estrutura do colágeno é destrógiro, sentido oposto ao enrolamento das hélices polipeptídicas individuais, que é levógira. Essas duas conformações permitem um enrolamento mais apertado possível das múltiplas cadeias polipeptídicas. O enrolamento da hélice tríplice fornece uma grande resistência às forças de tensão, sem nenhuma capacidade para o estriamento. Assim, o colágeno apresenta uma resistência mecânica que é aumentada pelo enrolamento helicoidal de múltiplos seguimentos em uma super-hélice, de uma forma muito parecida a cordões enrolados entre si e sobre si mesmo, para formar uma corda mais resistente (FU e SHI et al., 2022). Os aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, presentes na estrutura do colágeno, não são sintetizados, mas são formados por hidroxilação da prolina e lisina, respectivamente, que se inicia nos ribossomos durante a tradução do mRNA do colágeno. Assim, o processo de hidroxilação é concluído após a formação da estrutura linear (Nuerjiang et al., 2023).

Figura 2 – Estrutura de tripla hélice de colágeno: A (Adaptado de Morris e Gonsalves, 2010) e B (Adaptado de TQS, 2004). Fonte: Am. J. Biochem. & Biotech, 6 (4):. 239-263 de 2010p.





Colágenos foram classificados com base na expressão de genes diferentes durante a construção do tecido. Colágeno do tipo I é o tipo mais comum que se encontra nos ossos, tendões, ligamentos e pele, enquanto o colágeno tipo III, é a segunda mais comum e encontra-se em tecidos elásticos, tais como os vasos sanguíneos e vários órgãos internos (KIELTY e GRANT, 2002; DABOOR et al, 2010). A frequência dos tipos V e XI são baixos, mas eles são encontrados associado aos tipos I e II em osso e cartilagem, bem como em outros tecidos (PROCKOP e KIVIRIKKO, 1995; MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2001; KIELTY e GRANT, 2002; NIRMAL et al 2011).

2.5 ULTRASSOM: PRINCÍPIOS BIOFÍSICOS E APLICAÇÕES

O ultrassom é uma onda mecânica acústica produzida pelo movimento oscilatório das partículas de um meio. Por ser uma forma de energia mecânica tem como principais propriedades, reflexão, adsorção e dispersão, e precisa de um meio físico para se propagar, como através de sólidos, líquidos ou gases (MASON et al., 2005). Ele emite frequências acima de 20 kHz, tendo em vista que o ser humano só consegue detectar frequências entre 20 Hz a 20 kHz. Frequências abaixo de 20 Hz são referidas como infrassom (DALAGNOL et al., 2017).

As ondas ultrassônicas são classificadas em dois grandes grupos, dependendo da sua frequência e intensidade. Ultrassons de baixa energia são de alta frequência (2-20 MHz) e baixa

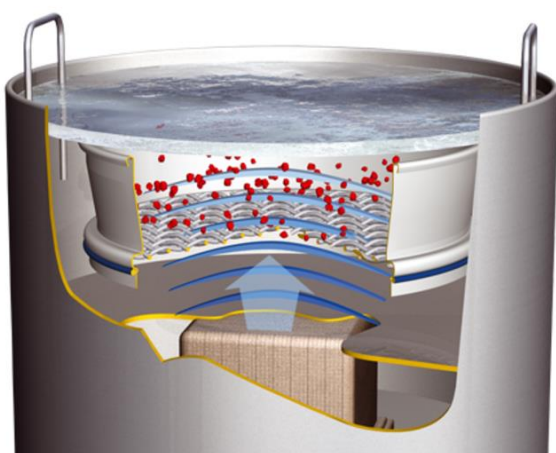
intensidade ($<1 \text{ W.cm}^{-2}$) e não são destrutivos, tendo emprego em técnicas de maturação, concentração ou dispersão de partículas em fluidos (O'DONNELL et al., 2010). Ondas ultrassônicas de alta energia são de baixas frequências (20-100 kHz) e desenvolvem níveis de potência mais altos ($10 - 1000 \text{ W.cm}^{-2}$), com energia suficiente para romper enlaces intermoleculares, sendo capazes de modificar algumas propriedades físicas e favorecer reações químicas (PAWAR et al., 2018).

Figura 3. Ultrassom de uso laboratorial. A) Banho ultrassônico termostatzado com frequência fixa em 40kHz. B) Mecanismo de ação das ondas através da água para gerar alteração na atividade da Enzima Colagenase.

A.



B.



O ultrassom é produzido a partir de um transdutor, que converte a energia elétrica em energia mecânica sonora em frequências ultrassônicas. Os sistemas de aplicação de ultrassom mais utilizados são os banhos e as sondas. No banho, o transdutor é diretamente unido à base ou às paredes

do tanque e a energia ultrassônica é transmitida diretamente através de um líquido, ocorrendo muita dispersão de energia ultrassônica (SINISTERRA, 1992).

A utilização do ultrassom em tecnologias farmacêuticas tem evoluído muito com o passar dos anos, pois é uma técnica que tem apresentado efeitos benéficos na regeneração tecidual de feridas, maiores rendimentos e seletividade em tratamentos de processos inflamatórios (DURMUS et al., 2023).

Além de melhorar a qualidade e segurança dos alimentos, o ultrassom possibilita a elaboração de novos produtos com propriedades distintas (AWAD et al., 2012). Uma das maiores vantagens do uso do ultrassom na indústria de alimentos comparado com outras técnicas é sua ação eficiente, sendo considerada uma técnica segura e não poluente (KENTISH; ASHOKKUMAR, 2011), devido ao fato de se tratar de uma nova tecnologia, com sustentabilidade ambiental (ZHONG et al., 2022).

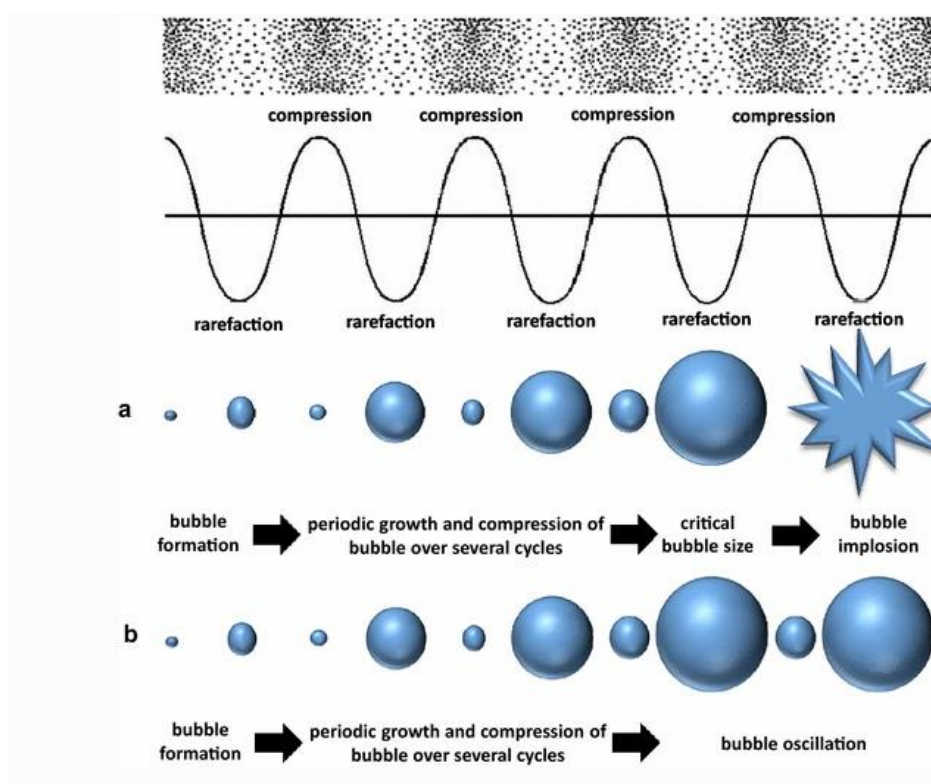
2.6 EFEITOS DO ULTRASSOM EM PROPRIEDADES DE ENZIMAS

A aplicação do ultrassom em reações enzimáticas mostra grande potencial para aplicações industriais. Essa tecnologia pode atuar em três alvos em relação às reações enzimáticas: enzima e substrato isoladamente e / ou sistema de reação mista (WANG et al., 2018), portanto, diferentes fatores podem explicar as alterações na performance da enzima devido a aplicação do ultrassom, sendo importante a discussão de cada um deles. A tecnologia de ultrassom pode afetar a estrutura enzimática devido a mecanismos físicos e / ou químicos (ROJAS, 2017).

O fator limitante para o uso do ultrassom em reações bioquímicas é o aumento na temperatura promovido pela irradiação, uma vez que enzimas podem ser inativadas termicamente. Contudo, este não é de todo um fator negativo já que a inativação térmica de enzimas é importante em alguns processos biotecnológicos. É preciso destacar que a inativação não ocorre em todos os casos, pois o efeito do ultrassom pode ser destrutivo ou construtivo dependendo da intensidade das ondas (LUO et al., 2019). A figura 4 apresenta um dos princípios que podem permitir a ativação enzimática. A

cavitação tende a aumentar o grau de entropia e consequentemente acelerar as reações. Entretanto, o tratamento com ultrassom em frequência e intensidade adequada pode levar a um aumento da atividade enzimática, sendo utilizado como forma de ativar a enzima (YILMAZ, 2018). Em baixas frequências, o ultrassom favorece algumas reações enzimáticas, tanto com a melhora na transferência de massa, quanto atuando sobre a estrutura da enzima (Wang et al., 2018), porém, os efeitos do ultrassom na ativação das enzimas ainda não estão bem claros.

Figura 4. Esquema do processo de cavitação e oscilação das bolhas. Aumento de energia, variação de entropia. (Izadufar et al., 2019)



Subhedar, Gogate (2013) também observaram mudanças na estrutura da celulase. A atividade enzimática aumentou cerca de 24% com a aplicação do ultrassom de sonda após 30 minutos de processo (20 kHz, 17,3 W/cm², 50 °C). A intensidade de fluorescência da celulase tratada com ultrassom diminuiu em comparação com a da celulase não tratada, o que confirmou claramente que, o tratamento ultrassônico diminuiu o número de triptofano na superfície da celulase. A estrutura secundária também foi alterada, sendo observado uma diminuição de 12,4% do conteúdo de α -hélice, e um aumento de 29,6% de bobina aleatória. A aplicação do ultrassom de sonda, operando a

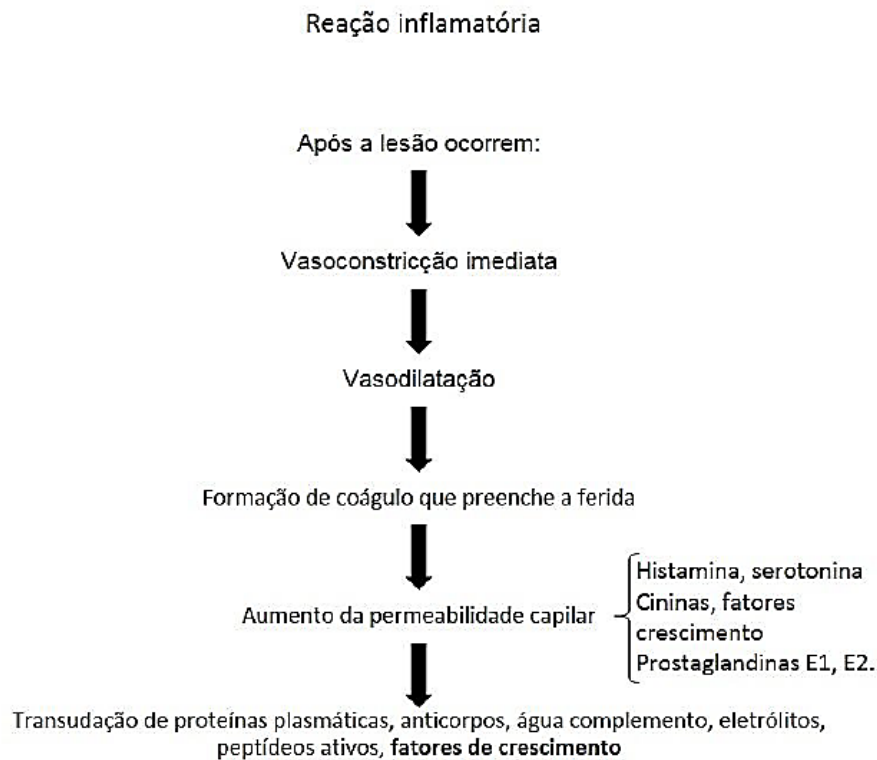
22kHz, 4,5W/ml, 30 °C após 15 minutos aumentou a atividade da pectinase em 21% (MA et al., 2015). O tratamento alterou a estrutura da enzima, diminuindo a quantidade de triptofano na superfície da pectinase, além de aumentar o conteúdo de folha- β . Yu et al. (2013), demonstraram aumento na atividade da tirosinase de 17,2%, após 150 minutos de tratamento em um ultrassom de banho (40kHz, 31W/L, 25°C). Ao analisarem a estrutura da enzima, perceberam mudanças na conformação, com aumento do conteúdo de folha- β .

2.7 CICATRIZAÇÃO, BIOFILMES, COLAGENASES E PEPTIDEOS DE COLÁGENO EM PROCESSOS CICATRICIAIS

O início da cicatrização ocorre após a criação de uma ferida, definida como uma lesão corporal que normalmente envolve laceração ou ruptura de uma membrana e danos aos tecidos subjacentes. A lesão superficial pode ocorrer pela ação de agentes mecânicos ou térmicos, que levam à ruptura da pele ou de outros órgãos e danos ao tecido e sua vascularização. Em seguida ocorre o sangramento, a lesão de endotélio e o extravasamento de proteínas intravasculares e extravasculares. Este ambiente serve como um estímulo para hemostasia, inflamação e outros eventos (NUNEZ et al., 2020). A resolução da lesão começa com a hemostasia através da vasoconstrição e formação de coágulo, levando à cessação do sangramento. A figura 4 resume o processo de cicatrização após uma lesão tecidual.

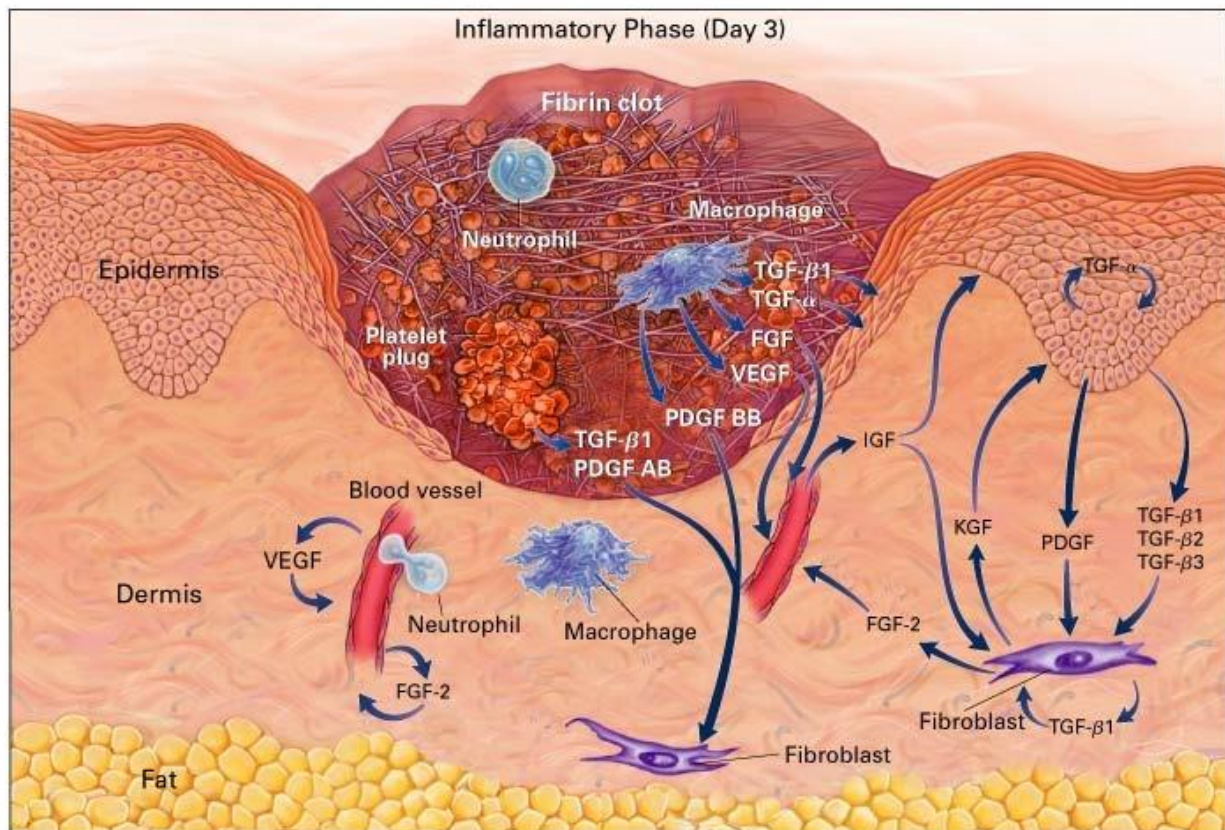
O estabelecimento de vasoconstrição para hemostasia dura apenas minutos e em seguida vários fatores estimulam a resposta inversa que é a vasodilatação. Ela é mediada pela presença de cininas, histamina, prostaglandinas (especialmente E1 e E2) e leucotrienos. A dilatação vascular aumenta o fluxo sanguíneo para a ferida, resultando nos sinais característicos de eritema e calor. O aumento do fluxo acelera a chegada de células de defesa para a lesão e a liberação de mediadores para o local da lesão.

