



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CITOTÓXICOS DE UMA
ENZIMA FIBRINOLÍTICA COMO POSSÍVEL CANDIDATA AO TRATAMENTO DA
TROMBOSE**

Recife
2024

JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CITOTÓXICOS DE UMA
ENZIMA FIBRINOLÍTICA COMO POSSÍVEL CANDIDATA AO TRATAMENTO DA
TROMBOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite.

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Pajeú Nascimento.

Recife

2024

Catlogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Barbosa Filho, Jose Pedro Martins.

Avaliação dos parâmetros hematológicos e citotóxicos de uma enzima fibrinolítica como possível candidata ao tratamento da trombose / Jose Pedro Martins Barbosa Filho. - Recife, 2024. 108f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

Orientação: Ana Cristina Lima Leite.

Coorientação: Thiago Pajeú Nascimento.

1. *Aspergillus tamarii*; 2. Coágulo de fibrina; 3. Coagulação; 4. Enzima proteolítica; 5. Terapia trombolítica; 6. Hemólise. I. Leite, Ana Cristina Lima. II. Nascimento, Thiago Pajeú. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

JOSÉ PEDRO MARTINS BARBOSA FILHO

**AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E CITOTÓXICOS DE UMA
ENZIMA FIBRINOLÍTICA COMO POSSÍVEL CANDIDATA AO TRATAMENTO DA
TROMBOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos

.

Aprovado em: 20/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Pesquisadora Dra. Viviane do Nascimento e Silva Alencar (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Profa. Dra. Alice Maria Gonçalves Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação às futuras gerações de pesquisadores, que continuarão a busca incessante pelo conhecimento. Que este trabalho possa servir de inspiração e base para novos estudos, descobertas e invenções.

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas, às quais sou profundamente grato e que de certa forma, contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e construção da pessoa que sou hoje.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFPE), pela oportunidade de realizar meus estudos e pelo suporte contínuo ao longo desta jornada;

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite, pelo acolhimento, atenção e por ter acreditado no meu potencial para realização deste trabalho;

Ao meu coorientador, Dr. Thiago Pajeú Nascimento, pelo suporte na elaboração desta pesquisa. Agradeço inestimavelmente por todos ensinamentos, paciência, amizade, encorajamento ao longo de todo o processo e por ser um exemplo de profissional. Seu conhecimento e experiência foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, Viviane Alencar e Alice Maria Santos, agradeço pelas valiosas contribuições, sugestões e críticas construtivas que enriqueceram esta dissertação;

Aos amigos da graduação e da UFPE, Vanessa Maria, Camila Gabriela, Pámina Silva, Ewelyn Santos, Odimar Brandão e Luís Alves, meu muito obrigado por todos os momentos que compartilhamos e pelo apoio ao longo desses anos;

A meus companheiros de turma nas disciplinas durante o mestrado, Danilo Vieira e Auygna Silva, presentes comigo desde o processo seletivo, agradeço-os pelo companheirismo e por tornarem a rotina da pós-graduação mais leve;

Aos meus amigos de laboratório, Renata Sobral, Josué Brito, Maria de Jesus e Thiers Campos, que compartilharam comigo suas experiências e conhecimentos, criando um ambiente de trabalho estimulante e colaborativo;

Aos laboratórios parceiros, LABTECBIO/UFRPE e o LIBAS/UPE, que se dispuseram a contribuir com este estudo, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e pelo tempo dedicado;

As instituições e agências de fomento que apoiaram esta pesquisa, como o HEMOPE e o CNPq, sem os quais este trabalho não teria sido possível, em especial, agradeço a FACEPE pelo suporte financeiro durante os 24 meses do mestrado, contribuindo significativamente para a execução deste projeto;

A todos, meu muito obrigado.

RESUMO

A formação de coágulos de fibrina, principal componente proteico dos coágulos sanguíneos está intimamente envolvida no desenvolvimento das doenças cardiovasculares e por isso, a trombose, desempenha um papel importante na patogênese de vários distúrbios cardiovasculares devido ao acúmulo desses coágulos que bloqueiam a passagem do fluxo sanguíneo. Diante disso, o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização bioquímica e avaliar *in vitro* os aspectos da ação fibrinolítica, trombolítica e toxicidade da protease oriunda de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279, uma vez que, a intervenção de pesquisas nessa área pode ajudar no desenvolvimento de agentes trombolíticos mais seguros para o uso terapêutico. A protease com atividade fibrinolítica e purificada pelo sistema de duas fases aquosas e particionada para a fase sal foi avaliada quanto a caracterização bioquímica (pH e temperatura ótima e estabilidade, efeito de íons metálicos, inibidores e ação de surfactantes), determinação da atividade amidolítica, SDS-PAGE e zimograma de fibrina. Além disso, foi avaliado a atividade fibrinogenolítica da enzima e sua degradação trombolítica *in vitro*. Quanto aos testes toxicológicos foram realizados ensaios de citotoxicidade, determinação dos tempos de coagulação, atividade hemolítica e efeito da albumina sérica sobre a atividade enzimática. A protease fibrinolítica purificada foi caracterizada como uma serino protease e demonstrou uma temperatura ótima de 50°C e se manteve estável até 120 minutos. O pH ótimo foi de 7,0 e estável por 36 horas. A atividade enzimática foi potencializada pela adição de Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ e inibida na presença dos íons Cu²⁺ e Fe³⁺ e pelos surfactantes Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio, com uma diminuição de 37,66 e 62,35%, respectivamente. A enzima exibiu ainda uma maior especificidade para o substrato N-succinil-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilida, um substrato típico de quimotripsina. A massa molecular da protease foi em torno de 90 kDa, exibindo também atividade sobre o zimograma de fibrina. A protease purificada não degradou o fibrinogênio, entretanto, promoveu uma degradação de 38,81% do trombo *in vitro* de fibrina após 90 minutos. Não houve nenhuma toxicidade frente as linhagens celulares testadas e na avaliação hematológica houve um discreto prolongamento do TP quando comparado com o grupo controle. Ainda, constatou-se que não houve interferência sobre a ação da trombina ou do fibrinogênio sobre o TT e em relação ao TPPa, observou-se o prolongamento sobre o tempo de coagulação à medida que aumentou a concentração da enzima. Por fim, foi verificado que nenhuma concentração utilizada demonstrou promover a lise das células sanguíneas e que a albumina promoveu um aumento da atividade em 31,70% da atividade enzimática. Mediante os resultados obtidos, a pesquisa revelou que o *Aspergillus tamaraii* Kita UCP1279 possui potencial para a produção de enzimas fibrinolíticas, oferecendo uma alternativa promissora para o tratamento da trombose. A caracterização realizada demonstrou a estabilidade da enzima, que apresenta capacidade de degradar fibrina, ausência de toxicidade e sem alterações nos parâmetros hematológicos. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar seu desempenho em organismos vivos, abrindo perspectivas para sua potencial aplicação como uma nova droga trombolítica.

Palavras chaves: *Aspergillus tamaraii*; coágulo de fibrina; coagulação; enzima proteolítica; terapia trombolítica; hemólise.

ABSTRACT

The formation of fibrin clots, the main protein component of blood clots, is closely involved in the development of cardiovascular diseases and therefore, thrombosis, plays an important role in the pathogenesis of several cardiovascular disorders due to the accumulation of these clots that block the passage of blood flow. Therefore, the objective of this study was to carry out the biochemical characterization and evaluate in vitro aspects of the fibrinolytic, thrombolytic action and toxicity of the protease from *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, since research intervention in this area can help in the development of agents safer thrombolytics for therapeutic use. The protease with fibrinolytic activity and purified by the aqueous two-phase system and partitioned to the salt phase was evaluated for biochemical characterization (optimal pH and temperature and stability, effect of metal ions, inhibitors and surfactant action), determination of amidolytic activity, SDS-PAGE and fibrin zymogram. Furthermore, the fibrinogenolytic activity of the enzyme and its thrombolytic degradation in vitro were evaluated. Regarding toxicological tests, cytotoxicity tests were carried out, determination of clotting times, hemolytic activity and the effect of serum albumin on enzymatic activity. The purified fibrinolytic protease was characterized as a serine protease and demonstrated an optimum temperature of 50°C and remained stable for up to 120 minutes. The optimum pH was 7,0 and stable for 36 hours. Enzymatic activity was enhanced by the addition of Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ and inhibited in the presence of Cu²⁺ and Fe³⁺ ions and by the surfactants Triton X-100 and sodium dodecyl sulfate, with a decrease of 37,66 and 62,35 %, respectively. The enzyme also exhibited greater specificity for the substrate N-succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide, a typical chymotrypsin substrate. The molecular mass of the protease was around 90 kDa, also exhibiting activity on the fibrin zymogram. The purified protease did not degrade fibrinogen, however, it promoted a degradation of 38,81% of the in vitro fibrin thrombus after 90 minutes. There was no toxicity against the cell lines tested and in the hematological evaluation there was a slight prolongation of the PT when compared to the control group. Furthermore, it was found that there was no interference with the action of thrombin or fibrinogen on the TT and in relation to the TPPa, a prolongation of the clotting time was observed as the concentration of the enzyme increased. Finally, it was verified that no concentration used was shown to promote the lysis of blood cells and that albumin promoted an increase in enzyme activity by 31,70%. Based on the results obtained, the research revealed that *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 has the potential for the production of fibrinolytic enzymes, offering a promising alternative for the treatment of thrombosis. The characterization carried out demonstrated the stability of the enzyme, which has the ability to degrade fibrin, absence of toxicity and no changes in hematological parameters. However, additional studies are needed to evaluate its performance in living organisms, opening perspectives for its potential application as a new thrombolytic drug.