Figura 4. Esquema cronológico do processo de cicatrização tecidual.



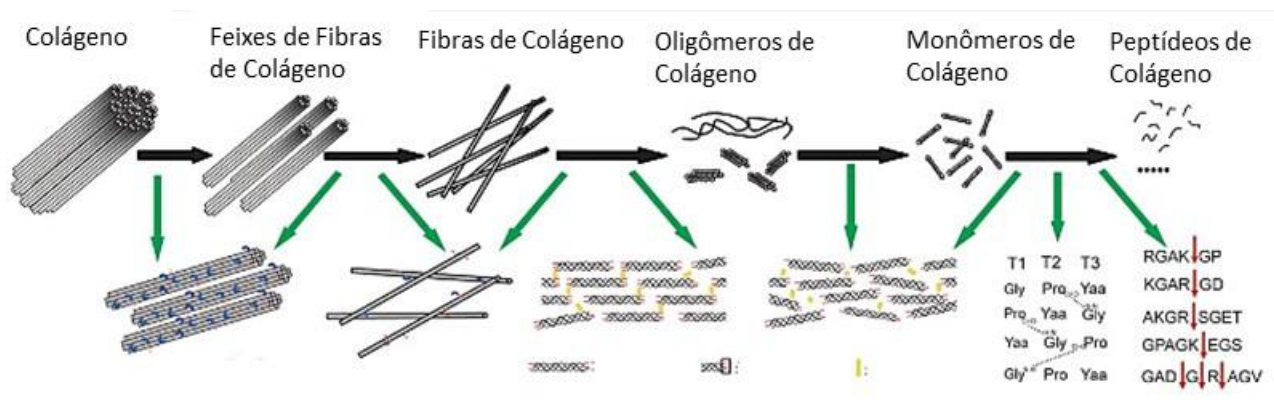
À medida que os vasos se dilatam, formam-se espaços entre as células endoteliais, aumentando a permeabilidade vascular. Muitos dos mediadores liberados, entre os quais as prostaglandinas e histamina também estimulam o aumento da permeabilidade vascular. A figura 5 apresenta vasodilatação em conjugação com o aumento da permeabilidade, o qual permite o transporte de proteínas e componentes celulares para o espaço extravascular, de modo que o extravasamento de fluidos e migração das células resultam em edema da ferida.

Figura 5. Indução do processo de cicatrização por aumento da permeabilidade vascular e celular.



Dentro desse aspecto, sabe-se que os peptídeos podem atuar aumentando a permeabilidade vascular e consequentemente induzindo a uma aceleração do processo de reparo tecidual (CHONGYANG et al., 2021). A figura 6 apresenta a degradação do colágeno e formação dos peptídeos de colágeno, os quais podem variar de tamanho 1,5 a 8,0 kDa (Sighn et al., 2020).

Figura 6. Degradação do Colágeno.



Durante este período, de intensa atividade vascular, e variação na permeabilidade, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais e células epiteliais começam a cobrir o local

da lesão e assim, essas células restabelecem a continuidade do tecido através da deposição da matriz, angiogênese e epitelização.

A quitosana é o único polímero pseudonatural com caráter catiônico e esta característica diferenciada é responsável pela maioria de suas propriedades relatadas, tais como, a possibilidade de interação com cargas negativas geralmente presentes na superfície de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos e ácidos graxos, justificando sua atividade sobre elas, sua solubilidade também é influenciada pela presença dos grupamentos amínicos protonados que garante uma maior repulsão eletrostática entre suas cadeias e assim, maior a solvatação em água, garantindo sua solubilização em soluções aquosas de diversos ácidos orgânicos e inorgânicos (SANTOS et al., 2003). Helander et al. (2001) e Liu et al. (2001) identificaram mecanismos antimicrobianos da quitosana em estudos realizados com diferentes grupos de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos. A formação de uma camada impermeável através da interação com grupos aniônicos na superfície da célula, impedindo a transporte de solutos essenciais para o seu interior foi um dos mecanismos propostos. O segundo mecanismo envolve a inibição da síntese de RNA e proteínas por permeação no núcleo da célula.

As três principais galactomananas utilizadas comercialmente em indústrias de alimentos e não-alimentos são goma guar (*Cyamopsis tetragonoloba*, razão manose/galactose 1,6), goma tara (*Caesalpinia spinosa*, razão manose/galactose 3,3) e goma de feijão alfarroba (*Ceratonia siliqua*, razão manose/galactose 3,75) (DAKIA et al., 2008; DEA; MORRISON, 1975; GIDLEY; REID, 2006). Outras galactomananas comercialmente conhecidas são a goma extraída de *Cassia tora*, com relação manose/galactose de aproximadamente 3,0 (SRIVASTAVA; KAPOOR, 2005) e a galactomanana de feno-grego *Trigonella foenum-graecum* (razão manose/galactose 1,1), comercializadas em menor escala, assim como aquela extraída das sementes de *Prosopis juliflora* (razão manose/galactose 4,2) (FIGUEIREDO, 1983). As galactomananas têm sido usadas como matriz na liberação controlada de drogas, a exemplo da formulação galactomanana/xantana, que já foi utilizada como veículo de liberação controlada de fármacos como diclofenato de sódio e teofilina.

Peptídeos bioativos (BAPs) são fragmentos específicos de proteínas com aproximadamente 2 a 30 aminoácidos e baixo peso molecular. Podem ser obtidos através de fontes alimentares como ovo, leite, peixe, soja, carne ou sangue. Os BAPs são inativos dentro da sequência da proteína parental, porém têm um impacto positivo nos sistemas do corpo humano, com atividades semelhantes a drogas e/ou hormônios capazes de modular funções fisiológicas através da ligação a receptores específicos de células-alvo, levando à indução de respostas fisiológicas (DI BERNADINI et al., 2011; LAFARGA; HAYES, 2014).

BAPs são conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, anti-hipertensiva, anticancerígena, reguladora da saciedade e imunomoduladora, podendo afetar os sistemas cardiovascular, imunológico, nervoso e digestivo (DI BERNARDINI et al., 2011; MARS; STAFLEU; DE GRAAF, 2012). Com relação aos efeitos descritos no sistema cardiovascular, os peptídeos bioativos são capazes de induzir uma atividade anti-hipertensiva através da inibição da enzima conversora de angiotensina, uma enzima chave na regulação da pressão arterial que converte a angiotensina I em angiotensina II, um potente vasoconstritor (NONGONIERMA; FITZGERALD, 2015a).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do ultrassom na atividade colagenolítica de uma protease previamente purificada de *Aspergillus sp.* UCP1276, bem como estudar o potencial biomédico da enzima em ensaios de Cicatrização e produção de peptídeos com atividade anticoagulante. Ainda, em avaliação da sua ação na cicatrização, a enzima foi submetida a dissolução em biofilme polissacarídico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar a enzima com atividade colagenolítica através de métodos cromatográficos convencionais previamente descritos por Ferreira et al. (2016);

- Estudar o efeito do ultrassom na atividade enzimática diante dos substratos Colágeno Tipo I e Tipo V, e do substrato azocool; bem como caracterizar a enzima quanto à cinética enzimática (determinação de K_m e $V_{m\acute{a}x}$) sob ação do ultrassom;
- Avaliar a produção de peptídeos gerados na hidrólise dos Colágenos Tipo I e Tipo IV, bem como sua ação anticoagulante.
- Determinar a ação adjuvante da enzima purificada e os peptídeos gerados em ensaios de cicatrização, através de preparação de biofilme de polissacarídeos.
- Avaliar o potencial cicatrizante de um novo produto a base de um Blend de polissacarídeos, enzima, peptídeos e nanopartículas de prata.

4. REFERÊNCIAS

- ABARCA, M. L.; ACCENSI F, C. J.; CABAÑES, F. J. Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 86, p. 33-49, 2004.
- AGRAHARI S., WADHWA, N., “Isolation and characterization of Feather degrading enzymes from *Bacillus megaterium* SN1 isolated from Ghazipur poultry waste site”, **Applied journal of biochemistry and microbiology**, 2011.
- ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules** Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986.
- ANBU, P.; GOPINATH, S.C.B.; HILDA, A.; LAKSHMIPRIYA, T.; ANNADURAI, G.; Purification of keratinase from poultry farm isolate- *Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. **Enzyme Microb Technol** 36:639–647, 2005.
- ASMA ABOOD, SALMAN M. M., ABDELFAHATTAH AZZA M., EL-HAKIM AMR E., HASHEM AMAL M. Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardia* *dasguptae* NRC2aza and its application in wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 801-810. 2018.

ASENJO, J.A.; ANDREWS, B. A.; Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: Phase Separation and Applications. **J Chromatogr A** 1238: 1-10, 2012.

AWASTHI, P.; KUSHWAHA, R.K.S. New method for determination of feather degradation in soil. **J Mycol Plant Pathol** 41(1):88–90, 2011.

BACH, E.; CANNAVAN, F.S.; DUARTE, F.R.S.; TAFFAREL, J.A.S.; TSAI, S.M.; BRANDELLI, A. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p. 102-107, 2011.

BHAGWAT PRASHANT K., DANDGE PADMA B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 15, 43-55, 2018.

BAYAT, A.; Connective tissue diseases: a nonsurgical therapy for Dupuytren disease. **Nat Rev Rheumatol** 6:7–8. 2010.

BENAVIDES J.; RITO-PALOMARES, M., Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p.133-142 , 2008.

BERNAL, C.; CAIRO, J.; COELLO, N. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. **Enzyme Microbiology Technology**, v.38, p.49–54, 2006.

BIHARI, Z., VIDÉKI, D., MIHALIK, E., SZVETNIK, A., SZABÓ, Z., BALÁZ, M., KESSERU, P., KISS, I. Degradation of native feathers by a novel keratinase-producing, thermophilic isolate, *Brevibacillus thermoruber* T1E. **Z Naturforsch, C, J Biosci** 63: 134–140, 2010.

BOND, M.D. and VAN WART, H. E.; Characterization of the individual collagenases from *Clostridium histolyticum*. **Biochemistry**, 19: 3085-3091. 1984

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1735–1750, 2010.

BRESSOLIER, P.; LETOURNEAU, F.; URDACI, M.; VERNEUIL, B. Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 111–211, 1999.

BOCKLE, B.; GALUNSKY, B.; MULLER, R.; Characterization of keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 40530. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:3705–3710, 1995.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**, editora intercência, Portugal, 2008.

CAI, S.B.; HUANG, Z.H.; ZHANG, X.Q.; CAO, Z.J.; ZHOU, M.H.; HONG, F. Identification of a keratinase-producing bacterial strain and enzymatic study for its improvement on shrink resistance and tensile strength of wool- and polyester-blended fabric. **Appl Biochem Biotechnol**, 2011.

CAO, Z. J.; ZHANG, Q.; WEI, D. K.; CHEN, L.; WANG, J.; ZHANG, X. Q.; ZHOU, M. H.; Characterization of a novel *Stenotrophomonas* isolate with high keratinase activity and purification of the enzyme. **J Ind Microbiol Biotech** 36:181–188, 2009.

CAO, L.; TAN, H.; LIU, Y.; XUE, X.; ZHOU, S.; Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma atroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. **Lett Appl Microbiol** 46:389–394, 2008.

CALLAWAY, J.E.; GARCIA, J.A. Jr.; HERSH, C.L.; YEH, R.K. and M. GILMORE-HEBERT. Use of lectin affinity chromatography for the purification of collagenase from human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemistry**, 25: 4757-4762. 1986.

CEMAZAR, M.; GOLZIO, M.; SERSA, G. et al. Hyaluronidase and collagenase increase the transfection efficiency of gene electrotransfer in various murine tumors. **Hum Gene Ther** 23:128–37. 2012

CHATURVEDI, V. and VERMA, P. Metabolism of Chicken Feathers and Concomitant Electricity Generation by *Pseudomonas aeruginosa* by Employing Microbial Fuel Cell (MFC). **Journal of Waste Management**. Volume 2014, Article ID 928618, 9

CHU, K.H.; Collagenase chemonucleolysis via epidural injection – a review of 252 cases. **Clin Orthop Relat** 215:99–104. 1987

DAGENAIS, T. R. T.; KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.

DALAGNOL LUÍZA M. G., SILVEIRA, VITÓRIA C. C., SILVA HALISSON BARON DA, MANFROI VITOR, RODRIGUES RAFAEL C. Improvement of pectinase, xylanase and cellulase activities by ultrasound: Effects on enzymes and substrates, kinetics and thermodynamic parameters. *Process Biochemistry*, Volume 61, October 2017, Pages 80-87, 2017.

DAROIT, D.J.; CORREA, A.P.F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp P45. **Int Biodeterior Biodegradation**, 2011.

DEAN, D. D. & DOMNAS, A. J. Isolation and partial characterization of collagenolytic enzyme from the mosquito-parasitizing fungus, *Lagenidium giganteum*, **Arch Microbiol**, 136: 212-218. 1983

DEMINA, N.S. Cosmetic product for removing rough skin and reducing wrinkles comprises the microbial collagenase preparation ultralysin. 2009.

DEYDIER, E., GUILLET, R., SARDA, S., SHARROCK, P. Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material?” **Journal of Hazardous Material**, v. 121, p. 141 – 148, 2005.

DESAI, S.S., HEGDE, S., INAMDAR, P., SAKE, N., ARAVIND, M.S. Isolation of keratinase from bacterial isolates of poultry soil for waste degradation. **Eng Life Sci** 10(4):361–367, 2010.

DETTMER, A.; AYUB, M.A.Z.; GUTTERRES, M.; Hide unhairing and characterization of commercial enzymes used in leather manufacture. **Braz J Chem Eng** 28:373–80. 2011

DE VRIES, R. P. ; VISSER, J. ; *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**.v.65, p. 497-522, 2001.

DI LULLO, G.A., S.M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko and J.D. San Antonio, 2002. "Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, Type I collagen. *J. Biol. Chem.*, 277: 4223-4231. DOI: 10.1074/jbc.M110709200.

EASSON MICHAEL, CONDON BRIAN, VILLALPANDO ANDRES, CHANG SECHIN. The application of ultrasound and enzymes in textile processing of greige cotton. *Ultrasonics*, 84, 223-233, 2018.

EIZEN, A.Z. and JEFFREY, J.J.; An extractable collagenase from crustacean hepatopancreas. **Biochimica et Biophys. Acta**, 191: 517-526. 1969.

EL-AYOUTY, Y.M.; AMIRA EL-SAID, A.; SALAMA, A.M. Purification and characterization of a keratinase from the feather-degrading cultures of *Aspergillus flavipes* **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 2313-2319, 2012.

ELKEEB R., ALIKHAN A, ELKEEB L., HUI X., MAIBACH, H. I. Transungual drug delivery: Current status. **International Journal of Pharmaceutics** v.384, p 1–8, 2010.

EVANSON, J.M.; JEFFREY, J.J. and KRANE, S.N. Studies on collagenase from rheumatoid synovium in tissue culture. **J. Clin. Invest.**, 47: 2639-2651. 1968.

FAKHFAKH-ZOURI, N, HADDAR,A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, W. Application of statistical experimental design of optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617-626, 2010.

FARAG, A.M.; HASSAN, M.A. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae* **Enzyme and Microbial Technology**, v.34, p. 85-93, 2004.

FRASER, R.; PARRY, D. Molecular packing in the feather keratin filament. **Structural Biology**, v.162, p.1-13, 2008.

FREEMAN, S.R.; POORE, M.H.; MIDDLETON, T.F.; FERKET, P.R. Alternative methods for disposal of spent laying hens: evaluation of the efficacy of grinding, mechanical deboning, and of keratinase in the endering process. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4515-4520, 2009.

FRIEDRICH, A. B.; ANTRANIKIAN, G.; Keratin degradation by *Fervidobacterium pennavorans*, a novel thermophilic anaerobic species of the order Thermatogales. **Appl Environ Microbiol** 61:3705–3710, 1996.

GODFREY, T.; S.WEST. **Industrial enzymology**, 2.ed. New York: Macmillan Publishers Inc., 609 p, 1996.

GOLDBERG, G.I.; WILHELM, S.M.; KRONBERGER, A.; BAUER, E.A. and GRANT, G.A. *et al.*; Human fibroblast collagenase. Complete primary structure and homology to an oncogene transformation-induced rat protein. **The J. Biol. Chem.**, 261: 6600-6605. 1986.

GOVIND, N.S.; MEHTA, B.; SHARMA, M.; MODI, V.V.; “Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*”, **Phytochemistry**, vol 20, pp 2483-2485, 1981.

GOSHEV, I.; GOUSTEROVA, A.; VASILEVA-TONKOVA, E. and NEDKOV, P. Characterization of the enzyme complexes produced by two newly isolated thermophilic actinomycete strains during growth on collagen-rich materials. **Proc. Biochem.**, 40:1627-1631. 2005.

GUPTA, R., BEG, Q.K., LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol** 59:15–32, 2002

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.70, p. 21-33, 2006.

GUPTA, R.; SHARMAN, R.; BEG, Q. K. Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2012;

GRADISAR, H.; KERN, S.; FRIEDRICH, J.; Keratinase of *Doratomyces microsporus*. **Appl Microbiol Biotechnol** 53:196–200, 2000

GRADISAR, H., FRIEDRICH, J., KRIZAJ, I., JERALA, R. Similarities and specificities of fungal keratinolytic proteases: comparison of keratinases of *Paecilomyces marquandii* and *Doratomyces microsporus* to some known proteases. **Applied Environmental Microbiology**.v.71, p.3420–3426, 2005.

GRANT, G.A., SACCHETTINI, J.C. and WELGUS, H.G. A collagenolytic serine protease with trypsin-like specificity from the fiddler crab, *Uca pugilator*. **Biochemistry**, 22: 354-358. 1983.

HADAS, A.; KAUTSKY, L.; Feather meal, a semi-slow-release nitrogen fertilizer for organic farming. **Fertilizer Research**.v.38, p.165-170, 1994.

HATTI-KAUL, R.; Methods in Biotechnology, Aqueous Two-Phase Systems. Methods and Protocols, **Humana Press**, New Jersey, 2000.

IGNATOVA, G.Z.; GOUSTEROVA, A.; SPASSOV, G.; NODKOV, P. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus* **Can. Journal. Microbiology**, v.5, p. 217-222, 1999.

IJIMA, K.; KISHI, J. and HAYAKAWA, T. Purification and characterization of bovine dental sac collagenase. *J. Biochem.*, 89: 1101-1106. 1981.

INDRA, D., RAMALINGAM, K. and BABU, M. Isolation, purification and characterization of collagenase from hepatopancreas of the land snail *Achatina fulica*. **Comparative Biochem. Phys.**, 142:1-7. 2005.

JEONG, J.H.; PARK, K.H.; OH D.J.; HWANG, D.Y.; KIM, H.S.; LEE, C.Y.; SON, H.J. Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5. **Polymer Degrad Stabil**, 2010

JISHA , V. N., SMITHA , R. B., PRADEEP , S., SREEDEVI , S., UNNI, K. N., SAJITH , S., PRIJI , P., JOSH , M. S. AND BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Adv .Enz .Res .** 1:39 -51. 2013.

JORDAN, G.H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: a prospective, single-center, non-placebo-controlled study. **J Sex Med** 5:180–7. 2008.

KADLER, K.E., HOLEMS, D.F.; TROTTER, J.A. AND CHAPMAN, J.A. Collagen fibril formation. **Biochem. J.**, 316: 1-11. 1996.

KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N.K. AND SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes Pigments**, 76: 338-347. 2008.

KAUFMAN, P.B.; Wu, W.; KIM, D. AND L. Cseke, L. Extraction and Purification of Protein/Enzyme. In: Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and **Medicine: CRC Press**, Inc., Boca Raton Florida. 1995.

KATO, M.; HATTORI, Y.; KUBO, M.; MAITANI, Y. Collagenase-1 injection improved tumor distribution and gene expression of cationic lipoplex. **Int J Pharm** 423:428–34. 2012.

KELLER, S. AND MANDL, I. The preparation of purified collagenases. **Arch Biochem. Biophys.**, 101: 81-87. 1963.

KLOMOVA, O.A.; BORUKHOV, S.I.; SOLOVYEVA, N.I.; BALAEVSKAYA, T.O. AND STRONGIN, A.Y. The isolation and properties of collagenolytic proteases from crab hepatopancreas. **Biochem.Biophys. Res. Commun.**, 166: 1411-1420. 1990.

KLOCK, G.; KOWALSKI, M.B.; HERING, B.J.; EIDEN, M.E. AND WEIDEMANN, A. *et al.*; Fractions from commercial collagenase preparations: Use in enzymic isolation of the islets of Langerhans from porcine pancreas. **Cell Transplant.**, 5: 543-551. 1996.

KIELTY, C.M. AND Grant, M.E.; The Collagen Family: Structure, Assembly and Organisation in the Extracellular Matrix. In: Connective Tissue and its Heritable Disorders, Molecular, Genetic and Medical Aspects, Royce, P.M. and B. Steinmann, (Eds.). **Wiley-Liss**, New York. 2002.

KIM J.D. Purification and Characterization of a Keratinase from a Feather-Degrading Fungus, *Aspergillus flavus* Strain K-03 **Microbiology**, v.35,p. 219-225, 2007.

KIN, T., P.R.V. JOHNSON, P.R.V.; SHAPIRO, A.M.J. AND LAKEY, J.R.T.; Factors influencing the collagenase digestion phase of human Islet isolation. **Transplantation**, 83: 7-12. 2007.

KOBAYASHI, Y., MIYAMOTO, M., SUGIBAYASHI, K., MOTIMOTO, Y. Enhancing effect of N acetyl-l-cysteine or 2-mercaptoethanol on the in vitro permeation of 5-fluorouracil or tolinaftate through the human nail plate. **Chem. Pharm. Bull.** v.46, p.1797–1802, 1998.

KOUTINAS, A.A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p. 93–100, 2003.

KRELPAK, L.; DOUCET, J.; DUMA, P.; BRIKI, F. New aspects of the α -helix to β - sheets transition in stretched hard α -keratin fibers. **Biophysics Journal**.v.87, p.640-647, 2004.

KRIJGSHELD, P.; BLEICHRODT, R.; VAN VELUW, G. J.; WANG, F.; MULLER, W. H.; DIJKSTERHUIS, H. A. B.; WOSTEN, H. A. B. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 74, p. 1-29, 2013.

KULA, M. –R.; KRONER, K. H.; HUSTED, H.; SCHUTTE, H.; **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 369 -341, 1982.

KUNDU, A.K.; MANNA, S. & PAL, N. Purification and properties of a new extracellular collagenase from *Aspergillus sclerotiorum*, **Ind J Exp Biol**, 12: 441-443. 1974.

LABARTRE, J.; “Proteolytic activities during growth and aging in the fungus *Podospora anserina*: effect of specific mutations”, **Arch. Microbiol**, vol 24, pp 269-274, 1980.

LIMA, M. DOS S. et al. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, v. 188, n. 0, p. 384–392, 2015.

LIN, H.-Y.; THOMAS, J. L. Factors affecting responsivity of unilamellar liposomes to 20 kHz ultrasound. *Langmuir*, v. 20, n. 15, p. 6100–6106, 2004.

LYND, L. R. et al. *Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology*.

LI, C.-Y.; CHENG, C.-Y.; CHEN, T.-L. Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, 258–263, 2001.

LIM, D.V.; JACKSON, R.J. AND PULL-VONGRUENIGEN, C.M. Purification and assay of bacterial collagenases. **J. Microbiol. Methods**, 18: 241-253. 1993.

LUCAS, F.S.; BROENNIMANN, O.; FEBBRARO, I., HEEB, P.; High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. **Microb Ecol** 45:282–290, 2003.

LUO XIAOHU, BAI RENLIU, ZHEN DESHUAI, YANG ZAIBO, FU CHENG. Response surface optimization of the enzyme-based ultrasound-assisted extraction of acorn tannins and their corrosion inhibition properties. *Industrial Crops and Products*, 129, 405-413, 2019.

LUPAN, D.M. & NZIRAMASANGA, P. Collagenolytic activity of *Coccidioides immitis*, **Infect Immun**, 51: 360-361. 1986.

MACEDO, A. J.; DA SILVA, W.O.; GAVA, R.; DRIEMEIER, D.; HENRIQUES, J.A.; TERMIGNONI, C., “Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities”, **Appl. Environ. Microbiol.**, vol. 71, pp. 594-596, 2005.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K.B.; PUNTAMBEKAR, U.; KHIRE, J.M.; OKHALE, D.V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.39, 2031–2034, 2004.

MASON, T. J. et al. Application of ultrasound. Emerging technologies for food processing, v. 32, p. 3–351, 2005.

MASON, T. J. et al. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 18, n. 1, p. 226–230, 2011.

MASON, T. J.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J. P. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 3, n. 3, p. S253–S260, 1996.

MAWSON, R. et al. Ultrasound in enzyme activation and inactivation. In: *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. [s.l.] Springer, 2011. p. 369–404.

MEYER, A. S.; ARNOUS, A. Enzymatic modifications of grape skin phenolics. *Agro Food Industry Hi-Tech*, v. 21, n. 1, p. 26–29, 2010.

MARCONDES, N.R.; TAIRA, C.L.; VANDRESEN, D.C.; SVISZINSKI, T.I.E; KADOWAKI, M.K.; PERALTA, R.M. New feather- degrading filamentous fungi. **Microbial Ecology**, v.56, p.13-17, 2008.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A.L. and VELASCO-SANTOS, C.; Keratin Fibers from Chicken Feathers: Structure and Advance in Polymer Composites. Editors: Renke Dullaart et al.; pp. 149-211. 2012.

MATSUSHITA, O.; YOSHIHARA, K.; KATAYAMA, S.I.; MINAMI, J. AND Okabe, A. Purification and characterization of a *Clostridium perfringens* 120- Kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. **J. Bacteriol.**, 176: 149- 156. 1994.

MAZOTTO, A.M.; CEDROLA, S.M.; LINS, U.; ROSADO, A.S.; SILAVA, K.T.; CHAVES, J.Q.; RABINOVITCH, L.; ZINGALI, R.B.; VERMELHO, A.B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Lett Appl Microbiol**, 2010.

MAZOTTO, A.M.; MELO, A.C.N.; MACRAE, A.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R., CEDROLA, S.M.L.; COURI, S., ZINGALI, R.B.; VILLA, A.L.V.; RABINOVITCH, L.; CHAVES, J.Q.;

VERMELHO, A.B. Biodegradation of feather waste by extracellular keratinases and gelatinases from *Bacillus* spp. **World J Microbiol Biotechnol** 27(6):1355–1365, 2011.

MCKITTRICK, J.; CHEN, P.-Y.; BODDE, S. G.; YANG, W.; NOVITSKAYA, E. E.; MEYERS, M. A. The Structure, Functions, and Mechanical Properties of Keratin. **JOM**, Vol. 64, No. 4, 2012.

MERHEB-DINI C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M. *et al.* Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chem** 120:87-93. 2010.

MERTIN, D.; LIPPOLD, B. C.; In vitro permeability of the human nail plate and of a keratin membrane from bovine hooves: Influence of the partition coefficient octanol/water and the solubility of drugs on their permeability and maximum flux. **J. Pharm. Pharmacol.** v.49, 30–34. 1997.

MOHORCIC, M., TORKAR, A., FRIEDRICH, J.; KRISTL, J.; MURDAN, S.; An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. **Int J Pharm** 332: 196–201, 2007

MONOD, M.; CAPOCCIA, S.; LÉCHENNE, B.; ZAUGG, C.; HOLDOM, M.; JOUSSON, O. Secreted proteases from pathogenic fungi. **International Journal of Medical Microbiol**, v. 292, p. 405-419, 2001.

MOREIRA-GASPARIN, F. G.; SOUZA, C. G. M.; COSTA, A. M.; ALEXANDRINO, A. M.; BRACHT, C. K.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M.; Purification and characterization of an efficient poultry feather degrading-protease from *Myrothecium verrucaria*. **Biodegradation** 20:727–736, 2009.

MOOKHTIAR, K.; STEINBRINK, S.D AND VAN WART, H.E. Mode of hydrolysis of collagen-like peptidase by class I and class II *Clostridium histolyticum* collagenases: Evidence for both endopeptidase and tripeptidyl-carboxypeptidase activities. **Biochemistry**, 24: 6527-6533. 1985.

MULLER, W.E.G. The origin of metazoan complexity: Porifera as integrated animals. **Integ. Comput. Biol.**, 43: 3-10. 2003.

MYLLYHARJU, J. AND KIVIRIKKO, K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. **Trends Genet.**, 20: 33-43. 2004.

MYLLYHARJU, J. AND KIVIRIKKO, K.I. Collagens and collagen-related diseases. **Ann. Med.**, 33: 7-21. 2001.

NAM, G.W. ; LEE, D.W.; LEE, H. S. ; LEE, N. J.; KIM, B.C.; CHOE, E.A.; HWANG, J.K.; SUHARTNOTO, N.M.T.; PYUN, Y.R. Native degradation by *Fervidobacterium islandicum* AW-1, a new isolated Keratinase- produceing thermophilic anaerobic. *Aechives of Microbiology*, v. 178, n.6, p. 538-547, 2002.

NORONHA, E.F.; LIMA, B.D.; SÁ, C.M.; FELIX, C.R.; Heterologous production of *Aspergillus fumigatus* keratinase in *Pichia pastoris*. **World J Microbiol Biotechnol** 18:563–568, 2002

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N.A.; AL- MUSALLAM, A.A.; AL- ZARBAN, S. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and their keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v.66, p. 1-11, 1998.

OHYAMA, H. AND Hashimoto, K. Collagenase of human skin basal cell epithelioma. **Biochemistry**, 82: 175-183. 1977.

PANDEY, A.; Solid-state fermentation. *Biochem.Eng. J.* 13 (2–3), 81–84, 2003.

PARRY, D.A, D.; NORTH, A.C.T. Hard α -keratin intermediate filament chains: Substructure of the N-and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domain soft type I and type II chains. **Journal Structural Biology**, v.122, p. 67-75, 1998.

PAWAR SHWETA V., RATHODA VIRENDRA K.. Ultrasound assisted process intensification of uricase and alkaline protease enzyme co-production in *Bacillus licheniformis*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 173-179, 2018.

PERICIN, D. M; MADAREV-POPOVIC, S. V. RADULOVIC-POPOVIC, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology, **Biotechnology Letters**, v.31, p. 43–47, 2009.

PINHEIRO, T. L.F.; LIPKE, N. R.; KEMPKA, A. P.; MENONCIN, S.; OLIVEIRA, D. M.G. Response surface method to optimize the production and characterization of lipase from *Pennicillium verrucosum* in solid state fermentation. **Bioprocess and Byosystems Engeneering**, v.31, n. 2, p. 119-125, 2008.

PRÉVOT, V.; LOPEZ, M.; COPINET, E.; DUCHIRON, F.; Comparative performance of commercial and laboratory enzymatic complexes from submerged or solid-state fermentation in lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology** 129 690–693, 2013.

PROCKOP, D.J. AND KIVIRIKKO, K.I. Collagens: molecular biology, diseases and potentials for therapy. **Ann. Rev. Biochem.**, 64: 403-434. 1995.

RAJA, S.; MURTY, V. R.; THIVAHARAN, V.; RAJASEKAR V.; RAMESH V. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review **Science and Technology**, v.1, p. 7-16, 2011.

RAMNANI, P.; SINGH, R.; GUPTA, R.; “Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation”, **Canadian j. of microbiology**, 51, 191-196, 2005.

RAMUNDO J.; Gray, M. Enzymatic wound debridement. **J Wound Ostomy Cont** 35:273–80. 2008

RANALLI, G.; ALFANO, G.; BELLI, C.; et al. Biotechnology applied to cultural heritage: biorestitution of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. **J Appl Microbiol** 98:73–83. 2005

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, p 597-635, 1998.

RATANAPONGLEKA, K; Recovery of Biological Products in Aqueous Two Phase Systems; **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, Vol. 1, No. 2, August 2010.

RAY, A. Protease enzyme-potential industrial scope. **Int J Tech**; 2: 01-04. 2012.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. R.; FARINAS, C. S.; NETO, V. B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulasas por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 46, n. 8, p. 912-919, 2011.

ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R.; Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. **Journal of Chromatography A**, 1217, 2296–2305, 2010.

ROUSE, J. and DYKE, M.E.V. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical **Applications**. *Materials* 2010, 3, 999-1014;

SAKAI Y.; YAMATO, R.; ONUMA, M.; et al. Non-antigenic and low allergic gelatin produced by specific digestion with an enzyme-coupled matrix. **Biol Pharmacol Bull** 21:330–4. 1998.

SAKURAI, Y., INOUE, H.; NISHII, W.; TAKAHASHI, T. AND IINO, Y. *et al.* Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces parvulus*. **Bioscie. Biotechnol. Biochem.**, 73: 21-28. 2009.

SALES, M. R.; CAVALCANTI, M.T.H.; FILHO, J. L.L; MOTTA, C.M.S.; PORTO, A.L.F. Utilização de penas de galinha para produção de queratinase por *Aspergillus carbonarius*. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.43, p.285-288, 2008.

SANTOS, R. M. D. B.; FIRMINO, A. A. P.; SÁ, C. M.; FELIX, C. R.; Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Curr Microbiol** 33:364–370, 1996.

SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; MURUGESAN, T.; NAIR, B. U.; RA-MASAMI., T.; **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 81. 1814–1819, 2006.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHIA.; DIAS, R.; AZEVEDO, V.; Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **J Bioprocess Biotechniq** S4:002 doi:10.4172/2155-9821.S4-002, 2012

SCHOOYEN, P.M.M.; DIJKSTRA, P.J.; OBERTHUR, R.C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J.; Partially carboxymethylated feather keratins. Thermal and mechanical properties of films. **J Agric Food Chem** v.49, p.221–230, 2001.

SHANKAR, S.; RAO, M. AND LAXMAN, R.S..Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveriasp*. **Proc. Biochem.** 46: 579-585. 2011.

SCHENCK, S.; CHASE Jr, T.; ROSENZWEIG, W.D. & PRAMER, D. Collagenase production by nematode trapping fungi, **Appl Environ Microbiol**, 40: 567-570. 1980.

SHU, C-H.; XU, C-J.; LIN, G-C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochemistry*, p. 734–738, 2006.

SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PATEL, A. K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme Microb. Technol.** 46 (7), 541–549, 2010.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. *International Journal of Environmental Science and Engineering*, 1:1, 2009.

SSIVAKUMAR, P.; SAMPATH, P. AND CHANDRAKASAN, G. Collagenolytic metalloprotease (gelatinase) from the hepatopancreas of the marine crab, *Scylla serrata*. **Comparative Biochem. Physiol.**, 123: 273- 279. 1999.

STRAUSS, B.H.; GOLDMAN, L.; QIANG, B.; et al. Collagenase plaque digestion for facilitating guide wire crossing in chronic total occlusions. **Circulation** 108:1259–62. 2003.