Keywords: *Aspergillus tamarii*; fibrin clot; coagulation; proteolytic enzyme; thrombolytic therapy; hemolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Cascata da coagulação sanguínea (hemostasia secundária)	18
Figura 2 –	Representação esquemática do Sistema Fibrinolítico	19
Figura 3 –	Demonstração da conversão do plasminogênio em plasmina na presença da rede de fibrina	20
Quadro 1 –	Enzimas fibrinolíticas obtidas de fungos de diferentes origens	26
Figura 4 –	Aspectos macroscópicos das colônias do gênero <i>Aspergillus</i>	30
Figura 5 –	Estrutura morfológica do gênero <i>Aspergillus</i>	31
Quadro 2 –	Métodos empregados na avaliação de pureza de enzimas fibrinolíticas	38
Figura 6 –	Efeito da temperatura sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP1279 e purificada por SDFA	69
Figura 7 –	Estabilidade da protease fibrinolítica produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP1279 e purificada por SDFA a 50°C	70
Figura 8 –	Influência do pH sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP1279 e purificada por SDFA	71
Figura 9 –	Estabilidade da protease fibrinolítica produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279 e purificada por SDFA em pH 7,0	72
Figura 10 –	Determinação da massa molecular da protease fibrinolítica de <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279 por SDS-PAGE (12%) e zimograma de fibrina	78
Figura 11 –	Viabilidade celular da protease fibrinolítica de <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279 purificada por SDFA frente as células MDA-MB-231 (preto) e J774.A1 (cinza)	80
Figura 12 –	Atividade hemolítica frente a enzima obtida pelo <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279 purificada pelo SDFA em diferentes concentrações	84
Figura 13 –	Atividade fibrinogenolítica da protease fibrinolítica obtida do <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279 em SDS-PAGE 12%	85
Figura 14 –	Degradação trombolítica <i>in vitro</i> da enzima fibrinolítica de <i>Aspergillus tamari</i> Kita UCP 1279	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeito de íons metálicos (5mM) sobre sobre a atividade proteásica da enzima fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA	73
Tabela 2 –	Efeito de inibidores na enzima fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA	74
Tabela 3 –	Efeito de surfactantes sobre a atividade da protease fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA	75
Tabela 4 –	Atividade amidolítica da enzima fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279 utilizando substratos cromogênicos típicos por 30 min de incubação	76
Tabela 5 –	Tempo de protrombina (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279	81
Tabela 6 –	Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em função da concentração da protease fibrinolítica de <i>Aspergillus tamaraii</i> Kita UCP 1279	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
BSA	Albumina bovina sérica
CAPM	Cininogênio de alto peso molecular
DCs	Doenças coronarianas
DCV	Doenças cardiovasculares
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIX	Fator 9
FVa	Fator 5 ativo
FVII	Fator 7
FVIIa	Fator 7 ativo
FVIIIa	Fator 8 ativo
FvW	Fator de Von Willebrand
FX	Fator 10
FXa	Fator 10 ativo
FXI	Fator 11
FXIa	Fator 11 ativo
FXII	Fator 12
FXIIa	Fator 12 ativo
FXIIIa	Fator 13 ativo
HEK	Células embrionárias renais
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
MDA	Adenocarcinoma Humano da glândula mamária
MMPs	Metaloproteases
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio -1
PAI-2	Inibidor do ativador de plasminogênio -2
PEG	Polietilenoglicol
pI	Ponto isoelétrico
PLG	Plasminogênio
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
SDFA	Sistemas de duas fases aquosas

SDS-PAGE	Eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio - poliacrilamida
TAFI	Inibidor fibrinolítico ativado pela trombina
TCA	Ácido tricloroacético
TF	Fator tecidual
TLCK	Tosil-L-lisina clorometil cetona
TM	Trombomodulina
TP	Tempo de protrombina
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
TPCL	Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona
TPPa	Tempo de tromboplastina parcialmente ativada
TT	Tempo de trombina
UCP	Universidade Católica de Pernambuco
uPA	Ativador de plasminogênio do tipo uroquinase
α 2-AP	α 2-antiplasmina
α 2-MG	α 2-Macroglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA	17
3.2 DOENÇAS TROMBÓTICAS	21
3.3 TERAPIA TROMBOLÍTICA	23
3.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	25
3.4.1 Enzimas fibrinolíticas obtidas de fungos	26
3.4.2 Gênero <i>Aspergillus</i>	29
3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS	33
3.5.1 Otimização de processos: Produção de proteases por <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279	34
3.5.2 Influência do pH e temperatura na atividade enzimática	35
3.5.3 Purificação de enzimas fibrinolíticas	36
3.5.4 Massa molecular e ação de inibidores e cofatores enzimáticos	39
3.5.5 Ensaios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
4 CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, CITOTÓXICA E HEMATOLÓGICA DE UMA SERINO PROTEASE COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA E FIBRINOGENOLÍTICA OBTIDA POR <i>Aspergillus tamarii</i> Kita UCP 1279	59
5 CONCLUSÃO GERAL	101
APÊNDICE A – PRODUÇÃO PUBLICADA EM PERIÓDICOS E CONGRESSOS	103
ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ETICA EM PEQUISAS (CEP)	108

1 INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis resultam em aproximadamente 41 milhões de óbitos anualmente (Polanczyk, 2020). Dentro desse grupo, as doenças cardiovasculares (DCV) são as que mais contribuem para a morbimortalidade em escala global (Nascimento *et al.*, 2022a), abrangendo uma variedade de condições, incluindo doenças coronarianas, cerebrovasculares, arteriais periféricas, cardíacas reumáticas, congênitas, hipertensão arterial e trombose venosa (Moura *et al.*, 2023). No Brasil, essas doenças são responsáveis por um terço dos óbitos, tornando-se a principal causa de morte, ultrapassando tanto os acidentes de trânsito quanto as neoplasias (Massa; Duarte; Chiavegatto Filho, 2019).

De acordo com a OMS, estima-se que até 2030 o número de pessoas afetadas por doenças cardiovasculares aumente em cerca de 10% em comparação com os dados de 2010 e que 40,3% da população possa desenvolver alguma forma de patologia relacionada às DCV (OMS, 2021). Diante disso, é importante desenvolver novas estratégias para enfrentá-las, uma vez que se tornaram uma preocupação global. Tais estratégias devem ser consideradas como uma prioridade pelas agências de saúde, com a finalidade de cumprir o Objetivo de Desenvolvimento Sustentável 3, que visa alcançar uma redução de 30% na mortalidade prematura devido a doenças não transmissíveis até 2030 (Roth *et al.*, 2020; Ahamed *et al.*, 2022).

No contexto das DCV, as doenças trombolíticas representam uma preocupação significativa para a saúde, pois podem desencadear outras condições resultantes principalmente da formação de trombos na corrente sanguínea (Deng *et al.*, 2018). A fibrina é o principal componente dos coágulos sanguíneos, formado a partir da ação da trombina sobre o fibrinogênio. Em situações desequilibradas, devido a distúrbios específicos, os coágulos não são adequadamente dissolvidos, podendo obstruir o fluxo sanguíneo normal, induzir à inflamação na parede dos vasos sanguíneos e desencadear outras condições como o infarto agudo, embolia pulmonar e trombose (Sharma *et al.*, 2020; Mancini, 2021).

Durante o período agudo da pandemia do COVID-19, foi constatado a relação entre a doença e o surgimento de trombose. Indivíduos acometidos pelo SARS-CoV2 tiveram seus sistemas venosos lesionados, principalmente na camada mais interna, denominada endotélio, e que, sem essa proteção, o sangue entra em contato com o

colágeno subendotelial que é trombogênico, ou seja, aumentando as chances de se formar um coágulo mesmo em indivíduos sem fatores de risco cardiovasculares (Klok *et al.*, 2020).