SUKHOSYROVA, E.A.; NIKITINA, Z.K.; YAKOVLEVA, M.B.; VESHCHIKOVA, E.V. & BYKOV, V.A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*, **Bull Exper Biol Med**, 135: 447-451. 2003.

SUNTORN SUK, W.; TONGJUM, J.; ONNIM, P.; OYAMA, H.; RATANAKANOKCHAI, K.; KUSAMRAN, T.; ODA, K.; Purification and characterisation of keratinase from a thermotolerant feather-degrading bacterium. **World J Microbiol Biotechnol** 21:1111–1117, 2005.

SUPHATHARAPRATEEP, W.; CHEIRSILP, B.; JONGJAREONRAK, A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. **N Biotechnol** 28:649–55. 2011.

TAKAGI, M.; YOSHIOKA, H.; WAKITANI, S. A mass separation of chondrocytes from cartilage tissue utilizing an automatic crushing device. **J Biosci Bioeng** 109:73–4. 2010.

TAPIA, D.M. T.; SIMÕES, M. L. G. Production and partial characterization of keratinase produced by a microorganism isolated from poultry processing plant wastewater **African Journal of Biotechnology**, v. 7 , p. 296-300, 2008.

TERESA, K-K., JUSTYNA, B. Biodegradation of keratin waste: Theory and practical aspects. **Waste Manag** 31(8):1689–1701, 2011.

THOMAS, A.; BAYAT, A. The emerging role of *Clostridium histolyticum* collagenase in the treatment of Dupuytren disease. **Ther Clin Risk Manag** 6:557–72. 2010.

THYS, R. C. S.; LUCAS, F. S.; RIFFEL, A.; HEEB, P.; BRANDELLI, A.; Characterization of a protease of a feather-degrading *Microbacterium* species. **Lett Appl Microbiol** 39:181–186, 2004.

TOSI, S.; ANNOVAZZI, L.; TOSI, I.; IADAROLA, P. & CARETTA, G. Collagenase production in an Antarctic strain of *Arthrobotrys tortor* Jarowaja, **Mycopathol**,153: 157-162. 2001.

TUBIO, G.; PELLEGRINI, L.; NERLI, B. B.; PICO, G. A.; J.; Liquid–Liquid Equilibria of Aqueous Two-Phase Systems Containing Poly(ethylene glycols) of Different Molecular Weight and Sodium Citrate. **Chem. Eng.** 209-212, 2006.

VEIT, G.; KOBBE, B.; KEENE, D.R.; PAULSSON, M. AND KOCH, M. *et al.* Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. **J. Biol. Chem.**, 281: 3494-3504. 2006.

VERMELHO, A.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.; BRANDELI, A.; BON, E. Enzimas Queratinolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: BON, E. P.; FERRARA, M. A. e CORVO, M. L. (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, v.1, 2008. p.506

VIGNARDET, C., GUILLAUME, Y.C.; MICHEL, L.; FRIEDRICH, J.; MILLET, J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm** v.224, p.115–122 , 2001.

RASKOVIC BRANKICA, BOZOVIC OLGA, PRODANOVIC RADIVOJE, NIKETIC VESNA, POLOVIC NATALIJA. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine

protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118, 622-627, 2014.

WISEMAN, A. *Manual de Biotecnología de las Enzimas*. 2 edição, Editora Acribia. Zaragoza. 1991.

WILLIAMS, C. M.; LEE, C. G.; GARLICH, J. D.; SHIH, J. C. H.; Evaluation of a bacterial feather fermentation product, feather-lysate, as a feed protein. **Poult.Sci.** 70, 85–94, 1991.

WORTHINGTON, K.; WORTHINGTON, V.; *Worthington enzyme manual*. New Jersey: Worthington Biochemical Corporation. 2011.

WU, Z.; WEI, L.X.; LI, J.; et al. Percutaneous treatment of non-contained lumbar disc herniation by injection of oxygen-ozone combined with collagenase. *Eur J Radiol* 72:499–504. 2009.

YILMAZ ERKAN. Use of hydrolytic enzymes as green and effective extraction agents for ultrasound assisted-enzyme based hydrolytic water phase microextraction of arsenic in food samples. *Talanta*, 189, 302-307, 2018.

YOKOYAMA, K., WANG, L., MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Identification, classification and phylogeny of the *Aspergillus* section Nigri inferred from mitochondrial cytochrome b gene. **FEMS Microbiology Letters** v.200,: p. 241-246, 2001

ZHAO, G.Y.; ZHOU, M.Y.; ZHAO, H.L.; et al. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. **Food Chem** 134:1738–44. 2012.

CAPÍTULO I

Wiley
Online
Library



Edited By: Theodoros Samaras

Impact factor (2021): 1.848

Journal Citation Reports (Clarivate, 2022): 66/94 (Biology) 60/72 (Biophysics)

Online ISSN: 1521-186X

© The BioEM society

ARTIGO PUBLICADO

Ultrasound-Assisted Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Collagen to Produce Peptides

With Biomedical Potential: Collagenase From *Aspergillus terreus* UCP1276

Romualdo B. Costa-Junior, Romero M.P. Brandão-Costa, Wendell W. C. Albuquerque,

Juanize M. S. Batista, Raquel B. Pedrosa and Ana L. F. Porto

Ilmos. Membros da Banca,

Venho informar que adicionei todo o Artigo para fins de visualização. Porém, para a versão final e entregue na Biblioteca, apenas, a capa será publicada.

Ultrasound-Assisted Enzyme-Catalyzed Hydrolysis of Collagen to Produce Peptides With Biomedical Potential: Collagenase From *Aspergillus terreus* UCP1276

Romualdo B. Costa-Junior ^{1,2}, Romero M. P. Brandão-Costa,^{1*}
Wendell W. C. Albuquerque,³ Juanize M. S. Batista,¹
Raquel B. Pedrosa,¹ and Ana L. F. Porto^{1,2}

¹Department of Morphology and Animal Physiology, Laboratory of Bioactive Products, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Institute of Food Chemistry and Food Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

Ultrasound has been applied for varied purposes as it provides additional mechanical energy to a system, and is still profitable and straightforward, which are advantages for industrial applications. In this work, ultrasonic treatments were applied to purified collagenase fractions from a fermented extract by *Aspergillus terreus* UCP 1276 aiming to evaluate the potential effect on collagen hydrolysis. The physical agent was evaluated as an inductor of collagen degradation and consequently as a producer of peptides with anticoagulant activity. The sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis analyses were also carried out to compare the hydrolysis techniques. The ultrasound (40 kHz, 47.4 W/L) processing was conducted under the same conditions of pH and temperature at different times. The ultrasound-assisted reaction was accelerated in relation to conventional processing. Collagenolytic activity was enhanced and tested in the presence of phenylmethanesulfonyl fluoride inhibitor. Underexposure, the activity was enhanced, reaching more than 72.0% of improvement in relation to the non-exposed enzyme. A period of 30 min of incubation under ultrasound exposure was enough to efficiently produce peptides with biological activity, including anticoagulation and effect on prothrombin time at about 60%. The results indicate that low-frequency ultrasound is an enzymatic inducer with likely commercial applicability accelerating the enzymatic reaction. Bioelectromagnetics. © 2019 Bioelectromagnetics Society.

Keywords: collagenase; anticoagulant; proteases; ultrasound pretreatment; biocatalytic activity

INTRODUCTION

Proteases represent a relevant class of enzymes with applications in most varied fields [Madhan et al., 2007]. For catalyzing protein hydrolysis, they are used in different industrial sectors, such as detergent, food, pharmaceuticals, chemicals, leather, and silk, in addition to the treatment of waste [Pillai et al., 2011; Vijayaraghavan et al., 2014].

Collagenolytic proteases are proteases that degrade the collagen molecule and are involved in physiological processes such as fetal bone development, wound repair, and meat tenderization. They are classified based on their physiological functions into two types, namely, metallocollagenase and serine collagenase. These enzymes convert their substrates into small fragments, which can be easily removed

Grant sponsor: FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco); grant number: APQ. 1200-2.12/15; Grant sponsor: CNPq (National Council for Scientific and Technological Development), grant number: 402529/2012-0.

Conflict of interest: None.

*Correspondence to: Romero Brandão-Costa, Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brazil. E-mail: romero_brandao@outlook.pt

Received for review 29 August 2019; Accepted 3 December 2019

DOI:10.1002/bem.22239

Published online 00 Month 2019 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

from fabrics. All the proteolytic enzymes found in detergents are non-specific endo-proteases (e.g. subtilisin) with a preferred cleavage on the carboxyl side of hydrophobic amino acid residues, although they are able to hydrolyze most peptide links [Daboor, 2010].

The microbial sources are relevant for commercial purposes as proteases from plants and animals are insufficient to supply the increasing market demands. In general, microorganisms are an excellent source of enzymes due to their biochemical diversity and they can be easily genetically manipulated [Rao et al., 1998].

Aspergillus is in the order Eurotiales, which is known to have the potential for producing various metabolites such as antibiotics, organic acids, medicines, enzymes such as milk-clotting and extracellular proteases. Isolates of the so-called domesticated species such as *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, and *Aspergillus tamaris* are used in oriental food fermentation processes and as hosts for heterologous gene expression.

The ultrasound treatment has been applied in enzyme technology [Bashari et al., 2016]. In particular, low-frequency ultrasound has been reported for improving the biotechnological processes, mainly based on the effects of acoustic cavitation on enzyme structure and for enhancement of mass transfer due to local turbulence [Szabó and Csiszár, 2013]. The proteolytic enzymes such as pepsin have been discussed as activated or catalytically improved by ultrasound exposure promoted by conformational changes in folding, binding, and structure [Delgado-Povedano and Luque de Castro, 2015], more precisely in secondary and tertiary structures [Yu et al., 2014].

This present work aimed, based on simple methods, to evaluate the biotechnological potential of a protease with collagenolytic activity previously purified from *Aspergillus terreus* UCP 1276, and to characterize its activity under ultrasound exposure. Furthermore, the effects of ultrasonic exposure on enzyme activity were studied to produce peptides for potential applications as an anticoagulant in thrombolytic therapy.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and Fermentation Medium

The fungal species used in this study belonged to the genus *A. terreus* UCP 1276 and was obtained from the Catholic University of Pernambuco (RENNORFUN/SISBIOTA). The strain was isolated from Caatinga soil and kept in Czapek agar medium.

For all the experiments, fungal spore suspensions with a final concentration of 10^4 spores/ml were used. For production medium, microorganism was cultivated for 10 days at a temperature of 30 °C using a complex medium containing 0.025 (g/L) CaCl_2 , 0.005 (g/L) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 (g/L) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.05 (g/L) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ at pH of 7.8 in 500 ml Erlenmeyer flasks. The feather fragments (0.5%) were weighed and added separately to each flask [Anbu et al., 2007]. The flasks were then autoclaved for 15 min at a temperature of 121 °C, followed by inoculation with a fungal spore from the culture medium accompanied with shaking at 120 rpm at 30 °C for 10 days. For each day, aliquots of 10 ml were collected from the cultures and centrifuged at 10,000g, the temperature of 4 °C for 20 min to harvest the supernatant containing the protease. This supernatant was then used to determine the protein dosage and collagenolytic activity. As the target collagenase was an extracellular sample, the filtrate was analyzed to determine the final protein concentration and activity, and then used as an enzyme source (referred to as the crude extract).

Gel-Filtration Chromatography: Purification and Determination of Molecular Mass

The method used for enzyme extraction was previously described by Ferreira et al. [2017]. In brief, after using anionic chromatography on DEAE-sephadex, for the gel filtration method, an ÄKTA Avant purifier (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) was used to separate the protein fractions eluted by Tris-HCl buffer (pH 8) added by 0.15 M NaCl on a Superdex 75 (HR10/300GL) PC 3.2/30 column (GE Healthcare). The protein profile of separation was evaluated at 215 and 280 nm, respectively. The mass determination was achieved using Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Mass 6,500–66,000 Da purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Protease Activity

The protease activity was measured as described by Ginther [1979]. The assay mixtures of 1.0 ml containing 0.2 M Tris-HCl pH 7.2, 1.0 mM CaCl_2 , 1% Azocasein, and 150 μl of purified collagenase were incubated at 37 °C for 1 h. After stopping the reaction by adding 1.0 ml of 10% trichloroacetic acid, the samples were centrifuged at 8,000g for 15 min, and 0.8 ml of the supernatant was transferred into a second tube containing 0.2 ml of 1.8 M NaOH. Finally, the samples were blended in a vortex mixer (Vortex Basic K45–2820; Kasvi, São Paulo, Brazil), and the absorbances were measured at 420 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of

enzyme responsible for a 0.1 increase per hour in the absorbance.

Collagenase Activity

The collagenase activity was performed using the Azocoll method described by Chavira et al. [1984]. Azocoll was washed and suspended in a 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) containing 1.0 mM CaCl_2 up to a final concentration of 5 mg/ml. Thereafter, 50 μl of sample and 950 μl of buffer were mixed with 5 mg of Azocoll suspension in a 1.0 ml reaction tube and incubated at 37 °C in a water bath at 60 min. Following this procedure, the samples were chilled in ice for 5 min to stop the reaction and then centrifuged at 8,000g, and 4 °C for 20 min. The absorbance of the supernatant was measured at $\lambda 520$ nm using a UV-VIS spectrophotometer (Ultrospec 8000 Spectrophotometer; GE Healthcare). One unit of enzyme activity (*U*) was defined as the amount of enzyme per ml of crude extract that resulted, after 60 min of incubation, to an absorbance increase of 0.1 at $\lambda 520$ nm, because of the formation of azo dye-linked soluble peptides. The specific activity was calculated as the ratio of the enzymatic activity to the total protein content of the sample and expressed in U/mg.

Protein Determination

The protein content of the samples was determined by the methods of Smith et al. [1985], using bovine serum albumin as standard.

Ultrasound-Assisted Biocatalytic Activity

Ultrasound-assisted enzyme activity was carried out following the method proposed by Ovsianko [2005], with modifications. The independent variable was time (5–30 min). In brief, microtubes (1,000 μl) containing the purified collagenase (0.300 mg/ml) in 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.8) added by collagen (5.0 mg) were distributed in a plastic shelf and placed in the center of an ultrasonic water bath (Ultrasound bath, model USC 1850A; Unique, São Paulo, Brazil), with internal dimension of $30 \times 15 \times 10$ cm, with a volumetric capacity of 9.5 L, equipped with five transducers arranged below the vat, at a frequency of 40 kHz and nominal power of 450 W rms. The total volume of the reaction mixture was 1.0 ml. The exposure conditions were rigorously maintained across the multiple samples/assays. All tests were performed in the same environmental chamber. The starting temperature for all the ultrasonic experiments was 40 ± 2 °C and cooling was applied through the jacketed reactor (wall thickness 5 mm) by use of water pumped through a cryostatic bath (ISOTEMP Thermostatic;

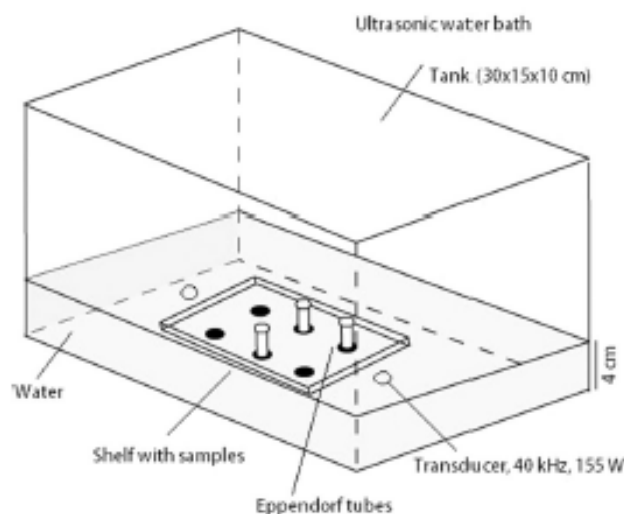


Fig. 1. Spatial distribution of samples in the ultrasonic water bath. The disposition of samples differed between tests. Eppendorf tubes (along z-axis) located at $z1/4$ 2 cm. Frontal view of support with measurements of spatial disposition of Eppendorf tubes on the shelf.

Fisher Scientific, Waltham, MA), to control the temperature of the samples, preventing overheating. Control samples were maintained in the same conditions (temperature, humidity, luminosity, and reaction time) as the treated group. The actual volumetric power delivered to the enzyme solution was 47.4 W/L (obtained by ratio between 450 W/9.5 L), which was measured following the calorimetric method described by Tiwari et al. [2008]. The samples were completely immersed in water (as shown in Fig. 1) and the exposure times corresponded to 5, 15, and 30 min. After time reaction, samples were centrifuged, and the supernatants were collected, concentrated, and lyophilized to evaluate the degradation and enzymatic analysis. The supernatants were stored at -20 °C until analyses. The experiments were conducted in triplicate and the results shown as standard deviation.

Collagen Hydrolysis by the Purified Collagenase and Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

To estimate its collagenolytic activity, the purified enzyme was incubated in the presence of type I collagen from bovine Achilles tendon (Sigma Chemical, St. Louis, MO). Type I collagen at 5.0 mg/ml was incubated with an appropriate amount of collagenase (45 mg) in Tris-HCl buffer at 37 °C for 5, 15, and 30 min, respectively, under ultrasound effect using the ultrasonic bath. Post-reaction, the samples were precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) to remove proteins, and the supernatants

4 Costa-Junior et al.

were neutralized with NaOH, lyophilized, and subjected to SDS-PAGE, followed by staining. The peptide patterns generated by collagen hydrolysis were determined by SDS-PAGE, by separation in 12.5% gel and stacking in a 4% gel, according to the method of Laemmli [1970]. The gel was stained and detained, as described earlier. The Molecular Mass Marker Kit, lyophilized powder, for molecular mass 14,000–69,000 was purchased from Sigma-Aldrich. The protein standards are as follows: bovine serum albumin (66.0 kDa), ovalbumin (45.0 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36.0 kDa), carbonic anhydrase (29.0 kDa), trypsinogen (24.0 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa), and lactalbumin (14.2 kDa).