Por isso, a remoção do coágulo de fibrina é essencial para o manejo adequado das doenças trombolíticas e a farmacoterapia atual empregada no tratamento da trombose inclui agentes antiplaquetários, anticoagulantes e agentes trombolíticos (Da Silva *et al.*, 2022). Porém, o risco associado a efeitos colaterais como a probabilidade de sangramento, meias-vidas curtas, reações alérgicas, hipotensão, osteoporose, trombocitopenia e o alto custo dos medicamentos, infraestrutura e equipe multidisciplinar reduzem a adesão e aplicabilidade dessa estratégia terapêutica (Andrade; Borges, 2017; Devaraj; Rajender; Halami, 2018; D'Souza; Bhattacharya; Das, 2020).

Nesse contexto, a existência de um fármaco capaz de eliminar eficazmente coágulos sanguíneos e acelerar a recanalização vascular e reduzir os efeitos colaterais hemorrágicos é de extrema importância para o tratamento efetivo das doenças tromboticas. E assim, as enzimas fibrinolíticas emergem como uma alternativa promissora no manejo dessas condições (Bray *et al.*, 2020; Sharma; Osmolovskiy; Singh, 2021).

As terapias enzimáticas estão recebendo considerável atenção como agentes trombolíticos no cenário atual, devido à sua alta afinidade, especificidade, atividade catalítica e estabilidade com poucos efeitos adversos, reduzindo assim a toxicidade. A aplicação de enzimas trombolíticas e fibrinolíticas derivadas de microrganismos tem se destacado entre várias fontes, oferecendo uma abordagem promissora para prevenir e tratar obstruções vasculares, devido à sua relação custo-benefício favorável e capacidade de produção em larga escala e por isso, o potencial uso dessas enzimas microbianas como terapia trombolítica tem despertado grande interesse (Dean *et al.*, 2017; Taipa; Fernandes; Carvalho, 2019; Diwan *et al.*, 2021).

Diante disso, a última década presenciou um aumento significativo na identificação de agentes trombolíticos provenientes de diversos microrganismos, como bactérias (Deng *et al.*, 2018; Couto *et al.*, 2022) e fungos filamentosos, (Nascimento *et al.*, 2017; Cardoso *et al.*, 2022) que devido à diversidade química que possuem, representam a fonte primordial e economicamente viável na obtenção de enzimas fibrinolíticas (Pan *et al.*, 2019). Atualmente, as proteases fibrinolíticas produzidas por esses microrganismos têm o potencial de inibir a coagulação

sanguínea e são capazes de degradar a fibrina desempenhando um papel fundamental no tratamento das DCV (Ali; Bavisetty, 2020; Altaf; Wu; Kasim, 2021; Diwan *et al.*, 2021).

Os fungos demonstram ser uma boa fonte dessas enzimas e têm um imenso potencial biotecnológico a ser ainda explorado, incluindo a capacidade de produzir enzimas fibrinolíticas, em especial o gênero *Aspergillus* (Alencar, 2023). A utilização do *Aspergillus* na área farmacêutica é motivada pela capacidade do gênero em secretar diversos compostos químicos ativos e por isso tem atraído atenção como fonte de novos compostos bioativos (Prado *et al.*, 2017), no entanto, a utilização desse gênero na produção de enzimas fibrinolíticas ainda não é amplamente difundida com alguns relatos na literatura indicando o emprego de *Aspergillus ochraceus* (Batomunkueva; Egorov, 2001; Cardoso *et al.*, 2022) e *Aspergillus oryzae* (Flynn *et al.*, 1994).

Tendo em vista isso, o presente trabalho teve como objetivo obter proteases fibrinolíticas extraídas do fungo *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 e realizar a caracterização bioquímica, avaliação *in vitro* de aspectos da ação fibrinolítica, trombolítica, hemolítica e toxicidade, visando o desenvolvimento de um trombolítico mais seguro para o uso terapêutico, assim como, um novo produto que não apresente os efeitos colaterais conhecidos dos medicamentos trombolíticos atualmente disponíveis no mercado e que seja eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares como a trombose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação de uma enzima fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 sobre os parâmetros hematológicos e citotóxicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter a enzima fibrinolítica por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 através de fermentação estado sólido e purificada por sistema de duas fases aquosas (PEG/Fosfato de sódio);
- Determinar o perfil eletroforético da protease fibrinolítica utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE);
- Verificar a atividade fibrinolítica da enzima purificada por meio de um zimograma de fibrina;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada quanto: ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e temperatura, efeitos de inibidores, cofatores enzimáticos e agentes surfactantes;
- Avaliar a atividade citotóxica e estimar o potencial hemolítico da enzima fibrinolítica purificada;
- Analisar a influência das variáveis tempo e concentração da enzima sobre os tempos de coagulação: Tempo de Tromboplastina Parcialmente Ativada (TTPa); Tempo de Protombina (TP) e Tempo de Trombina (TT);
- Realizar a degradação trombolítica, atividade fibrinogenolítica e amidolítica da enzima purificada;
- Avaliar a influência da albumina sérica na atividade enzimática.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 REGULAÇÃO HOMEOSTÁTICA

A fisiologia humana apresenta um sistema composto por processos vasculares que desempenham um papel crucial no controle do fluxo sanguíneo. Esse sistema, conhecido como hemostasia, envolve diversas etapas mecânicas e bioquímicas destinadas a evitar a perda descontrolada de sangue e a manter a concentração sanguínea adequada. Seus componentes incluem as estruturas dos vasos sanguíneos, agentes vasoativos, plaquetas, mecanismos de tamponamento hemostático, ativação de uma cascata de coagulação e a degradação de proteínas. Esses elementos atuam em conjunto para preservar a integridade vascular e a fluidez do sangue (Rodrigues, 2012; Bonar; Lippi; Favalaro, 2017).

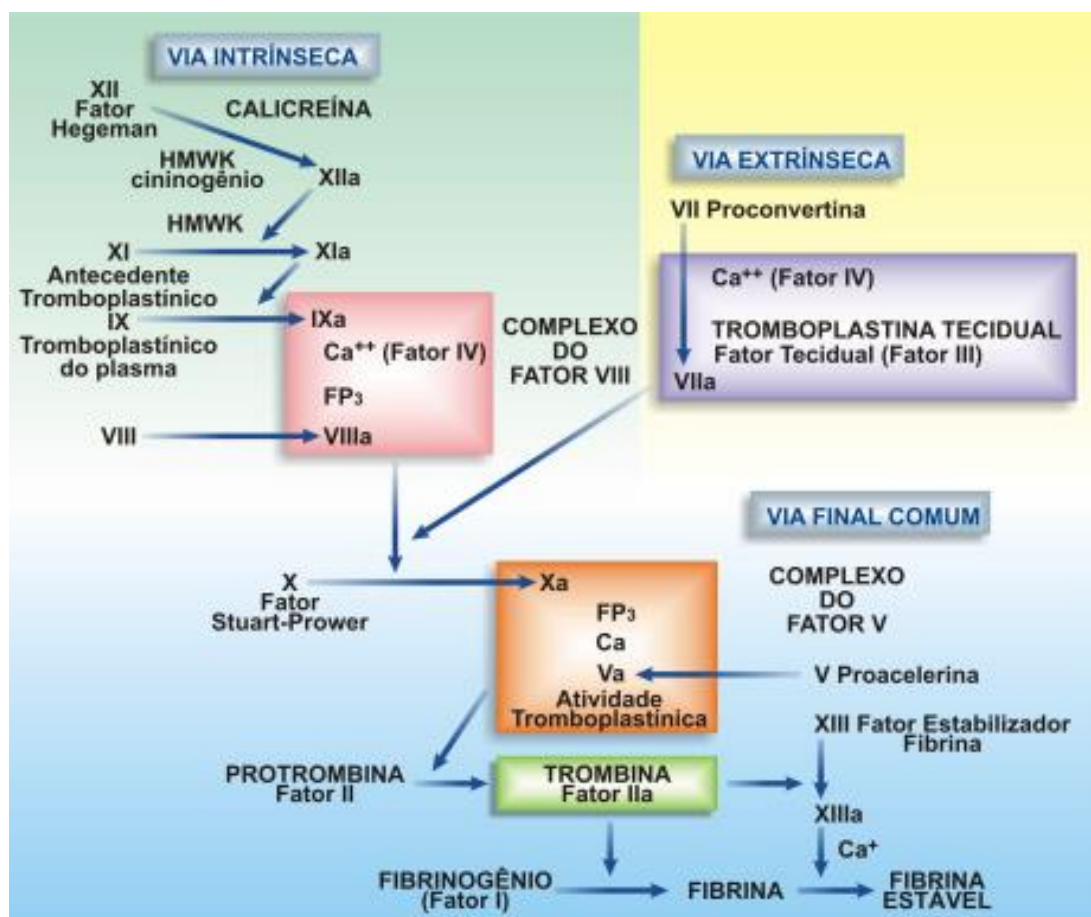
O sistema hemostático inclui a hemostasia primária (formação do tampão plaquetário), hemostasia secundária (coagulação) e hemostasia terciária (fibrinólise). Na hemostasia primária, ocorre a vasoconstrição, formação de edema, dilatação dos vasos sanguíneos da região e agregação plaquetária no local da lesão. O início desta etapa ocorre em resposta ao dano vascular, após lesão, que expõe o subendotélio ao sangue, ocorrendo um espasmo vascular ou vasoconstrição local e, assim, reduzindo o fluxo sanguíneo através do vaso, seguido pela agregação plaquetária (Kumar; Sabu, 2019).