Anticoagulant Activity in Human Platelet-Poor Plasma (PPP)

The method of blood suspensions obtained with sodium citrate anticoagulant centrifuged at 3,000g and at 25 °C were used to obtain PPP. A coagulometer BFT II (Dade Behring, Deerfield, IL) was used to evaluate the anticoagulant effect of the product peptides from the collagen degradation under ultrasound conditions, by analyzing the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), and thrombin time (TT). Different concentrations of the peptides (0, 30, 40, and 50 µg/ml) were used in the tests. The negative controls were prepared differently depending on the test: for PT and TT assays, 50 µl of PPP was added to 50 µl of 0.15 M NaCl (incubated at 37 °C for 1 min), followed by addition of 100 µl of Thromborel S and Thrombin (Dade Behring) reagents; for the APTT assay, 50 µl of PPP was added to 50 µl of 0.15 M NaCl and 50 µl of Dade actin-activated cephaloplastin reagent (Dade Behring; incubated at 37 °C for 2 min), followed by the addition of 50 µl of 0.025 M CaCl₂. The control times for APTT, PT, and TT were 33.7, 13.0, and 23.0 s, respectively. The coagulation inhibition (CI) index was calculated as follows:

$$CI = \frac{CT_t}{CT_c}$$

where CT_t is the coagulation time for tests and CT_c is the coagulation time for controls. The samples were used under ultrasound effect for 30 min.

Statistical Analysis

Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM) of three replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification Process to Obtain Collagenase From *Aspergillus* sp UCP1276

The protease with collagenolytic activity was purified from the metabolic extract by Superdex G-75 HR/10/300GL (GE Healthcare) column. The results of the purification procedure are summarized in Figure 2. The peak obtained in Figure 2 showed 26.3 U/mg of activity against the synthetic reagent Azocoll (Sigma Chemical) and was then chosen to be further used in other bioassays.

Ultrasound Effects on Protease Activity

For many years, ultrasound has been employed as a method of enzyme inactivation, whereas some works have stated that ultrasound did not inactivate all enzymes under mild conditions. Ultrasound has positive effects on enzyme activity and can be used to accelerate enzymatic reactions. The involvement of ultrasound in enzymatic reactions shows excellent potential for industrial applications. In this work, the ultrasonic treatment used throughout the whole process of enzymatic reactions is demonstrated.

The ultrasound irradiation on the purified enzyme was studied in different situations of reaction time and in the presence or absence of PMSF inhibitor to verify a possible mechanism of action of the ultrasound treatment on the enzyme catalysis. Under exposure, the activity was enhanced, reaching more than 72.0% of improvement in relation to the non-exposed enzyme (Fig. 3a), with the activity being stable during 30 min of exposure (Fig. 3b). In relation to the influence of the ultrasound exposure time on the enzyme activity, Szabó and Csiszár [2013] observed a reduction of the enzymatic activity of commercial cellulase after 65 min, while Zhou et al. [2013]

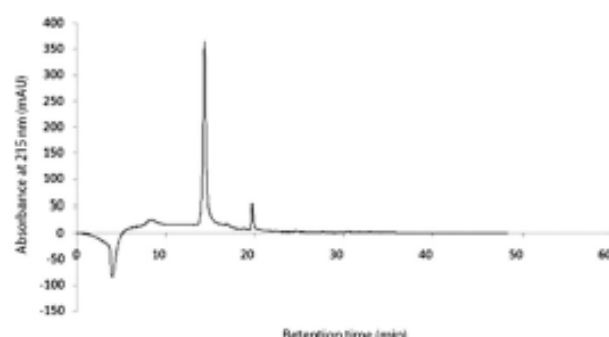


Fig. 2. Elution profile of collagenase from *Aspergillus* UCP 1276 through gel filtration chromatography on Superdex 75 column (AKTA avant).

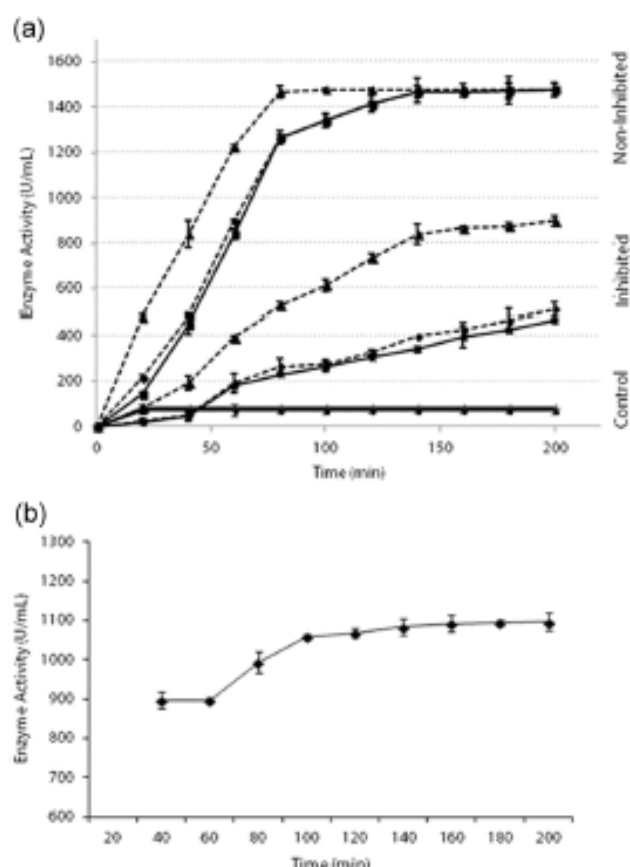


Fig. 3. (a) Effects of ultrasound exposure on the purified collagenase using Azocoll as substrate. The reaction time was evaluated until 200 min. The assays were divided by reactions partially inhibited and non-inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) inhibitor (10 mM) and by ultrasound treatment (dashed line) or absence (continuous line). They are also classified by the moment of ultrasound exposure: Before protease reaction ($\circ$), during protease reaction ($\bullet$), native enzyme ($\circ$), control ($\circ$), and negative control ($+$). (b) Collagenase previously purified without ultrasound conditions. Native collagenase obtained from gel filtration.

observed catalytical improvements after 20 min of enzyme reaction under ultrasound irradiation, with subsequent loss of activity.

The test in the presence of inhibitor showed that under ultrasound exposure, the inhibitor effects were relatively diminished when compared with the enzyme activity in the presence of inhibitor but non-exposed. At the same time, the inhibition by PMSF with posterior ultrasound exposure did not alter collagenolytic activity, when compared with the non-exposed samples. The loss of the PMSF inhibition due to ultrasound treatment could probably be directly related to vibrational forces that would hinder the linkage inhibitor-enzyme or even indirectly by thermodynamic implications, which would affect the probability of

interaction between the inhibitor and enzyme by energetic reasons (caused by changes in the liquid pressure and temperature due to acoustic cavitation).

The significant increase in the use of enzymes in commercial and industrial applications has highlighted the need for their functionality and stability. Ultrasound, as a physical modification method, provides mechanical forces that are able to modify enzyme conformation and affect its catalytical potential by improving the enzyme-substrate interaction. The absorption of an ultrasound wave in water is primarily due to viscosity (described by Stokes' Law), and results in an attenuation coefficient proportional to the square of the frequency, relating δ to the total attenuation α .

Many mechanisms on how ultrasound irradiation affects the enzyme activity have been extensively discussed in the literature. The most likely mechanism reported is the acoustic cavitation [Islam et al., 2014], which results when ultrasound waves promote implosion and fragmentation of gas bubbles in a liquid medium. Gębicka and Gębicki [1997] have discussed that the collapsing bubbles cause physical alterations in the medium leading to an increase in the temperature and pressure and consequently could influence the enzyme activity profile, although a limited number of studies have reported enhanced in vitro enzyme activity [Barton et al., 1996]. Islam et al. [2014] have commented that the combination of heat, pressure, and pressure plus heat induced by ultrasound could be significantly effective on enzyme activities. The authors cited enzymes such as peroxidase, lipase, amylase, and also proteases (trypsin) as being inactivated by ultrasound, following a protein denaturation promoted by mechanical forces from the cavitating bubbles or by the action of free radicals formed by sonolysis of water.

On the contrary, other studies have proposed alternative theories to elucidate the sonic effect on enzymes. Schmidt et al. [1987] have discussed that increased diffusion and substrate concentration alterations could result in improved enzyme activity stimulated by ultrasonic fields. Barton et al. [1996] have cited localized increases in temperature and enhanced mixing of substrate, enzyme, and products to promote enzyme activation. Johns [2002] has proposed a mechanical mechanism called frequency resonance hypothesis, which suggests that ultrasound irradiation provides enough energy to induce transient conformational shifts in enzymes (turning conformational shapes on and off), altering their activity performance.

The effect on proteases by ultrasound irradiation is controversially reported. Studies have shown that the different possibilities to influence enzymatic activity by ultrasound treatment, including the effects on both

6 Costa-Junior et al.

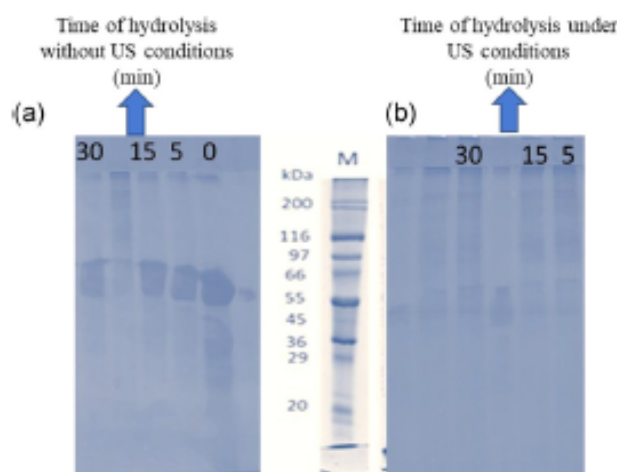


Fig. 4. Hydrolysis of collagen by collagenase protease over time. (a) Hydrolysis of collagen type I without ultrasound conditions at different times (0, 5, 15, and 30 min). (b) Ultrasound exposure time 5, 15, and 30 min. During these time intervals, the samples were analyzed by 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). M, markers.

enzyme and substrates, could determine whether the activity is increased or inhibited. Abadía-García et al. [2016] discussed how high ultrasound densities would cause direct rearrangements in the protein structure as well as protein aggregate formation, resulting in alterations in the protein hydrolyze level. This would justify why enzyme inactivation by ultrasound irradiation is often reported.

Figure 4 presents the ability of collagenase from *Aspergillus* to hydrolyze the collagen after ultrasound exposure. There were no observed differences in visual degradation through the SDS-PAGE technique. Perhaps by using two-dimensional (2D)-electrophoresis, the results may be visualized with more efficiency. Besides, still in Figure 4, the collagen control was not submitted to SDS-PAGE for its insolubility.

Vercet et al. [2001] have observed inactivation of trypsin and α -chymotrypsin due to their susceptible structure, which does not allow them to resist the disruptive forces that are generated under sonic irradiation. Ovsianko [2005] studied the effects of ultrasound exposure on proteolytic activity and activation of chymotrypsinogen and trypsinogen, and observed a significant decrease (at a potency of 26.4 W/cm^2) in the activity of trypsin and chymotrypsin and inhibition of the protein's activation.

At the same time, Kim and Zayas [1991] observed that higher-energy ultrasound exposure inhibits the proteolytic activity of chymosin. Following the authors, the prolonged exposure to high ultrasound intensities could directly inactivate enzyme-active sites.

Bioelectromagnetics

In contrast, lower ultrasound intensities could enhance enzyme activity, based on the mechanisms of substrate diffusion and mechanical forces (considering treatment of both enzyme or substrate), particularly for enzymes in general [Schmidt et al., 1987] and also particularly for proteases [Jyothi and Suneetha, 2010; Cherniavsky et al., 2011; Abadía-García et al., 2016], which correspond with the results in the present study.

Wang et al. [2017] reported that ultrasound treatment improved the reduction capacity and iron-chelating potential of hydrolysates of soybean protein fractions [7S (b-conglycinin) and 11S (glycinin)]. The authors justified ultrasound effects by an enhancement in the contact of the protein fractions with enzymes and by activation of soybean antioxidant peptides. At the same time, Ajmal et al. [2016] found that the low-frequency ultrasound was able to improve the activity of the free enzyme by 22 times when compared with non-exposed reactions, and additionally, no molecular damages were caused by the treatment. Similar results were found by Uluko et al. [2013] and George et al. [2014].

Collagen-Degrading Peptides for Anticoagulant Activity

Our results demonstrate the high efficiency of collagenase to hydrolyze collagen at different times. Marchetti et al. [2018] have shown that CALB, a lipo enzyme, is a useful catalyst for esterification reactions. However, the time required for achieving the reaction equilibrium was around 72 h. It will be of great benefit if this equilibrium time is reduced as this will have a positive impact on the production rate of industrial processes.

Figure 5 presents the results of the action of peptides from the collagen hydrolysis on the APTT.

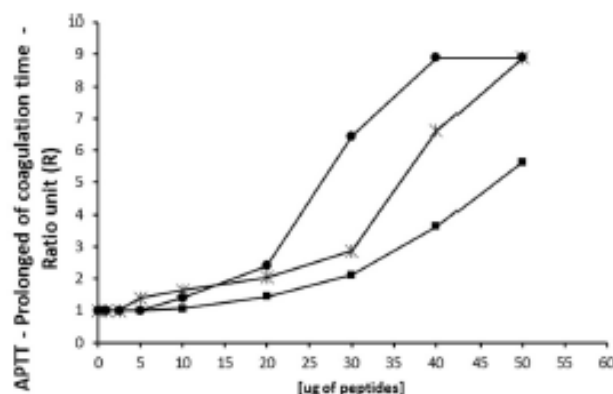


Fig. 5. The effect of peptides produced by collagen hydrolysis on anticoagulant activity was assayed. Time of ultrasound exposure was determined and assayed according to: (●) 30 min; (*) 15 min; (■) 5 min of exposure.

There was an observed increase in an anticoagulant activity together with an increase in the concentration of peptides, which is associated with the time of ultrasound exposure. By comparing the reaction times needed, it is evident that more prolonged ultrasound exposure improves production formation.

CONCLUSION

Ultrasound is an acoustic wave with a frequency of N20 kHz that needs a medium to propagate. Accompanied by the spread of an ultrasonic wave, a series of alternating cycles of compression and rarefaction emerge in the liquid medium. The application of ultrasonic waves to hydrolysate collagen and to produce peptides with biological applications has been proposed. This research was the first to evaluate the effect of ultrasound in the collagenase reaction, as well as pretreatment in the substrate and enzyme. We demonstrated how the ultrasound favors collagen hydrolysis and collagenase activity using an enzyme obtained from *A. terreus*. We can thus affirm that the positive effects of ultrasound are related to turbulence and mass transfer during the reaction. The increments on the collagenolytic effects under the influence of ultrasound indicate that the purified protease, as well as the method of ultrasound exposure, would have great potential in the pharmaceutical and medical industries, by producing collagen peptides with biological activity.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was financially supported by the Foundation for the Support of Science and Technology of Pernambuco State (FACEPE). The authors also express their gratitude to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support.

REFERENCES

Abadía-García L, Castaño-Tostado E, Ozimek L, Romero-Gómez S, Ozuna C, Amaya-Llano SL. 2016. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innov Food Sci Emerg Technol* 37:84–90.

Ajmal M, Fieg G, Keil F. 2016. Analysis of process intensification in enzyme catalyzed reactions using ultrasound. *Chem Eng Process* 110:106–113.

Anbu P, Gopinath SCB, Hilda A, Lakshmi Priya T, Annadurai G. 2007. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. *Bioresource Technol* 98:1298–1303.

Barton S, Bullock C, Weir D. 1996. The effects of ultrasound on the activities of some glycosidase enzymes of industrial importance. *Enzyme Microb Technol* 18:190–194.

Bashari M, Jin Z, Wang J, Zhan X. 2016. A novel technique to improve the biodegradation efficiency of dextranase enzyme using the synergistic effects of ultrasound combined with microwave shock. *Innov Food Sci Emerg Technol* 35:125–132.

Chavira R, Burnett TJ, Hageman JH. 1984. Assaying proteinases with azocoll. *Anal Biochem* 136:446–450.

Chemtsovskiy EA, Strakha IS, Adzerikho IE, Shkumatov VM. 2011. Effects of low frequency ultrasound on some properties of fibrinogen and its plasminolysis. *BMC Biochem* 12:60.

Daboor SM, Budge SM, Ghaly AE, Brooks SL, Dave D. 2010. Extraction and purification of collagenase enzyme: A critical review. *Am J Biochem Biotechnol* 6:239–263.

Delgado-Povedano MM, Luque, de Castro MD. 2015. A review on enzyme and ultrasound: A controversial but fruitful relationship. *Anal Chim Acta* 889:1–21.

Ferreira CM, Correia PC, Brandão-Costa RM, Albuquerque WW, Lin Liu TP, Campos-Takaki GM, Porto AL. 2017. Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. *Biomed Chromatogr* 31:1–10.

Gębicka L, Gębicki JL. 1997. The effect of ultrasound on heme enzymes in aqueous solution. *J Enzyme Inhib* 12: 133–141.