A hemostasia secundária, geralmente chamada de cascata da coagulação (Figura 1) tem como função a formação de monômeros de fibrina estáveis que irão funcionar como uma rede que envolve o trombo, iniciando uma série de reações enzimáticas que consiste nas vias intrínseca e extrínseca. Os fatores de coagulação sanguínea, compostos principalmente por proteínas, são em sua maioria sintetizados pelo fígado e liberados na corrente sanguínea em formas inativas, exigindo a sua clivagem para expressar as diversas atividades enzimáticas (Ten Cate; Hackeng; De Frutos, 2017; Pryzdial *et al.*, 2018).

A via intrínseca inicia após a interação do fator 12 (FXII) com a superfície negativa do endotélio lesado. A molécula do cininogênio de alto peso molecular (CAPM) atua como cofator do FXIIa, que converte a pró enzima pré calicreína (PC) em calicreína. Logo, a calicreína acelera a conversão do FXII em FXIIa, sendo este capaz de se autoativar (feedback positivo). O FXIIa converte o FXI inativo à sua forma ativa. O FXIa se comporta como uma serino-protease e ativa o substrato FIX. O fator

IXa juntamente com o FVIIIa (ativado pela trombina), fosfolipídios carregados negativamente (principais constituintes da membrana celular) e íons cálcio (sintetizados por plaquetas ativadas), forma o complexo tenase intrínseco e cliva o fator X tornando-o ativo (Rodrigues *et al.*, 2012; Winter; Flax; Harris, 2017).

Figura 1: Cascata da coagulação sanguínea (hemostasia secundária).



Fonte: Rodrigues *et al.* (2012).

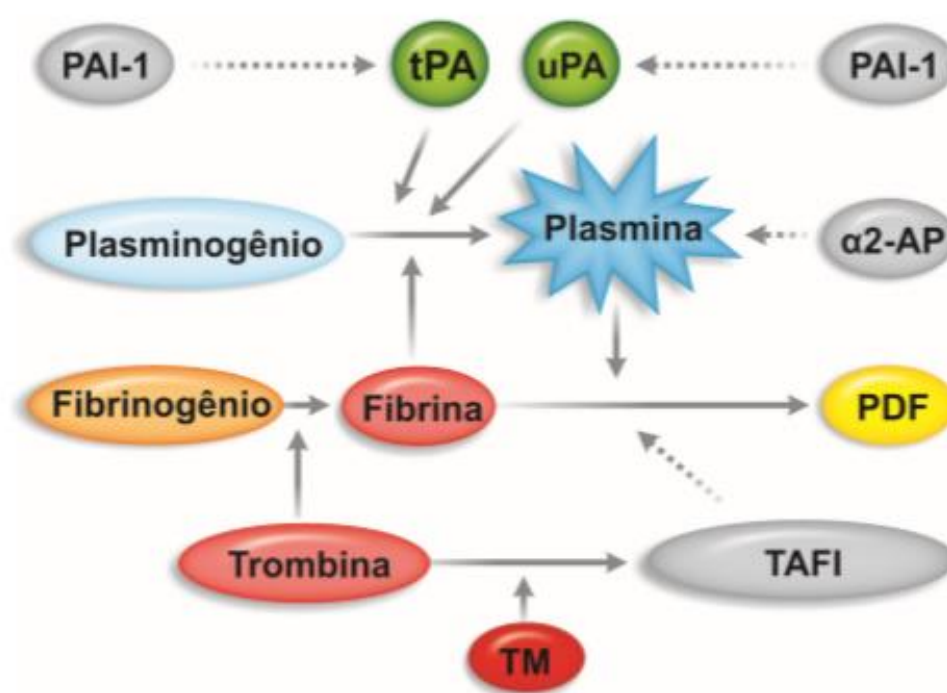
A via extrínseca é iniciada com a ligação do fator 7 (FVII) ao fator tecidual (TF). O TF é uma proteína transmembrana que é expressa nas células subendoteliais e que juntamente com íons cálcio e FVIIa (ativado pelo TF) forma o complexo tenase extrínseco. O FVII passa por autocatálise para FVII ativado (FVIIa) e o complexo FVIIa e TF convertem o Fator 10 (FX) na forma ativa. Ambas as vias convergem na “via comum” - ponto de ativação FX. Logo, o complexo protrombinase, FXa/FVa/Ca²⁺/fosfolipídios é responsável pela conversão da protrombina em trombina. A principal ação da trombina é catalisar a proteólise do fibrinogênio em monômeros de fibrina solúveis. A seguir, os monômeros de fibrina sofrem ação do

complexo trombina/FXIIIa/Ca²⁺ gerando, por fim, o coágulo de fibrina insolúvel (Rodrigues *et al.*, 2012).

A terceira e última etapa do processo hemostático é a fibrinólise. O foco da hemostasia terciária é a lise do coágulo para que ocorra a reativação do fluxo sanguíneo normal. Nessa etapa ocorre a ativação do plasminogênio circulante que será convertido em plasmina, uma serina protease, que degrada a rede de fibrina em produtos de degradação solúveis (PDS) (Vazquez-Garza *et al.*, 2017; Mukhopadhyay *et al.*, 2019).

Esse processo mediado pelo do sistema fibrinolítico (Figura 2) ocorre envolvendo várias proteínas: (1) a proenzima inativa, plasminogênio (PLG); (2) seus respectivos ativadores: o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e o ativador de Plasminogênio do tipo uroquinase (uPA); (3) os inibidores da ativação de plasminogênio: Inibidor do Ativador de Plasminogênio-1 (PAI-1) e o Inibidor do Ativador de Plasminogênio-2 (PAI-2); (4) os inibidores da plasmina: a α 2-antiplasmina (α 2-AP) e a α 2-Macroglobulina (α 2-MG) e (5) o inibidor do sistema fibrinolítico, denominado inibidor Fibrinolítico Ativado pela Trombina (TAFI) (Zago *et al.*, 2013; Chapin; Hajjar, 2015; Mukhopadhyay *et al.*, 2019).

Figura 2: Representação esquemática do Sistema Fibrinolítico.

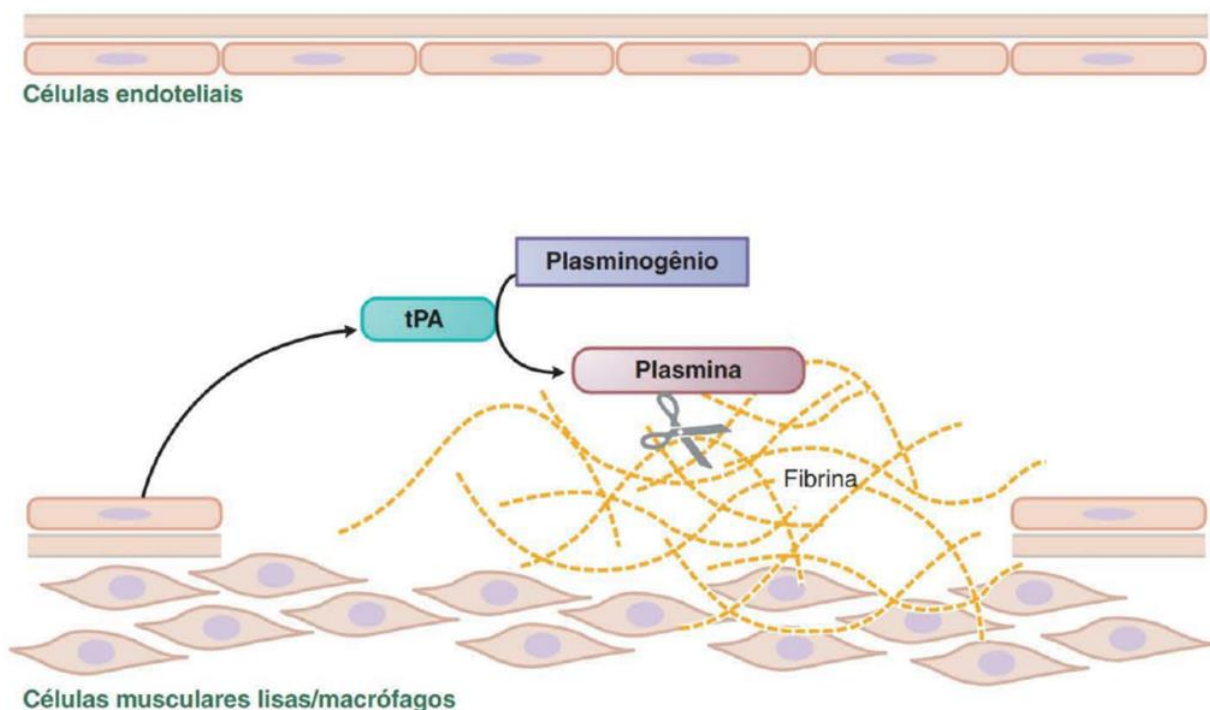


Fonte: Zago *et al.* (2013).

A fibrina, uma vez formada, atua como cofator para a conversão de PLG em plasmina através da ação do tPA (Figura 3). A estrutura da fibrina deixa exposta a porção carboxiterminal dos resíduos de lisina que propiciam sítios adicionais para a ligação de plasmina e tPA que contribuem para a propagação da fibrinólise (Rodrigues *et al.*, 2012; Zago *et al.*, 2013). Uma outra via de ativação deste processo, ocorre pela ligação do uPA que é produzido pela célula endotelial após a ativação da coagulação e converte o PLG em plasmina ativando as metaloproteases (MMPs). Essas enzimas estão envolvidas na degradação da matriz extracelular e no remodelamento tecidual (Rodrigues *et al.*, 2012).

A afinidade entre tPA e PLG é baixa na ausência de fibrina, contudo quando há formação de coágulo de fibrina essa afinidade se eleva, potencializando a ação do tPA. De forma equilibrada, a dissolução da fibrina também é regulada por proteínas inibidoras, que atuam diretamente nos ativadores de PLG, os inibidores de plasminogênio 1 (PAI -1) e inibidor de plasminogênio 2 (PAI-2), e por isso, os ativadores de plasminogênio têm uma meia-vida excessivamente curta (4 - 8 minutos) devido à presença de altas concentrações desses inibidores (Chapin; Hajjar, 2015; Pryzdial *et al.*, 2018).

Figura 3: Demonstração da conversão do plasminogênio em plasmina na presença da rede de fibrina



Fonte: Adaptado de Weitz (2019).

Existem ainda proteases inibidoras que atuam na plasmina, como a $\alpha 2$ -antiplasmina e $\alpha 2$ -macroglobulina. O sítio de ligação utilizado para $\alpha 2$ -antiplasmina e plasmina é o mesmo sítio utilizado para fibrina e plasmina. E na presença de Trombomodulina (TM), o TAFI, que é ativado pela trombina, inibe a fibrinólise através da modificação do substrato da fibrina. Assim, o TAFI elimina os resíduos C-terminais de arginina e lisina da fibrina parcialmente degradada, resultando em menor ligação e ativação do plasminogênio na superfície da fibrina, liberando dessa forma o sítio de ligação para plasmina - $\alpha 2$ - antiplasmina (Rodrigues *et al.*, 2012; Zago *et al.*, 2013).

Entretanto, alterações no processo hemostático podem resultar em complicações para o organismo, causando perda excessiva de sangue ou o desenvolvimento de doenças tromboembólicas. Existe um delicado equilíbrio entre a coagulação, que envolve a conversão de fibrinogênio em fibrina, e a fibrinólise, que consiste na dissolução proteolítica do coágulo. Um desequilíbrio na direção da prevalência da fibrinólise pode levar a sangramentos, enquanto um desequilíbrio na direção oposta, com prevalência da coagulação, pode resultar em trombose ou formação de um coágulo que pode obstruir o fluxo sanguíneo através de um vaso. (Weisel; Litvinov, 2017).

3.2 DOENÇAS TROMBÓTICAS

As doenças cardiovasculares (DCV) são um grupo de patologias que apresentam maior morbimortalidade em todo o mundo, afetando o coração e os vasos sanguíneos (Benjamin *et al.*, 2018). Segundo Oliveira e Mesquita (2021), a incidência de DCV no Brasil cresceu aproximadamente 24% entre 1990 e 2019, representando quase um terço de todas as mortes no país. Essas doenças impactam de maneira desproporcional o estrato mais vulnerável da população, que enfrenta significativas dificuldades no acesso a cuidados de saúde de alta qualidade.

Uma das complicações mais sérias é a trombose, resultante principalmente da formação de trombos na corrente sanguínea e caracterizada pela presença de pelo menos uma das três variantes conhecidas como Tríade de Virchow: lesão vascular endotelial, alterações hemodinâmicas e hipercoagulabilidade. A estagnação do fluxo sanguíneo e a lesão vascular têm o potencial de desencadear trombose, pois estão intimamente associadas com a hemostasia secundária. (Prehl *et al.*, 2018; Ketfi *et al.*, 2021).

A não dissolução de trombos formado durante o funcionamento do sistema hemostático podem atrapalhar o fluxo normal de sangue e provocar inflamação na parede dos vasos sanguíneos. Por isso, a trombose é considerada um grave caso de saúde pública devido à sua alta incidência e por altos gastos gerados aos cofres públicos referidos aos tratamentos, intervenções cirúrgicas, exames e internações hospitalares (Kawecki; Lenting, Denis, 2017; Mancini, 2021).

Um quadro de trombose pode ser assintomático ou apresentar rubor, dor, inchaço, endurecimento da pele, mudança na cor da pele para vermelha ou roxa e aumento da temperatura no local onde está o trombo. No organismo, os coágulos podem desprender-se da parede vascular e flutuar no sangue. Esses trombos flutuantes livres podem alojar em qualquer parte do sistema cardiovascular, incluindo pulmões e cérebro (Kotb, 2012; Chandrasekaran *et al.*, 2015).

As doenças coronarianas (DCs) representam a principal causa de mortes em todo o mundo, levando cerca de 17,9 milhões de vidas a cada ano. Elas são o resultado da obstrução das artérias coronárias, sendo a formação do coágulo sanguíneo uma das principais causas dessas patologias. O comprometimento do fluxo sanguíneo pode causar um grupo de distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos e incluem manifestações clínicas que envolvem isquemia silenciosa ou do miocárdio, angina de peito, síndromes coronarianas agudas e morte súbita (WHO, 2020; Viana *et al.*, 2021)

A trombose pode ocorrer em qualquer parte do corpo, no coração, coágulos sanguíneos causam bloqueio do fluxo sanguíneo do tecido muscular. Se o fluxo estiver bloqueado, o suprimento de oxigênio para esse tecido é interrompido e isso pode resultar em angina e infarto do miocárdio. No cérebro, os coágulos também impedem que o sangue e o oxigênio alcancem áreas necessárias, que podem resultar em acidente vascular cerebral (AVC) (Kotb, 2012; Chandrasekaran *et al.*, 2015; Weyand, Shavi; Ginsburg, 2023).

Além disso, estudos anteriores mostraram que pacientes com Covid-19 estão predispostos a eventos trombembólicos, tanto venosos quanto arteriais, com trombembolismo periférico e pulmonar, acidente vascular encefálico (AVE), infarto agudo do miocárdio e isquemia aguda de membros inferiores. É provável que a infecção viral e a resposta inflamatória sejam as protagonistas na ativação da cascata de coagulação como causa da trombose coronariana mesmo em indivíduos sem fatores de risco cardiovasculares (Koralnik; Tyler, 2020; Zhai *et al.*, 2020).

Sendo assim, a remoção do coágulo de fibrina é essencial para o manejo adequado das doenças trombolíticas. Para o tratamento da trombose existem vários fármacos já disponíveis no mercado sendo eles os anticoagulantes, que é a base do tratamento para a maioria dos pacientes, utilizando heparina ou a varfarina; os antiagregantes plaquetários, que atuam na prevenção e tratamento da trombose, como ácido acetilsalicílico, clopidogrel e dipiridamol; o uso de agentes fibrinolíticos que vão degradar a fibrina através da ativação de plasmina, e procedimentos cirúrgicos (Kumar; Sabu, 2019; Weitz, 2019; Karametou *et al.*, 2021).

Ressalta-se que o tratamento da trombose é individualizado e mesmo após terapia apropriada, existe um alto índice de recorrência, que pode causar complicações graves. A abordagem terapêutica inicial para a trombose tem por objetivo a estabilidade clínica e hemodinâmica. Dessa forma, é fundamental que a terapia medicamentosa seja administrada de forma precoce nos pacientes visando à prevenção de recorrência de eventos trombóticos (Goktay; Senturk, 2017; Lutsey; Zakai, 2023).

3.3 TERAPIA TROMBOLÍTICA

Dentre as opções disponíveis para o tratamento imediato nos eventos trombolíticos, os agentes fibrinolíticos são os medicamentos empregados para reestabelecer o fluxo sanguíneo antes que danos maiores afete o paciente (Wardlaw *et al.*, 2014). A descoberta da estreptoquinase expandiu o caminho para o desenvolvimento da terapia trombolítica, sendo esse medicamento ainda considerado uma droga de alto prodígio desde a sua descoberta e é a primeira escolha na maioria dos países em desenvolvimento. A principal vantagem do tratamento utilizando enzimas fibrinolíticas sobre anticoagulantes e antiplaquetários é que elas podem atuar diretamente sobre o coágulo existente (Kumar; Sabu, 2019).