George N, Chauhan PS, Kumar V, Puri N, Gupta N. 2014. Approach to ecofriendly leather: Characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale. *J Clean Prod* 79:249–257.

Ginther CL. 1979. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob Agents Chemother* 15:522–526.

Islam MN, Zhang M, Adhikari B. 2014. The inactivation of enzymes by ultrasound—A review of potential mechanisms. *Food Rev Int* 30:1–21.

Johns LD. 2002. Nonthermal effects of therapeutic ultrasound: The frequency resonance hypothesis. *J Athl Train* 37: 293–299.

Jyothi PN, Suneetha Y. 2010. Ultrasound induced enhancement of protein metabolism and enzyme activities in the silk gland of fifth instar silkworm, *Bombyx mori* L. *Glob J Biotechnol Biochem* 5:50–54.

Kim SM, Zayas JF. 1991. Influence of ultrasound on the properties of chymosin and the ultrastructure of abomasum during chymosin extraction. *J Food Process Preserv* 15:89–100.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Madhan B, Krishnamoorthy G, Rao JR, Nair BU. 2007. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *Int J Biol Macromol* 41:16–22.

Marchetti M, Ronda L, Faggiano S, Liuzzi A, Bettafi S. 2018. Fluorescence quantification of allantoin in biological samples by cap-immobilized allantoinase/resorcinol assay. *Sens Actuators B* 255:2820–2828.

Ovsianko S. 2005. Effect of ultrasound on activation of serine proteases precursors. *Ultrason Sonochem* 12:219–223.

Pillai P, Mandge S, Archana G. 2011. Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13. *Process Biochem* 46: 1110–1117.

- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:597–635.
- Schmidt P, Rosenfeld E, Millner R, Czerner R, Schellenberger A. 1987. Theoretical and experimental studies on the influence of ultrasound on immobilized enzymes. *Biotechnol Bioeng* 30:928–935.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk D. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid.pdf. *Anal Chem* 150:76–85.
- Szabó OE, Csiszár E. 2013. The effect of low-frequency ultrasound on the activity and efficiency of a commercial cellulase enzyme. *Carbohydr Polym* 98:1483–1489.
- Tiwari BK, Muthukumarappan K, O'Donnell CP, Cullen PJ. 2008. Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *J Agric Food Chem* 56:2423–2428.
- Uluko H, Zhang S, Liu L, Chen J, Sun Y, Su Y, Li H, Cui W, Lv J. 2013. Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. *Int J Food Sci Technol* 48:2250–2257.
- Vercet A, Burgos J, Crelier S, Lopez-Buesa P. 2001. Inactivation of proteases and lipases by ultrasound. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2:139–150.
- Vijayaraghavan P, Lazarus S, Vincent SGP. 2014. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. *Saudi J Biol Sci* 21: 27–34.
- Wang Y, Wang Z, Handa CL, Xu J. 2017. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chem* 218:165–172.
- Yu ZL, Zeng WC, Zhang WH, Liao XP, Shi B. 2014. Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. *Ultrason Sonochem* 21: 930–936.
- Zhou C, Ma H, Ding Q, Lin L, Yu X. 2013. Ultrasonic pretreatment of corn gluten meal proteins and neutrase: Effect on protein conformation and preparation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides. *Food Bioprod Process* 1:665–671.

CAPÍTULO II

Submissão de Patente ao INSTITUTO IPÊ NIT-UFRPE

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

Número do Processo:

Dados do Depositante (71)

Depositante: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N, Cidade: Recife, Estado: PE, CEP: 52171-900, País: Brasil, Telefone: (81) 332 06104, Fax: (81) 332 06001

Email: inovacao@ufrpe.br;luis.bezerrasilva@ufrpe.br

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOFILME CICATRIZANTE
FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À
NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO**

Resumo: Os filmes ou membranas para revestimentos são definidos como matrizes preparadas a partir de biomateriais e amplamente utilizadas desde a área farmacêutica até a alimentícia. Quitosanas e galactomanana apresentam propriedades físicas particulares para diferentes formulações filmogênicas, sugerindo sua promissora utilização como curativo tópico de feridas, por exemplo.. O presente produto descrito é um biofilme formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), atóxico, hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de acesso fácil, associado às nanopartículas de prata, com características antibacterianas, oriundas de bioativos de origem microbiana, os quais podem potencializar o efeito cicatrizante de feridas. Os bioativos presentes no filme são obtidos a partir de um processo de degradação enzimática contendo enzima collagenase e colágeno bovino Tipo IV em reação térmica (30°C), sob agitação magnética por 1h. Após o procedimento de hidrólise, à essa solução contendo enzima e peptídeos de colágeno foi adicionada solução de nitrato de prata para síntese verde de nanopartículas. Ao final, foi preparada uma mistura homogênea de quitosana, galactomanana (obtida de *Cassia grandis*) e bioativos de nanopartículas de prata para a formação do produto. O biofilme, rico em bioativos, por apresentar moléculas naturais, apresentam ação hipoalergênica, e são capazes de acelerar o processo cicatricial. Assim, as características do biofilme o tornam mais do que viável a sua utilização como suporte para imobilização de sistemas de liberação de drogas.

Ao

Núcleo de Inovação Tecnológica - NIT

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos – CEP: 52171-900

Recife/PE

Prezado Senhor:

Eu, Ana Lúcia Figueiredo Porto, matrícula nº 0384972, lotado e com exercício no Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - DMFA encaminho a este Escritório os documentos abaixo relacionados, a fim de dar início a avaliação de pertinência do pedido de depósito da Patente de invenção denominada **“BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO”**

Relação de documentos anexos:

	Material	Nº de páginas
(X)	Relatório de Invenção	
()	Desenhos, se necessário	
()	Publicações relacionadas ao presente invento	
()	Cópia de material de divulgação e/ou atestados de participação em eventos e/ou cópia de anais, onde o invento tenha sido divulgado/apresentado.	
()	Cópia do contrato de Direitos de Propriedade Industrial firmado entre a UFRPE e Empresa(s) participante(s), quando for o caso.	
()	Outros documentos julgados pertinentes:	

Recife, 26 de junho de 2023.

Atenciosamente, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

DADOS DO(S) TITULAR(ES)

(Preencha somente se a patente for em co-titularidade com Empresas, órgãos públicos ou pessoas físicas sem vínculo com a UFRPE)

Nome da Instituição	CNPJ ou CPF
Universidade Federal Rural de Pernambuco	24.416.174/0001-06
Universidade Federal de Pernambuco	24.134.488/0001-08
Universidade de Pernambuco	11.022.597/0001-91

DADOS DA(S) INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA ENVOLVIDAS

Nome completo: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CNPJ: 24.134.488/0001-08

CONTATO:

Fone: (81) 2126-8000

Fax:

E-mail:

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901.

Nome completo: UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

CNPJ: 11.022.597/0001-91

CONTATO:

Fone: (81) 31841248

Fax:

E-mail:

Endereço: Rua Arnóbio Marques Santo Amaro 50100130 - Recife, PE - Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE A INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA(S)

- 1.** OCORREU DESENVOLVIMENTO DE ALGUMA DAS ETAPAS DA INVENÇÃO NESTA INSTITUIÇÃO? EM QUE MOMENTO?

NÃO.

- 2.** EXISTIU AJUDA FINANCEIRA POR PARTE DESTA INSTITUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA INVENÇÃO?

NÃO.

3. QUAL O VÍNCULO DO INVENTOR EXTERNO (SE HOUVER) COM ESTA INSTITUIÇÃO? DESDE QUE DATA EXISTE ESTE VÍNCULO?
4. EM ALGUM MOMENTO ESTE INVENTOR EXTERNO ESTEVE VINCULADO A UFRPE? QUAL FOI O VÍNCULO?

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 1)

- **TÍTULO DO INVENTO** (Utilize termos técnicos)

BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO

- **PALAVRAS-CHAVE RELACIONADAS AO PRESENTE INVENTO:**

1.	Biofilme	5.	Peptídeos
2.	Biotecnologia	6.	Fungos filamentosos
3.	Cicatrização	7.	Colagenase
4.	<i>Cassia grandis</i>	8.	Blend polissacarídico

- **DESCREVA OBJETIVAMENTE O CAMPO DE INVENÇÃO**

(Exemplo: novo uso do equipamento, processo para tratamento de efluentes, equipamento para ..., etc.)

A presente patente de invenção propõe através de um processo biológico, verde, atóxico e biodegradável, a formulação de um produto a base de polissacarídeos sustentável, economicamente viável e composto por material natural e biodegradável, utilizando como suporte o biofilme composto de quitosana de camarão e galactomanana de *Cassia grandis*, planta do gênero *Cassia sp.*, eficaz na produção de filmes polissacarídicos. Ainda, para acelerar o processo cicatricial, foram adicionados adjuvantes ao processo de produção do filme, tais como: enzima colagenolítica, peptídeos e

nanopartículas de prata. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia e visa acelerar o tempo de reparo tecidual causadas por ferimentos, queimaduras superficiais e reduzir as co-infecções, dessa forma reduzindo o custo da produção industrial para sua aplicação no setor hospitalar. O processo proposto utiliza a formação de uma solução de compostos por meio de agitação orbital e secagem em estufa à 37°C.

- **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

(Apresente seu invento com suficiência descritiva e indique, quando for o caso, a melhor forma de execução. Dependendo da área de invenção, descreva composição, processo de preparação, posologia, forma de administração, efeitos adversos, direção do fluxo, descrição detalhada das peças, passo-a-passo do processo, etc.) (Se necessário anexe descrição adicional)

A presente invenção detalha a formulação de um biofilme gerado a partir da fusão de um gel contendo uma mistura de galactomanana extraído das sementes de *Cassia grandis* e quitosana obtida da casca de camarão *Litopennaeus vannamei*, adicionado a uma mistura de nanopartículas de prata formada a partir de peptídeos e enzima obtidos através da degradação do colágeno tipo IV por colegendases microbianas. O produto proposto, em si, passa por três etapas distintas para sua obtenção:

ETAPA I. Formação de blend por meio da associação da galactomanana com a quitosana. Para obter a galactomanana, o extrato vegetal é obtido por meio de agitação de solução composta por solução salina NaCl a 0,15 mol/L e da farinha de sementes de *Cassia grandis*. A agitação é realizada por meio de agitador magnético no período de 4h, em temperatura de 4°C. Após o período de agitação, o extrato foi centrifugado a 11.180xg para remoção de impurezas com densidade mais elevada. O extrato límpido é submetido à precipitação com etanol 40% para obtenção da galactomanana. **ETAPA II.** Obtenção das nanopartículas de prata pela união de Ag⁺ com os peptídeos resultantes da degradação do colágeno tipo IV e da collagenase, enzima utilizada para degradar colágeno. Após o processo de degradação do Colágeno tipo IV (5mg/mL) utilizando enzima collagenase (1mg/mL), por 1h a 37°C, uma solução de nitrato de prata (10mm) é adicionada, por 4h a 10°C, para síntese das nanopartículas de prata. **ETAPA III.** Fusão das etapas anteriores para a formação do biofilme. A formação do

biofilme se dá pela homogeneização das etapas I e II em Erlenmeyer sob agitação orbital por 30 min em temperatura ambiente. Após, o líquido (10mL) é transferido para placas de petri (150mmx15mm) para secagem em estufa a 37°C por 24h. Os diferentes tamanhos e formatos do biofilme podem ser obtidos variando os objetos, sendo assim capaz de forma biofilmes retangulares, circulares etc. A forma desejada pode ser formulada de acordo com a especificação da área a ser tratada.

- **DIÁRIO DE LABORATÓRIO**

Importante apresentar a descrição do invento. Informe alguns exemplos de ensaios realizados até chegar às faixas ideais, inclusive informando os valores trabalhados e identificando a faixa preferencial ou ideal.

A presente patente propõe a apresentação de um processo e obtenção de um produto através da formulação de um biofilme gerado a partir da fusão de um gel contendo uma mistura de galactomanana extraído das sementes de *Cassia grandis* e quitosana, com uma mistura de nanopartículas de prata com peptídeos obtidos através da degradação do colágeno tipo IV por collagenases.

A potencialidade da presente inovação é ampliar as possibilidades do uso na rede pública brasileira, onde o tratamento local de queimaduras é feito com a pomada sulfadiazina de prata, na grande maioria dos serviços de queimados. Na Europa, nos EUA e alguns países da América do Sul este mesmo tratamento é realizado com pele humana (homóloga) ou animal (heteróloga). O Brasil jamais teve um biofilme registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e disponibilizada pelo Sistema Unico de Saúde (SUS), para uso nos pacientes queimados, por exemplo.

A metodologia proposta para a formação do Biofilme é o processo de formação do biofilme envolvendo a combinação sinérgica de componentes bioativos. A associação da galactomanana com a quitosana forma um gel que proporciona uma matriz polimérica tridimensional estável, essencial para o suporte estrutural e adesão celular, importantes na engenharia de tecidos e regeneração de tecidos danificados. As nanopartículas de prata, carregando o peptídeo do colágeno tipo IV obtido

pela degradação com collagenase industrial, conferem ao biofilme atividade antibacteriana e propriedades bioativas, inibindo o crescimento de microrganismos indesejados e interagindo com células e tecidos para uma resposta biológica adequada. Essa fusão de componentes resulta em um biofilme com características distintas, como estabilidade, atividade antimicrobiana, biocompatibilidade e potencial regenerativo.

Para a formação do biofilme foram utilizadas concentrações de quitosana (0,5, 1,0 e 1,5%), concentrações de galactomanana de *Cassia grandis* (1,0, 1,5 e 2,0%) e nanopartículas de prata formuladas à base de collagenase e peptídeos nas concentrações de 1,0, 2,0 e 3,0mg/mL. O experimento foi realizado, então, sob um planejamento fatorial 2^3 , variando concentração de quitosana, galactomanana e nanopartículas. Todo o processo de homogeneização ocorreu por 30min em temperatura ambiente sob agitação orbital utilizando mesa agitadora tipo shaker em frascos erlenmeyers de 125mL de capacidade. Para a formatação do filme, foram utilizadas placas de petri de 60x15mm, 90x15mm e 150x15mm, dependendo do tamanho filme desejado. Em todos os ensaios, houve sucesso na confecção dos filmes.

INFORMAÇÕES SOBRE O INVENTO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 2)

● DETALHE A INOVAÇÃO DO PRESENTE INVENTO

A patente propõe a confecção de um novo produto a ser utilizado na área de Saúde Pública a partir de um blend polissacarídico ativo com ação antibacteriana e cicatrizante. Esta invenção visa a sustentabilidade no tratamento de feridas aliada a biotecnologia sendo um processo que proporciona rendimento na produção de biofilmes de interesse médico-hospitalares. Além da sua utilização para o tratamento de queimaduras e feridas, várias especialidades como urologia, endoscopia, otorrinolaringologia, odontologia, e ginecologia podem ser atendidas.

● PROBLEMAS QUE O INVENTO RESOLVE OU VANTAGENS QUE APRESENTA

(Exemplo: Eficiência, Produtividade, Custo, Qualidade do produto, Redução de resíduos, etc)

Na rede pública brasileira, o tratamento local de queimaduras é feito com a pomada sulfadiazina de prata, na grande maioria dos serviços de queimados. Na Europa, nos EUA e alguns países da América do Sul este mesmo tratamento é realizado com pele humana (homóloga) ou animal (heteróloga). O Brasil jamais teve um biofilme registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e disponibilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para uso nos pacientes queimados. O Ministério da Saúde preconiza que o Brasil deveria ter 13 bancos de pele, entretanto, existem três em funcionamento, em São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, que não suprem 1% da necessidade de pele do país. Dessa forma, a utilização do biofilme seria imprescindível para suprimento imediato.

- **COMPARE O PRESENTE INVENTO COM A TECNOLOGIA ATUALMENTE UTILIZADA** (Há produtos similares no mercado? Em caso positivo, quais as vantagens desta nova tecnologia?)

Na rede pública brasileira, o tratamento local de queimaduras é feito com a pomada sulfadiazina de prata, na grande maioria dos serviços de queimados. Na Europa, nos EUA e alguns países da América do Sul este mesmo tratamento é realizado com pele humana (homóloga) ou animal (heteróloga). Os curativos atuais são extremamente caros, inviabilizando o seu uso rotineiro. A utilização de pele humana tem um limite muito extenso, justamente devido a quantidade de tecido viável para uso. Assim, utilizar o biofilme produzido através de um blend polissacarídico com ação antibacteriana e cicatrizante é super valorizado e indicado e resolveria todos os outros pontos abordados anteriormente.

- **DESVANTAGENS E/OU LIMITAÇÕES DO INVENTO**

O uso de nanopartículas dependerá do rendimento da produção, isolamento e purificação da colagenase para, então, degradar o colágeno e produzir peptídeos. Como o Biofilme precisa desses bioativos, um aumento na escala de produção e purificação será necessário.

- **USO PRESENTE E FUTURO DO INVENTO**

Uso presente:

Quitosana apresenta atividade antibacteriana

Quitosana é utilizada como suporte para purificação de bioativos

Galactomanana de *Cassia grandis* é utilizada como suporte para lectinas

Galactomanana apresenta características reológicas importantes para imobilização de ativos.

Uso futuro:

O Biofilme poderá ser utilizado:

- Modular a fase inflamatória e proliferativa da cicatrização de queimaduras superficiais;
- Como curativo oclusivo em queimaduras superficiais.
- Curativo para feridas.
- Obtenção de compostos bioativos de forma sustentável na forma de agente imobilizante.
- **NA SUA OPINIÃO, QUAL O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DE SEU INVENTO**

COM RELAÇÃO A COMERCIALIZAÇÃO?