Baseado em seus diferentes mecanismos de ação, os agentes fibrinolíticos são classificados em dois tipos. Os de primeira categoria são os ativadores de plasminogênio, que convertem plasminogênio em plasmina e esta cliva o coágulo de fibrina formado, como o ativador de plasminogênio tecidual (tPA), estreptoquinase e uroquinase. Eles são amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares. Já a segunda categoria, são enzimas semelhantes à plasmina que degradam diretamente a fibrina dissolvendo os trombos completamente, sem

necessidade da ativação do plasminogênio, por exemplo: plasmina, nattoquinase e lumbroquinase (Kotb, 2012, 2013; Baruzzi; Stefanini; Manzo, 2018).

Ainda, os ativadores de plasminogênio são classificados em três categorias: ativadores de plasminogênio de primeira, segunda e terceira geração. Os de primeira geração (estreptoquinase e uroquinase) apresentaram menos especificidade pela fibrina e causam complicações hemorrágicas. A segunda geração foi desenvolvida com ajuda da engenharia genética para aumentar a especificidade pela fibrina reduzindo as complicações hemorrágicas. Embora tenham reduzido as complicações que existiam nos ativadores de plasminogênio de primeira geração, eles ainda possuem risco de sangramento. E a terceira geração de ativadores de plasminogênio são principalmente variantes geneticamente modificadas de tPA (exceto estafilocinase e desmoteplase) para obter propriedades superiores como a seletividade para fibrina, aumento do tempo de meia-vida e prolongamento da depuração renal (Kumar; Sabu, 2019).

Apesar das pesquisas sobre os ativadores de plasminogênio terem resultado em melhorias significativas a essas enzimas e na sua ampla utilização, os altos preços, os efeitos adversos, a necessidade de fazer combinações com outros medicamentos e a baixa especificidade são alguns motivos que fazem com que novos estudos sejam desenvolvidos com o objetivo de descobrir novos princípios ativos que possam atuar com mais eficiência no tratamento de doenças tromboembólicas, (Chandramohan *et al.*, 2019).

A introdução de enzimas fibrinolíticas como novos fármacos para o tratamento da trombose é uma abordagem promissora, e tem sido estudada visando identificar alvos específicos envolvidos no processo de formação de coágulos sanguíneos, como proteínas e enzimas, para obter medicamentos que atuem de forma mais direcionada e eficaz na prevenção e dissolução dos coágulos. Essas enzimas podem ser utilizadas para recanalizar rapidamente um vaso sanguíneo obstruído por um trombo, restaurando o fluxo sanguíneo normal e prevenindo complicações sérias causadas pela trombose, como o infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral (Kotb, 2012, 2013; Kumar; Sabu, 2019; Cardoso *et al.*, 2023).

3.4 FONTES DE ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

Diversas fontes de enzimas fibrinolíticas são reconhecidas, abrangendo animais como insetos (Wang *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2015), minhocas (Verma; Pulicherla, 2017; Yeon *et al.*, 2017), cobras (Cintra *et al.*, 2012) e poliquetas (Deng *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Essas proteases também foram encontradas em plantas (Kim *et al.*, 2015; Da Silva *et al.*, 2020; Hamed *et al.*, 2020), algas (Silva *et al.*, 2018; Barros *et al.*, 2020), veneno de cobra (Kim *et al.*, 2014) e cogumelos comestíveis ou medicinais (Choi *et al.*, 2011; Choi; Kim; Kim, 2018). Adicionalmente, outras fontes de enzimas fibrinolíticas bastantes estudadas nos últimos anos foram extraídas de microrganismos, como fungos e bactérias (Batista *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2018; Couto *et al.*, 2022).

Em especial, essas enzimas derivadas de microrganismos têm despertado interesse significativo devido às seguintes vantagens: (i) produção econômica, (ii) viabilidade de cultivo em larga escala, (iii) menor ou nulo efeito colateral, (iv) ampla diversidade bioquímica, (v) alta especificidade ao substrato e (iv) capacidade de manipulação genética (Diwan *et al.*, 2021, Rajaselvam *et al.*, 2021).

Devido à diversidade química encontrada em fontes microbianas, eles representam a fonte primordial e economicamente viável na obtenção de enzimas fibrinolíticas. Dentre eles, destacam-se a estreptoquinase e a estafiloquinase, isoladas de *Streptococcus hemolyticus* e *Streptococcus aureus*, respectivamente, as quais demonstraram eficácia na terapia trombolítica (Collen; Lijnen, 1994). Consequentemente, diversos microrganismos, como bactérias, fungos e até mesmo algas, têm sido explorados para o isolamento de enzimas fibrinolíticas (Pan *et al.*, 2019; Ali; Bavisetty, 2020).

Destaca-se também que, devido a considerações éticas relacionadas à manipulação de animais, preocupações com distúrbios climáticos nas plantações e os custos elevados associados à produção de proteases fibrinolíticas a partir dessas fontes, a utilização de microrganismos tem se mostrado uma alternativa bastante atrativa (Gurumallesh *et al.*, 2019; Da Silva *et al.*, 2019).

No entanto, Peng *et al.* (2003), afirma que a produção dessas proteases por microrganismos ainda enfrenta desafios significativos devido aos custos associados ao processo de produção industrial, representando um dos principais obstáculos para sua aplicação. Por isso, diversas estratégias laboratoriais vêm sendo exploradas para aprimorar a produção enzimática, abrangendo a escolha de meios de cultura ideais,

otimização estatística das condições ambientais e experimentais, superexpressão de cepas geneticamente modificadas para uma produção estável e de alto rendimento e a identificação de novas fontes eficazes da protease fibrinolítica (Sharma *et al.*, 2020).

Desde então, uma série de enzimas fibrinolíticas oriundas de microrganismos, têm sido sucessivamente identificadas (Altaf; Wu; Kasim, 2021). Dentre eles, destacam-se os fungos, especialmente os filamentosos, pois têm a capacidade considerável de produzir enzimas fibrinolíticas. Alguns gêneros conhecidos por essa produção incluem *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Rhizopus* sp. (Kotb, 2013; Meshram *et al.*, 2017).

3.4.1 Enzimas fibrinolíticas obtidas de fungos

Proteases com atividade fibrinolítica obtidas a partir da fermentação de fungos (Quadro 1) apresentam vantagens, pois os microrganismos possuem uma distribuição cosmopolita, custo de produção relativamente menor e facilidade de produção em larga escala (Chen *et al.*, 2016).

Numa revisão sistemática realizada por Cardoso *et al.* (2022), foi relatado a utilização de diversos gêneros na produção de enzimas fibrinolíticas, como o *Agrocybe*, *Aspergillus*, *Auricularia*, *Cordyceps*, *Ganoderma*, *Hericium*, *Lyophyllum*, *Mucor*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Pleurotus*, *Rhizopus* e *Xylaria*. Verificou-se que a maioria dos fungos utilizados na produção dessas enzimas pertencem ao filo Ascomycota, que possuem fungos filamentosos caracterizados por rápido crescimento e produção abundante de esporos (Zabell; Morell, 2020).

Quadro 1: Enzimas fibrinolíticas obtidas de fungos de diferentes origens.

Microrganismos	Fonte	Nome da enzima	Referências
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	Isolado de solo da Caatinga do sertão Pernambucano - Brasil	Protease	Silva <i>et al.</i> (2019)
<i>Cordyceps militaris</i>	N/D	Serina protease	Liu <i>et al.</i> (2017)
<i>Xylaria curta</i>	Caule da planta: <i>Catharanthus roseus</i>	Protease	Kim <i>et al.</i> (2011); Meshram <i>et al.</i> (2017)

<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	Isolado de solo da Caatinga do sertão Pernambucano - Brasil	Protease	Nascimento <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus japonicum</i> KSS 05	Solo	N/D	Shukor <i>et al.</i> (2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Centro de coleta de cultura microbiológica	Metaloendopeptidases	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Coprinus comatus</i> YY-20	N/D	N/D	Liu, Zheng e Zhang (2012)
<i>Cordyceps militaris</i>	N/D	Serina metaloprotease semelhante à quimotripsina	Choi <i>et al.</i> (2011)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	Solo	Protease fibrinolítica	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Xylaria curta</i>	Galhos de <i>Cathranthus roseus</i>	Xilarinase: metaloprotease	Meshram, Saxena e Paul (2016)
<i>Endophytic Fungi</i>	Folhas de hibisco	Protease	Ahmad, Noor e Ariffin (2014)
<i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> and <i>Mucor</i>	Solo alcalino	Protease	Palanivel, Ashokkumar e Balagurunathan (2013)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> AUMC 9735	Produtos lácteos, carnes, soja em pó, amostras de solo e água	Metaloprotease	Kotb, Helal e Edries (2015)
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Coleção de cultura do Banco de DNA de Cogumelos	Protease fibrinolítica entomopatogênica de <i>Paecilomyces tenuipes</i> : PTEFP	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>Bionectria</i> sp.	Floresta tropical de Las Yungas	Serina proteases	Rovati <i>et al.</i> (2010)

Legenda: N/D – Não descrito

Fonte: (Altaf; Wu; Kasim, 2021).