- () Teórico
- () Pesquisa preliminar
- () Estágio avançado da pesquisa
- ☒ Finalizada completa em laboratório
- () Protótipo de trabalho

- **TIPO DA INVENÇÃO**

- (X) Processo
- (X) Produto
- () Método
- () Outro

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 3)

- **COMO A PRESENTE INVENÇÃO DIFERE DO ATUALMENTE CONHECIDO NO ESTADO DA TÉCNICA?** (Faça um comparativo com o presente pedido de patente de invenção)

Essa invenção pertence ao setor técnico de biotecnologia e cuidados com a saúde. Descreve um produto inovador à base de quitosana e nanopartículas de prata associadas a hidrolisado de colágeno, com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e pró-cicatrizantes, para o tratamento de lesões

cutâneas em humanos e animais. Esse produto, obtido por um processo específico, apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas. Além disso, destaca-se o baixo custo relativo da quitosana e o alto teor de substâncias benéficas do hidrolisado de colágeno. A aplicação desse produto e processo pode beneficiar indústrias médicas, veterinárias, cosméticas, de curativos e farmacêuticas, ampliando as opções terapêuticas e promovendo avanços no cuidado da pele e cicatrização de feridas. Essa inovação representa uma contribuição significativa para a área, oferecendo um produto eficaz e versátil para o tratamento de ferimentos em diversas aplicações e setores industriais. Além disso, o uso desses biofilmes pode ser explorado em outras indústrias relacionadas à saúde, como a cosmética e a fabricação de curativos.

- **FOI FEITA ALGUMA BUSCA DE PATENTES? EM CASO POSITIVO, INFORME AS PATENTES E O DIFERENCIAL EM RELAÇÃO À NOVA TECNOLOGIA ORA PROPOSTA.** (O NIT - UFRPE realiza busca nos bancos de patente nacional e internacionais, e encaminha aos inventores para análise.)
- A patente BG66767B1 refere-se a uma composição biologicamente ativa para tratamento de feridas crônicas contendo protease, glicerina, hidrolisado de colágeno, íons de magnésio e zinco, vitaminas e anti-sépticos. Sendo previsto para uso de tratamento de defeitos da pele, como picadas, inflamação em queimaduras ou insetos, atingindo hematoma de ferimento, para líquen ou sarna de psoríase e afins. A presente patente apresenta vantagens distintas em relação à patente BG66767B1, destacando-se pela presença de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas aprimoradas e liberação controlada da substância ativa. Além disso o biofilme é relativamente mais barato uma vez que é composto por quitosana e galactomanana e pode ser obtido de fontes diversas, facilitando sua extração. Além disso, a protease com atividade colagenolítica e os peptídeos de colágeno aceleram o processo de cicatrização proporcionando uma abordagem eficaz e versátil para o tratamento de diversos tipos de feridas, incluindo picadas, inflamações, queimaduras, lesões cutâneas e afins.

- A patente US4060081A descreve uma pele sintética composta por membrana de múltiplas camadas, cuja primeira camada é formada por hidrolisado de colágeno e polissacarídeo e a segunda camada composta por uma membrana de material sintético como resinas de silicone, poliacrilato ou ésteres de polimetacrilato ou seus copolímeros e poliuretanos. A presente patente difere de US4060081A por proporcionar biofilme cicatrizante biocompatível, flexível, biodegradável e com capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas complexas.
- A patente EP0187703B1 defende sistema de liberação continuada composto por preparação de quitosana, polímero e fármaco que não inclua uma proteína solúvel em água. A presente invenção difere da citada uma vez que propõe biofilme incorporado com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno, proporcionando não só um produto pró-cicatrização como antimicrobiano.
- A patente BR1020180751573A2 defende o uso de collagenase em composição de creme dermatológico para o tratamento de queimaduras e feridas compreendendo um ingrediente ativo farmacêutico API Sulfadiazina de Prata 1% (10 mg/g) e Collagenase 0,006% 0,6 U/g e um sistema de base para creme hidrofílico. A presente patente difere de BR1020180751573A2 por utilizar biofilme incorporado com nanopartículas de prata (AgNP) associada a hidrolisado de colágeno, favorecendo a epitelização e cicatrização de feridas, além de reduzir as chances de contaminação microbiana pela ação antimicrobiana da AgNP.
- A patente PI96069970A descreve uso de polímeros solúveis em água para liberação controlada de collagenase usado no melhoramento de tecido cutâneo. Diferentemente, a presente patente utiliza blend polissacarídico (quitosana e galactomanana) associado a nanopartículas de prata oriundas de bioativos de origem microbiana. Essa combinação proporciona propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa. Além disso, o biofilme cicatrizante formulado na sua patente possui biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas. Com isso, o seu produto oferece uma abordagem inovadora e eficaz

para o tratamento de lesões cutâneas em humanos e animais, contribuindo para o melhoramento e regeneração do tecido cutâneo.

- US109530433B2 apresenta um produto, composto por múltiplos componentes junto a nanopartículas de prata, que propõe tratamento para infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. A presente patente difere de US109530433B2 por associar as nanopartículas de prata a substâncias com ação cicatrizando, possibilitando seu uso no tratamento de feridas. O biofilme cicatrizante formulado nessa patente apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas complexas em humanos e animais.
- A patente US20160220606A1 descreve sistema multicamadas composto por prata coloidal, cobre coloidal e óxido de zinco coloidal misturados em água purificada estéril para tratamento de feridas, funcionando como antimicrobiano. A presente patente difere da citada por utilizar biofilme composto por quitosana e galactomanana associados a nanopartícula de prata com hidrolisado de colágeno, possibilitando o uso tópico de um produto com alta durabilidade, biodegradável e com ação cicatrizante e antimicrobiana.
- A patente KR20120137642A é constituída por nanopartícula de prata atrelada a sulfato de condroitina para tratamento de feridas ao mesmo passo que previne a proliferação de bactérias e assim, acelerando a recuperação do tecido. A presente patente difere de KR20120137642A por apresentar produto com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno associados a biofilme polissacarídico com capacidade de liberação controlada da substância ativa, permitindo uma ação prolongada e eficaz no local da ferida, reduzindo a necessidade de trocas. Ele também promove a estabilidade do ambiente da ferida, mantendo umidade adequada e evitando a desidratação do tecido, bem como biocompatibilidade evitando reações adversas. Além disso, o biofilme polissacarídico é flexível, o que facilita sua aplicação em diferentes tipos de feridas, incluindo feridas complexas. Por fim, seu baixo custo relativo, principalmente devido à disponibilidade e preço acessível da quitosana e da galactomanana, torna essa tecnologia mais viável economicamente.

- A patente WO2018015976A1 descreve produto usado para tratamento de feridas e controle de infecção composto por nanopartículas de prata como agente antibacteriano, um agente antioxidante como ácido gálico e Esfingosina-1-fosfato como indutor da proliferação de células endoteliais. A presente patente difere de WO2018015976A1 ao oferecer um produto que combina nanopartículas de prata, hidrolisado de colágeno e biofilme polissacarídico, proporcionando liberação controlada da substância ativa, estabilidade do ambiente da ferida, biocompatibilidade, flexibilidade e baixo custo.
- WO2014147638A1 descreve matriz para uso em cicatrização de feridas compostas por: algodão, quitosana, nanopartícula de prata e antioxidante, a presente patente diferencia-se por proporcionar produto mais eficaz e economicamente viável para o tratamento de feridas, representando uma inovação significativa no campo da cicatrização e cuidados com a pele.

DATAS DE EVENTOS NO DESENVOLVIMENTO DO INVENTO:

EVENTO	DATA APROXIMADA
Concepção	março de 2022
Início das Atividades	agosto de 2022
Croquis e Desenhos	setembro de 2022
Primeira Descrição (relato)	outubro de 2022
Modelo (protótipo) em operação	novembro de 2022 à março de 2023
Primeira Publicação	x
Primeira Apresentação Oral	x
Prova de validade do princípio	maio de 2023
Conclusão do protótipo	maio de 2023

• NOVIDADE DO INVENTO

	Sim	Não sei
1. Conhece um outro invento com característica similar?		X

2. Houve alguma patente depositada/requerida de um invento similar		X
3. Há pesquisa bibliográfica relacionada com o invento	X	

- Se 1 for afirmativo, indique as principais referências bibliográficas relacionadas ao presente invento, anexando, se possível, cópia:
- EXPERIÊNCIA COM REGISTRO DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

	Sim	Não
1. A presente invenção já foi revelada fora da Universidade?		X
2. Esteve pessoalmente envolvido em outro processo de patente?		X
3. Há alguma proteção de propriedade intelectual aplicada a esta invenção?		X

- Se 1 for afirmativo, informe detalhadamente, as circunstâncias e anexe cópia do trabalho.(Exemplo: Apresentação em conferências, publicações científicas em revistas, comunicações informais, patentes, normas)

Alertamos que a divulgação de aspectos da invenção que por ventura não tenham sido comunicados a este Escritório podem prejudicar a expedição da carta-patente no Brasil, assim como eventuais solicitações de patenteamento no Exterior.

- APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

	Sim	Não
1. O presente invento já foi revelado à indústria?		X
2. Foi demonstrado interesse comercial?		X

- Se 1 for afirmativo, informe quando, onde, e que tipo de invento:
 - Se 2 for afirmativo, informe nome, contato e telefone da empresa:

FINANCIAMENTO DA PESQUISA

- Foi feito contrato com órgão financiador ou gerido de acordo com um *Termo de Confidencialidade*?
Não
- Nome do agente financiador (órgão de fomento/empresa/etc.)
- Número do contrato (**anexar cópia**):
- Contato no órgão
- O órgão financiador foi informado do invento?
- Contrato via Fundação de Apoio da Universidade () sim (**x**) não

TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA

- **COMENTE A POTENCIALIDADE DE COMERCIALIZAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO.** (*Especifique áreas de aplicação e/ou produtos que imaginas que possam utilizar esta nova tecnologia*)

A presente patente tem a potencialidade de substituir ou ser acoplada ao mercado hospitalar uma vez que o potencial de escalonamento é muito mais favorável que o mercado atual disponibiliza. Os biofilmes podem funcionar como dispositivos do tipo curativos externos, e uma vez sendo hidrossolúveis, não haveria necessidade de substituição por retirada do material, apenas, lavagem do local e aplicação de um novo biofilme, como trocas diárias.

CITE MERCADOS OU EMPRESAS QUE PODERIAM TER INTERESSE EM CONHECER ESTA NOVA TECNOLOGIA (setores industriais / farmacêuticos / médicos / agronegócios)

- **Setores farmacêuticos** (Bayer, Bristol-Myers, Pfizer, Medley, Hebron, Lafepe, Natulab);
- **Indústrias produtoras de reagentes e Kits diagnósticos** (Sino Biological inc, Sigma, WAMA Diagnóstica, Labtest Diagnóstica, Intertek, DPM Diagnóstica, Roche, Vetec);

- **Indústrias produtoras de nutracêuticos para humanos e animais** (D'adamo, purina, Whiskas, Adimax Pet);
- **Industria de inseticidas e repelentes** (Frontline, Dipil, Isorgan, Albaugh, Agroquima, Insetimax, Reckitt Benckiser, Johnson & Johnson).

Declaro(amos) que todas informações acima descritas são verdadeiras.

Concordamos que em caso de ser efetivado o depósito de pedido de patente nos comprometemos a não divulgar os resultados obtidos, sem a prévia anuência do NIT - UFRPE.

Ciência do(s) Inventor(es):

Referências

ASHOK, A. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 9, 2017.

MITCHELL, D. A. Bioreactors for Solid-State Fermentation, Editor(s): Murray Moo-Young, Comprehensive Biotechnology (Second Edition), Academic Press, 2011.

PUREWAL et al., Antioxidant, anti-cancer, and debittering potential of edible fungi (*Aspergillus oryzae*) for bioactive ingredient in personalized foods, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, Volume 43, 2022.

RAVINDRAN, R. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. Bioengineering (Basel). 28;5(4):93. 2018.

SANTOS, A. F. A. et al. Bioprospecção de enzimas produzidas por *Aspergillus tamaraii* URM 4634, isolado do solo da Caatinga, por fermentação em estado sólido. Brazilian Journal of Development, v. 6, p. 25663-25676, 2020.

SOCCOL, C. Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation. vl. 1. 2017.

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis, *Heliyon*, Volume 8, Issue 3, 2022.

Ganaie M.A., Soni H., Naikoo G.A. et al. Screening of low cost agricultural wastes to maximize the fructosyltransferase production and its applicability in generation of fructooligosaccharides by solid state fermentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 118: 19-26. 2017.

GENTIL, N. O., Purificação Parcial de Proteases Termorresistentes Secretadas por *Bacillus* sp. smia-2 em Culturas Submersas Contendo Substratos de Baixo Custo. 2015. f. 48-58 Dissertação (Mestrado –Produção Vegetal) -Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goyacazes -RJ. 2015.

Hutkins, R. W., Krumbeck, J.A., Bindels, L.B.; Cani, P.D., Jr fahey, G.; Goh, Y.J., Hamaker, B.; Martens, E.C.; Mills, D.A., Rastal, R.A.; Vaughan, E., Sanders, M.E. Prebiotics: Why definitions matter, *Curr. Opin. Biotechnol.*(2016) 1–7.

Lateef, A., Oloke, J. K., Prapulla, S. G. The effect of ultrasonication on the release of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans* CFR 77, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1067–1070.

DESENHOS

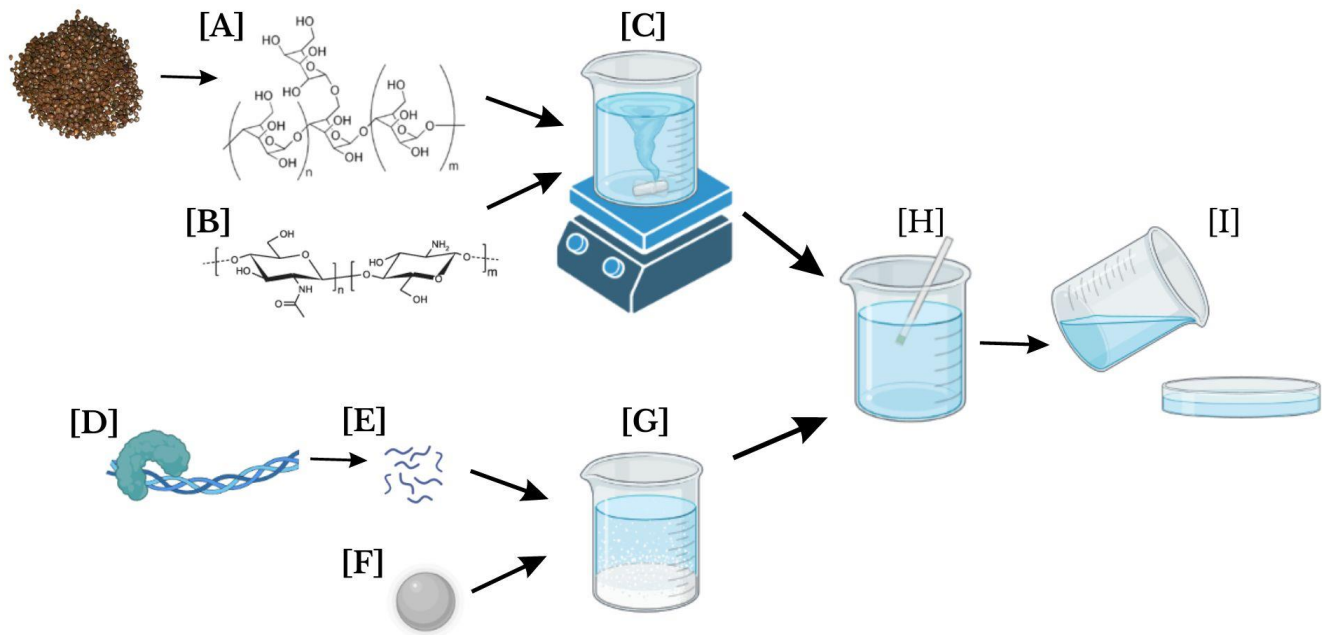


Figura 1

REIVINDICAÇÕES

[001] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, **caracterizada por** conter os ingredientes quitosana, galactomanana, peptídeos de colágeno, enzima, e nanopartículas de prata em uma base hidrossolúvel.

[002] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o ingrediente quitosana está presente em uma concentração que varia de 0,5% a 1,5% e o ingrediente galactomanana está presente em uma concentração que varia de 1,0% a 2%.

[003] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** conter ainda os ingredientes peptídeos de colágeno e enzima collagenolítica

[004] BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada pelo** fato de que o ingrediente peptídeo de colágeno está presente em uma concentração que varia de 0,01% a 0,03% e o ingrediente enzima collagenolítica está presente em uma concentração 0,01%.

RELATÓRIO DESCRITIVO

BIOFILME CICATRIZANTE FORMULADO À BASE DE UM BLEND POLISSACARÍDICO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA COM HIDROLISADO DE COLÁGENO

Campo da invenção

[001] Essa invenção pertence ao setor técnico de biotecnologia e cuidados com a saúde. Descreve um produto inovador à base de quitosana e nanopartículas de prata associadas a hidrolisado de colágeno, com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e pró-cicatrizantes, para o tratamento de lesões cutâneas em humanos e animais. Esse produto, obtido por um processo específico, apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas. Além disso, destaca-se o baixo custo relativo da quitosana e o alto teor de substâncias benéficas do hidrolisado de colágeno. A aplicação desse produto e processo pode beneficiar indústrias médicas, veterinárias, cosméticas, de curativos e farmacêuticas, ampliando as opções terapêuticas e promovendo avanços no cuidado da pele e cicatrização de feridas. Essa inovação representa uma contribuição significativa para a área, oferecendo um produto eficaz e versátil para o tratamento de ferimentos em diversas aplicações e setores industriais. Além disso, o uso desses biofilmes pode ser explorado em outras indústrias relacionadas à saúde, como a cosmética e a fabricação de curativos.