Os fungos filamentosos são conhecidos como excelentes produtores de enzimas, sendo relatados principalmente pela alta produção de proteases (Souza *et al.*, 2015). Outras vantagens descritas sobre sua aplicação levam em consideração questões logísticas e financeiras, pois a produção de proteases por fungos filamentosos se beneficia de sua secreção extracelular, facilitando a extração e purificação já que não há necessidade de lise celular, reduzindo etapas no processo de obtenção dessas biomoléculas (Martinez-Medina *et al.*, 2019; Batista *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que o uso de fungos em geral tem vantagens relacionadas à fermentação sob diversas condições ambientais, como pH, temperatura, luz e variedade de substratos que podem ser utilizados como nutrientes (Haq *et al.*, 2004). Em geral, essas enzimas são produzidas por fermentação em estado sólido ou submersa utilizando meio enriquecido com fontes de carbono como: celulose, dextrana, dextrose (glicose), frutose, amido, maltose, ribose, sacarose, galactose e trealose e fontes de nitrogênio: extrato de levedura, peptona, gelatina, ureia, caseína, triptona e farelo de soja e a adição de sais inorgânicos como o cloreto de amônio, dihidrogenofosfato de sódio, sulfato de amônio, sulfato ferroso, nitrato de potássio, cloreto de cálcio, sulfato ferroso e hidrogenofosfato dissódico (Diwan *et al.*, 2021)

Resíduos agroindustriais, resíduos de pesca e águas residuais podem ser utilizados para a produção de enzimas fibrinolíticas. O substrato sólido fornece nutrientes essenciais tanto para o crescimento de microrganismos, como os fungos, quanto para a produção de enzimas (Vijayaraghavan *et al.*, 2016). Uma grande variedade de resíduos agrícolas, como casca de amendoim (Salihu *et al.*, 2013), casca de grama verde (Prakasham; Rao; Sarma, 2006) casca de maracujá, sabugo de milho (Wu *et al.*, 2019), casca de mandioca, soja (Silva *et al.*, 2016), farelo de trigo (Nascimento *et al.*, 2015) são efetivamente utilizados para a produção de enzimas.

Um dos grandes desafios no processo produtivo dessas biomoléculas é a redução do custo do processo produtivo que irá interferir diretamente no valor do produto. A utilização desses substratos se mostra eficiente para a produção de enzimas fibrinolíticas que podem degradar o coágulo de fibrina e tornar-se um agente trombolítico eficaz. Dessa forma, o uso de biomassa residual não apenas produz proteases fibrinolíticas econômicas e eficientes, como também irá contribuir para a diminuição das possibilidades de poluição ambiental (Ghaly *et al.*, 2013; Raol *et al.*, 2015).

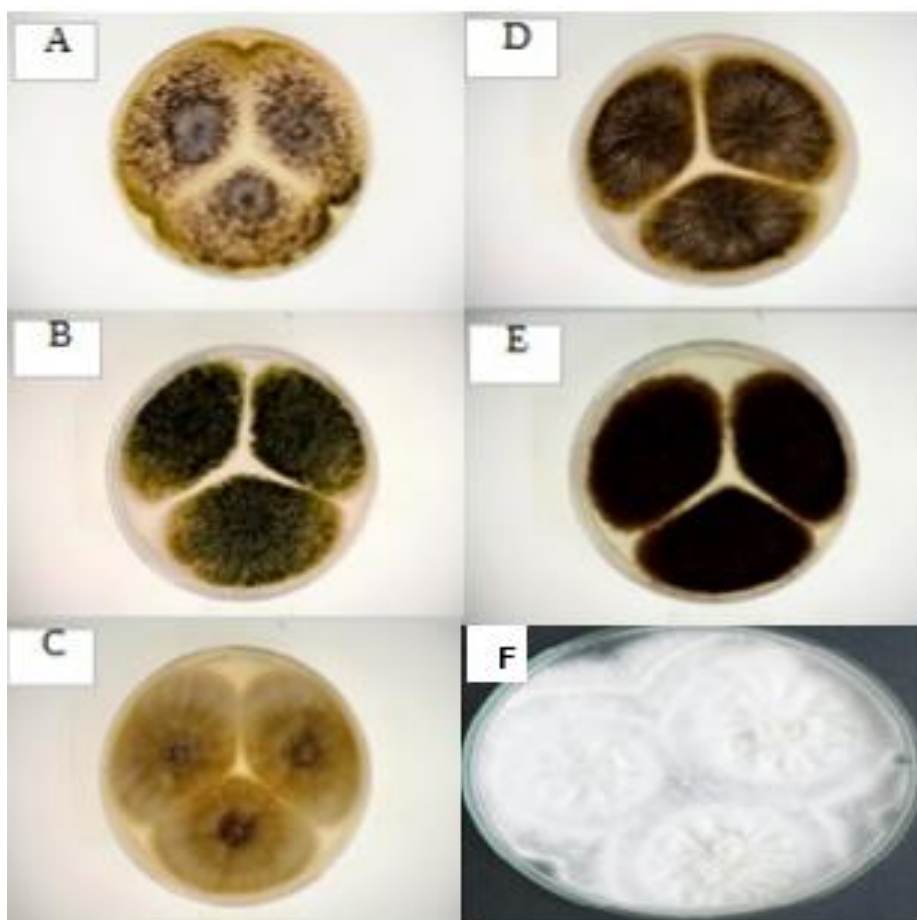
3.4.2 Gênero *Aspergillus*

As espécies que compõem este gênero são fungos filamentosos descritos como cosmopolitas e saprófitos, que pertencem à família *Trichocomaceae*, ordem *Eurotiales*, subclasse *Eurotiomycetidae*, classe *Eurotiomycetes* e filo *Ascomycota*. Compreende mais de 260 espécies e são classificados como um dos microrganismos mais abundantes, mundialmente distribuídos, podendo ser isolados do solo, ar, água, alimentos, plantas, material em decomposição e superfícies (Klich, 2002; Lacaz *et al.*, 2002; Samson *et al.*, 2014).

A designação do gênero, atribuída pelo sacerdote e botânico Antonio Micheli, é derivada da semelhança entre a estrutura reprodutiva assexual, conhecida como conidióforo, e o aspersório, um instrumento utilizado para dispersar água benta durante certos rituais litúrgicos cristãos (Kousha; Tadi; Soubani, 2011; Gibbons, Rokas, 2012; Ergene *et al.*, 2013).

As colônias desses micro-organismos, geralmente têm crescimento rápido e inicialmente apresentam-se com colorações branca, amarela, amarelo-esverdeada, amarronzada, preta ou verde (Figura 4). A cor e o diâmetro da colônia são as principais características macroscópicas utilizadas para classificar as espécies deste gênero (Ward *et al.*, 2006; Samson; Varga, 2009; Da Silva *et al.*, 2015; Mesquita-Rocha, 2019). Outras características morfológicas usadas na identificação de espécies são a produção de exudatos e pigmentos solúveis, taxa de crescimento, termotolerância e a presença de esclerócio ou clestotécio. As características morfológicas dos esclerócios, como cor, forma e tamanho, também são consideradas na identificação das espécies (Klich, 2002).

Figura 4: Aspectos macroscópicos das colônias do gênero *Aspergillus*.



Legenda: A - *Aspergillus flavus*, B - *Aspergillus parasiticus*, C - *Aspergillus oryzae*, D - *Aspergillus sojae*, E - *Aspergillus tamarii* e F - *Aspergillus caveniger*

Fonte: Adaptado de Da Silva *et al.* (2015)

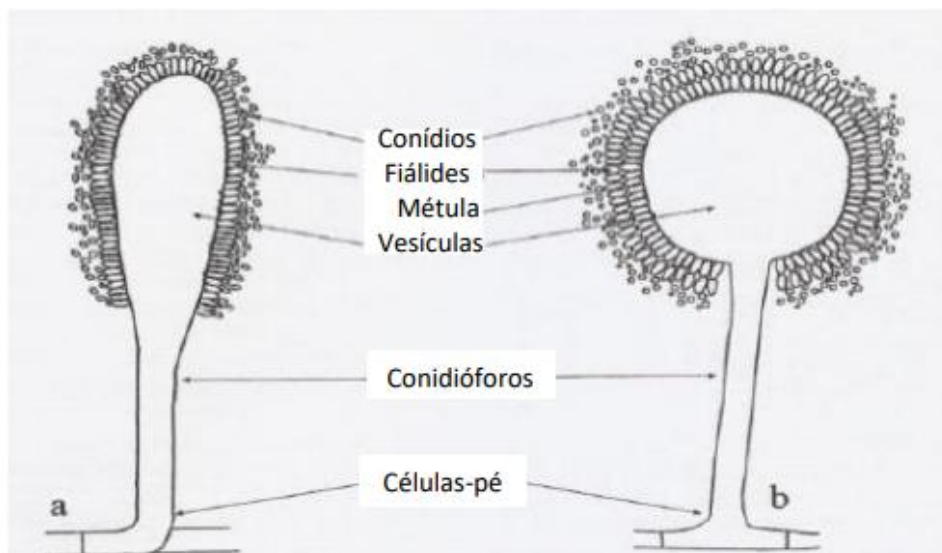
Sua reprodução é assexuada e caracteriza-se pela produção de fiálides e conídios em cadeia. O conidióforo de *Aspergillus* é simples, usualmente asseptado e termina numa vesícula, onde estão inseridas as fiálides. Algumas espécies podem produzir células Hülle ou esclerócios (Klich, 2002) e esporulam abundantemente, dispersando os conídios no ambiente (Ergene *et al.*, 2013; Askew; Kontoyiannis; Clemons, 2014).