Fundamentos da invenção

[002] A cicatrização ocorre em várias fases distintas. A primeira fase é a inflamatória, que envolve a vasoconstrição seguida de vasodilatação em resposta à cascata de coagulação e às vias do complemento (Cañedo-Dorantes, L., & Cañedo-Ayala, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. Int. J. Inflam., 2019). A fase seguinte é a proliferação celular, que inclui a

fibroplasia, onde ocorre a síntese e deposição da matriz extracelular; a granulação, caracterizada pela formação de tecido rico em vasos neoformados, macrófagos e fibroblastos; a contração tecidual, que ocorre em feridas abertas, queimaduras profundas, deiscência ou feridas tratadas com enxertos cutâneos, permitindo o fechamento da ferida sem a formação de novo tecido; e, por fim, a epitelização, onde ocorre a migração de queratinócitos e a mitose de células epidérmicas para cobrir a ferida a partir da camada basal (Tan, S. T., & Dosan, R. Lessons From Epithelialization: The Reason Behind Moist Wound Environment. *The Open Dermat. J.* 2019). Após a fase de proliferação celular, ocorre a remodelação da ferida, que envolve a síntese, degradação e orientação das fibras colágenas.

[003] Existem várias opções de coberturas e substitutos de pele disponíveis comercialmente para otimizar o processo de cicatrização. Essas opções variam desde gaze estéril a procedimentos mais sofisticados. Discutiremos alguns exemplos abaixo.

[004] As coberturas de Rayon são consideradas um curativo estéril de alta qualidade e possui esse nome por ser composto por malha de acetato e celulose, reduzindo sua capacidade de aderir a ferida e assim evitando danos durante a remoção. Além disso, são impregnadas com ácidos graxos essenciais (AGE), estimulando o processo de cicatrização, uma vez que servem como hidratantes e estimulam a atividade celular no local, acelerando e promovendo o processo natural de cicatrização da pele. Entretanto, feridas muito profundas ou complexas podem exigir abordagens ou produtos especializados (Naeem; Assim e Tufail. *Perf. Eval. Anti Pilling and Easy-Care Finished Rayon and Rayon/Cotton Satin Fabric. Jour. Nat. Fib. Vol. 19; nº3, 2020*).

[005] Algumas outras coberturas possíveis incluem: Coberturas baseadas em alginato de cálcio, que entre suas vantagens oferece uma alta absorção de exsudato e facilidade de remoção, entretanto precisam ser trocadas com frequência e podem aderir a ferida caso não haja umidade suficiente no local (Li et al. *Prep. and Phys. Prop. of Cav. Calc. Alg. Wound Dressings. AMR 332–334, 1670–1675. 2011*). Coberturas do tipo hidrocolóide, compostas por massa hidrofílica gelável aplicada na forma semissólida a um carreador flexível semipermeável, formando um ambiente úmido e protegido

de contaminantes externos, mas também exigem trocas frequentes e podem gerar desconforto se usadas em feridas próximas à pelos ou cabelo (Thomas. Hydrocolloid dressings in the management of acute wounds: a review of the literature. IWJ. V.5, Pg. 602 – 613. 2008). E coberturas de espuma que além de possuir alta capacidade de absorção do exsudato, possui maior permeabilidade ao vapor e promove maior amortecimento, mas ainda precisam de trocas frequentes e podem atingir maiores espessuras que suas concorrentes, delimitando as áreas de uso (Santamaria et al. Clinical perf. Charact. for bord. foam dress. in the treat. of complex wounds: An int. wound dress. Tech. Exp. panel review. Int Wound J. Pg.1–7; 2023).

[006] Buscando reduzir a toxicidade e rejeição as opções também são usadas matrizes biopoliméricas como celulose e colágeno, que além da biocompatibilidade, fornecem suporte estrutural e estimulam a cicatrização (Tenorová et al., Prep. and eval. of bilayer films based on collag. and carboxymethylcellulose for wound therapy. Ceska a Slovenska farmacie. Pg. 229-236. 2019). Entretanto o custo elevado da obtenção desses materiais limita seu uso. (Dai, C., Shih, S., & Khachemoune, A. Skin substitutes for acute and chronic wound healing: an updated review. Journal of Dermatological Treatment, 2020).

[007] Ainda podemos listar como alternativa a terapia a vácuo, terapia com oxigênio hiperbárico, enxertos de pele, suturas e pontos e desbridamento cirúrgico. No entanto, nenhuma dessas opções demonstra superioridade em acelerar a cicatrização e prevenir a infecção autóloga, sendo necessária a combinação com outros tratamentos e, conseqüentemente, o aumento nos processos e no custo.

[008] Diante disto, é notável o empenho para o desenvolvimento de produtos e processos a fim de suprir a necessidade no tratamento de feridas que possam atuar de forma ampla, não gerem desconforto no paciente e possuam ação antimicrobiana, acelerando assim o processo de cicatrização. Neste sentido, esta patente propõe um produto composto nanopartículas de prata agregadas a peptídeos de colágeno imobilizados em biofilme de polissacarídeos e seu processo de obtenção. Uma vez que os peptídeos de colágeno associados ao biofilme podem atuar na cicatrização e as

nanopartículas de prata promovem uma ação antimicrobiana fornecendo um produto completo. Além disso, o processo de obtenção desse produto, descrito no presente invento é composto por etapas simples e matéria prima barata, ampliando assim sua possibilidade de uso.

[009] Os documentos que antecedem a presente patente descrevem produtos e processos que não atendem a todas as necessidades do mercado atual, como pode ser observado nos documentos patentários a seguir.

[0010] A patente PI08038074A descreve o processo de obtenção de sistema de liberação controlada de fármacos Lipofílicos com base em filme multicamada constituído por uma camada de polímero biodegradável de quitosana e outra do mesmo polímero contendo o fármaco disperso. A presente invenção se diferencia da patente PI08038074A ao oferecer propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa, baixo custo relativo com a utilização da quitosana e alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno. Além disso, a sua inovação é versátil e possui aplicações em diversos setores, ampliando as opções terapêuticas para o tratamento de feridas e lesões cutâneas.

[0011] A patente BR1320130338671E2 dispõe de um produto para tratamento de lesões cutâneas complexas em pele humana e animal, produzido a partir de filme de quitosana, ácido (orgânico ou inorgânico) e fração hidroalcóolica de Barbatimão das espécies *Stryphnodendron obovatum*, *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron poyphylum*. Esta invenção difere da patente BR1320130338671E2 ao oferecer um biofilme cicatrizante formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), associado a nanopartículas de prata associadas a peptídeo de colágeno. As vantagens incluem propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa, baixo custo relativo com a utilização da quitosana e alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno, além de ampla aplicação em diversos setores.

[0012] A patente BR01020190023708A2 descreve filme a base de quitosana e zeína para liberação controlada de antimicrobianos como ácido elágico. Obtendo atividade contra *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*. Diferente da patente PI08038074A, o presente invento oferece propriedades antimicrobianas aprimoradas com as nanopartículas de prata, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa. Em comparação com a patente BR1320130338671E2, destaca-se pelo baixo custo relativo da quitosana e da galactomanana extraída de *Cassia grandis*, alto teor de substâncias benéficas com o hidrolisado de colágeno e ampla aplicação em diversos setores. Além de oferecer propriedades antimicrobianas aprimoradas e um amplo espectro de atividade contra microorganismos patogênicos. Essas vantagens tornam o o presente invento uma opção eficaz, versátil e economicamente viável para o tratamento de feridas e lesões cutâneas.

[0013] A patente BG66767B1 refere-se a uma composição biologicamente ativa para tratamento de feridas crônicas contendo protease, glicerina, hidrolisado de colágeno, íons de magnésio e zinco, vitaminas e anti-sépticos. Sendo previsto para uso de tratamento de defeitos da pele, como picadas, inflamação em queimaduras ou insetos, atingindo hematoma de ferimento, para líquen ou sarna de psoríase e afins. A presente patente apresenta vantagens distintas em relação à patente BG66767B1, destacando-se pela presença de nanopartículas de prata com propriedades antimicrobianas aprimoradas e liberação controlada da substância ativa. Além disso o biofilme é relativamente mais barato uma vez que é composto por quitosana e galactomanana e pode ser obtido de fontes diversas, facilitando sua extração. Além disso, a protease com atividade colagenolítica e os peptídeos de colágeno aceleram o processo de cicatrização proporcionando uma abordagem eficaz e versátil para o tratamento de diversos tipos de feridas, incluindo picadas, inflamações, queimaduras, lesões cutâneas e afins.

[0014] A patente US4060081A descreve uma pele sintética composta por membrana de múltiplas camadas, cuja primeira camada é formada por hidrolisado de colágeno e polissacarídeo e a segunda

camada composta por uma membrana de material sintético como resinas de silicone, poliacrilato ou ésteres de polimetacrilato ou seus copolímeros e poliuretanos. A presente patente difere de US4060081A por proporcionar biofilme cicatrizante biocompatível, flexível, biodegradável e com capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas complexas.

[0015] A patente EP0187703B1 defende sistema de liberação continuada composto por preparação de quitosana, polímero e fármaco que não inclua uma proteína solúvel em água. A presente invenção difere da citada uma vez que propõe biofilme incorporado com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno, proporcionando não só um produto pró-cicatrização como antimicrobiano.

[0016] A patente BR1020180751573A2 defende o uso de collagenase em composição de creme dermatológico para o tratamento de queimaduras e feridas compreendendo um ingrediente ativo farmacêutico API Sulfadiazina de Prata 1% (10 mg/g) e Collagenase 0,006% 0,6 U/g e um sistema de base para creme hidrofílico. A presente patente difere de BR1020180751573A2 por utilizar biofilme incorporado com nanopartículas de prata (AgNP) associada a hidrolisado de colágeno, favorecendo a epitelização e cicatrização de feridas, além de reduzir as chances de contaminação microbiana pela ação antimicrobiana da AgNP.

[0017] A patente PI96069970A descreve uso de polímeros solúveis em água para liberação controlada de collagenase usado no melhoramento de tecido cutâneo. Diferentemente, a presente patente utiliza blend polissacarídico (quitosana e galactomanana) associado a nanopartículas de prata oriundas de bioativos de origem microbiana. Essa combinação proporciona propriedades antimicrobianas aprimoradas, ação anti-inflamatória, estabilidade e liberação controlada da substância ativa. Além disso, o biofilme cicatrizante formulado na sua patente possui biocompatibilidade, flexibilidade, biodegradabilidade e capacidade de liberação controlada, favorecendo a cicatrização de feridas, especialmente as complexas. Com isso, o seu produto oferece uma abordagem inovadora e eficaz para o tratamento de lesões cutâneas em humanos e animais, contribuindo para o melhoramento e regeneração do tecido cutâneo.

[0018] US109530433B2 apresenta um produto, composto por múltiplos componentes junto a nanopartículas de prata, que propõe tratamento para infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. A presente patente difere de US109530433B2 por associar as nanopartículas de prata a substâncias com ação cicatrizando, possibilitando seu uso no tratamento de feridas. O biofilme cicatrizante formulado nessa patente apresenta estabilidade, biocompatibilidade, flexibilidade e capacidade de liberação controlada da substância ativa, favorecendo a cicatrização de feridas complexas em humanos e animais.

[0019] A patente US20160220606A1 descreve sistema multicamadas composto por prata coloidal, cobre coloidal e óxido de zinco coloidal misturados em água purificada estéril para tratamento de feridas, funcionando como antimicrobiano. A presente patente difere da citada por utilizar biofilme composto por quitosana e galactomanana associados a nanopartícula de prata com hidrolisado de colágeno, possibilitando o uso tópico de um produto com alta durabilidade, biodegradável e com ação cicatrizante e antimicrobiana.

[0020] A patente KR20120137642A é constituída por nanopartícula de prata atrelada a sulfato de condroitina para tratamento de feridas ao mesmo passo que previne a proliferação de bactérias e assim, acelerando a recuperação do tecido. A presente patente difere de KR20120137642A por apresentar produto com nanopartículas de prata e hidrolisado de colágeno associados a biofilme polissacarídico com capacidade de liberação controlada da substância ativa, permitindo uma ação prolongada e eficaz no local da ferida, reduzindo a necessidade de trocas. Ele também promove a estabilidade do ambiente da ferida, mantendo umidade adequada e evitando a desidratação do tecido, bem como biocompatibilidade evitando reações adversas. Além disso, o biofilme polissacarídico é flexível, o que facilita sua aplicação em diferentes tipos de feridas, incluindo feridas complexas. Por fim, seu baixo custo relativo, principalmente devido à disponibilidade e preço acessível da quitosana e da galactomanana, torna essa tecnologia mais viável economicamente.

[0021] A patente WO2018015976A1 descreve produto usado para tratamento de feridas e controle de infecção composto por nanopartículas de prata como agente antibacteriano, um agente antioxidante como ácido gálico e Esfingosina-1-fosfato como indutor da proliferação de células endoteliais. A presente patente difere de WO2018015976A1 ao oferecer um produto que combina nanopartículas de prata, hidrolisado de colágeno e biofilme polissacarídico, proporcionando liberação controlada da substância ativa, estabilidade do ambiente da ferida, biocompatibilidade, flexibilidade e baixo custo.

[0022] WO2014147638A1 descreve matriz para uso em cicatrização de feridas compostas por: algodão, quitosana, nanopartícula de prata e antioxidante, a presente patente diferencia-se por proporcionar produto mais eficaz e economicamente viável para o tratamento de feridas, representando uma inovação significativa no campo da cicatrização e cuidados com a pele.

Breve descrição dos desenhos

[0023] A presente patente é detalhada na imagem a seguir:

A Figura fluxograma do processo de obtenção do produto descrito na presente patente. Onde, [A] representa fórmula geral de galactomanana extraída de *Cássia grandis*; [B] representa fórmula geral de quitosana; [C] representa a junção de [A] e [B] por meio de agitação; [D] ilustra a ação de uma collagenase para formação dos peptídeos de colágeno; [E] representa os peptídeos formados a partir da ação da collagenase; [F] ilustra a Ag^+ utilizada para formação das nanopartículas de prata (AgNP); [G] representa a união de [E] e [F] para formação de AgNP com hidrolisados de colágeno; [H] simboliza a junção do gel polissacarídico a AgNP para formulação do produto e [I] representa a confecção do biofilme.

Descrição da invenção

[0024] A presente invenção propõe a formulação de um biofilme gerado a partir da fusão de um gel contendo uma mistura de galactomanana extraído das sementes de *Cassia grandis* e quitosana com

uma mistura de nanopartículas de prata com peptídeo obtido através da degradação do colágeno tipo IV por collagenases.

[0025] A potencialidade dessa invenção está em conduzir ao mercado um produto que traz a combinação de ingredientes naturais, juntamente com as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de prata, oferecendo assim uma possível aplicação na área biomédica e veterinária, como em curativos de feridas, dispositivos médicos revestidos e outras aplicações relacionadas à cicatrização de tecidos e prevenção de infecções.

[0026] O produto proposto passa por três etapas distintas para sua obtenção: I. Formação de blend por meio da associação da galactomanana com a quitosana; II. Obtenção das nanopartículas de prata pela união de Ag^+ com o peptídeo resultante da quebra do colágeno tipo IV e collagenase industrial; III. Fusão das etapas anteriores para a formação do biofilme. A seguir, serão detalhadas as descrições de cada uma dessas etapas.

[0027] Etapa I: Formação de blend polissacarídico. A formação do gel ocorre pela combinação da galactomanana e da quitosana, dois polissacarídeos, resultando em uma estrutura gelatinosa. O processo envolve os seguintes passos:

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa traz um processo inovador na área da biodegradação de colágeno utilizando o Ultrassom como ferramenta na área da Biotecnologia. Os resultados demonstraram que o tempo de contato durante o processo de sonicação das reações envolvendo a enzima previamente purificada de *Aspergillus terreus* UCp1276 foram essenciais para produzir peptídeos bioativos de interesse na área médica, uma vez que eles apresentaram atividade anticoagulante. Este ensaio é extremamente importante para avaliar a via intrínseca das Cascata de coagulação. Nos ensaios de eletroforese SDS-PAGE, a visualização do grau de hidrólise pode ser totalmente acompanhada visualmente, uma vez que os peptídeos formados apresentaram uma não conformidade na separação.

Ainda, no presente trabalho conseguiu-se produzir um biofilme formulado à base de um blend polissacarídico (quitosana e galactomanana), atóxico, hidrofílico, biocompatível, biodegradável e de acesso fácil, associado às nanopartículas de prata, com características antibacterianas, oriundas de bioativos de origem microbiana, os quais podem potencializar o efeito cicatrizante de feridas. A presente patente de invenção propõe através de um processo biológico, verde, atóxico e biodegradável, a formulação de um produto a base de polissacarídeos sustentável, economicamente viável e composto por material natural e biodegradável, utilizando como suporte o biofilme composto de quitosana de camarão e galactomanana de *Cassia grandis*, planta do gênero *Cassia* sp., eficaz na produção de filmes polissacarídicos. Ainda, para acelerar o processo cicatricial, foram adicionados adjuvantes ao processo de produção do filme, tais como: enzima colagenolítica, peptídeos e nanopartículas de prata. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia e visa acelerar o tempo de reparo tecidual causadas por ferimentos, queimaduras superficiais e reduzir as co-infecções, dessa forma reduzindo o custo da produção industrial para sua aplicação no setor hospitalar.