Do ponto de vista microscópico, o gênero é distintivo por exibir a base do conidióforo em configuração de "T" ou "L", conectada à hifa vegetativa. Essa estrutura é frequentemente chamada de "célula pé", e quando observada por taxonomistas, permite rápida identificação como pertencente ao gênero *Aspergillus* (Mata-Gomez *et al.*, 2009). A Figura 5 ilustra a estrutura morfológica básica do gênero.

A forma, tamanho e ornamentação dos conídios também podem auxiliar na identificação de isolados, no entanto, técnicas moleculares e bioquímicas são mais

precisas. A revisão taxonômica provida pela genômica do gênero tem influenciado dramaticamente a concepção e aplicação de técnicas moleculares para identificar espécies clinicamente importantes, auxiliando também na identificação de novas espécies de interesse médico (Pitt; Samsom, 2007; Gibbons; Rokas, 2012).

Figura 5: Estrutura morfológica do gênero *Aspergillus*.



Fonte: Adaptado de Klich (2002)

O filo Ascomycota, ao qual está inserido o gênero *Aspergillus* têm sido cada vez mais estudados principalmente devido ao seu potencial na produção de enzimas. Os ascomicetos são fungos filamentosos que atuam na decomposição da matéria orgânica através da hidrólise das macromoléculas pelas exoenzimas que secretam. Dentre estas enzimas encontram-se as amilases, celulasas, collagenases, fitases, lipases, pectinases, proteases, tanases e xilanases (Putzke; Putzke, 2004; Cruz *et al.*, 2011; Reinehr *et al.*, 2014; Nascimento *et al.*, 2019; Alencar *et al.*, 2021 Albuquerque *et al.*, 2021; Costa *et al.*, 2023).

Além disso, por serem ubíquas e sapróbios, as espécies de *Aspergillus* desempenham um papel significativo na reciclagem global do carbono e nitrogênio. Embora o seu nicho ecológico primário seja o solo ou matéria vegetal em decomposição, os pequenos conídios hidrofóbicos se dispersam facilmente no ar e podem sobreviver a uma ampla gama de condições ambientais (Dagenais; Keller, 2009; Kousha; Tadi; Soubani, 2011).

Dessa forma, os representantes desse gênero promovem um enorme impacto sobre a humanidade, sendo o principal dentre os fungos com diversas aplicações industriais, destacando-se como excelentes produtores de metabólitos primários e

secundários, produzindo muitas enzimas extracelulares e, muitas delas aplicadas na biotecnologia para degradar produtos e compostos (Maldonato; Macedo; Rodrigues, 2014).

Dentre as espécies produtoras de enzimas comercialmente importantes encontram-se: *Aspergillus tamarii*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. oryzae*, *A. heteromorphus*, *A. sydowii*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *A. glaucus* e o *A. versicolor* (Schuster *et al.*, 2002; Soares *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2017; Batista *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2020; Fernandes *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2022b).

Outras espécies, por sua vez, atuam como patógenos de plantas e animais, são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos, como micotoxinas, dentre estas a altamente tóxica aflatoxina, destacando-se como patogênicas para humanos, o *A. fumigatus* e o *A. flavus*, pois são oportunistas e causam doenças (González *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2014).

Segundo Prado *et al.* (2017), a utilização do *Aspergillus* na área farmacêutica é motivada pela habilidade do gênero em secretar diversos compostos químicos ativos. Esses compostos englobam antibióticos, micotoxinas, imunossupressores e agentes redutores de colesterol. O *Aspergillus terreus*, por exemplo, é responsável pela produção da lovastatina, um agente redutor de colesterol. Já o *A. alliaceus*, *A. nidulans* e *A. fumigatus* sintetizam Asperlicina, Equinocandina B e Fumagilina, respectivamente, que são empregados como antifúngicos, inibidores da angiogênese e agentes antiparasitários (Oliveira *et al.*, 2020).

A literatura mostra que espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem atraído atenção como fonte de novos compostos bioativos, no entanto, a utilização desse gênero na produção de enzimas fibrinolíticas ainda não é amplamente difundida, com alguns relatos na literatura indicando o emprego de *Aspergillus ochraceus* (Batomunkueva; Egorov, 2001; Cardoso *et al.*, 2022) e *Aspergillus oryzae* (Flynn *et al.*, 1994).

O *Aspergillus tamarii* é membro da seção *Flavi* de *Aspergillus*, que inclui espécies importantes economicamente utilizadas no processo de fermentação de alimentos em alguns países asiáticos e aplicados na indústria para produção de enzimas. Embora *A. tamarii* seja capaz de produzir vários metabólitos secundários tóxicos, incluindo ácido ciclopiazônico e fumigaclavinas, raramente foi encontrado como patógeno humano (Anandan; Marmer; Dudley, 2007; Kredics *et al.*, 2007).

Cepas de *Aspergillus tamarii*, são considerados seguros pela Food and Drug Administration (FDA) em razão da não-toxicidade da espécie, possibilitando o seu uso em diversas aplicações biotecnológicas (Silva *et al.*, 2016; Bakker, 2017).

Diversos estudos têm sido descritos para a espécie *A. tamarii*, envolvendo a produção de proteases (Silva *et al.*, 2016, 2017; Silva; Alves; Porto, 2018; Siqueira *et al.*, 2020, Santos *et al.*, 2020). Ainda, Amaral *et al.*, (2020), Batista *et al.*, (2020) e Alves *et al.*, (2022), realizaram estudos com a cepa *Aspergillus tamarii* UCP 1279 isolada do solo Caatinga no estado de Pernambuco, verificando também a produção e extração de proteases, no entanto, nenhum desses estudos citados investigaram o potencial fibrinolítico e trombolítico dessas enzimas.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS

A eficácia do processo de catálise enzimática é influenciada por fatores como a natureza do meio, substrato, concentração da enzima, temperatura, pH e presença de ativadores e inibidores. As enzimas são catalisadores altamente eficazes promovendo acelerações significativas nas taxas de reação, apresentando alta especificidade e são amplamente empregadas nas indústrias, pesquisas científicas e diagnósticos clínicos (Arcus; Mulholland, 2020).

Algumas enzimas fibrinolíticas se destacam devido à sua capacidade de exibir parâmetros de atividade e estabilidade em conformidade com o organismo humano. Assim, a realização da caracterização físico-química dessas enzimas é de grande interesse, pois permite delineamento da melhor forma farmacêutica a ser produzida, monitoração de eventualidades nas formulações e correlação dessas propriedades com a forma farmacêutica mais apropriada (Moura *et al.*, 2023).

Dentre essas propriedades físico-químicas sobre a molécula, a solubilidade, estabilidade, perfil cristalino e amorfo, peso molecular, pKa, pH e ponto de fusão ou ebulição, por exemplo, são os requisitos a serem avaliados anteriormente à formulação de um medicamento (Hurst *et al.*, 2007).

A crescente demanda da indústria biofarmacêutica impõe a necessidade simultânea de garantir a pureza das biomoléculas e determinar suas características bioquímicas. No contexto das enzimas fibrinolíticas, especialmente quando se visa uma possível aplicação terapêutica, tais características estão relacionadas a fatores que impactam na atividade enzimática, tais como pH, temperatura, estabilidade,

cofatores enzimáticos, inibidores, entre outros (Barros, 2018).

Segundo Pradillo *et al.* (2022), além da análise bioquímica das enzimas, os testes de caracterização funcional *in vitro* oferecem uma compreensão detalhada do mecanismo de ação das enzimas, assim como da sua potencial toxicidade farmacológica antes de avaliar a eficácia de um candidato a fármaco. Assim, coletar informações substanciais em testes *in vitro* é essencial, pois nesses ambientes controlados, cada processo biológico pode ser estudado de forma isolada.

3.5.1 Otimização de processos: Produção de proteases por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279

Diversos estudos foram realizados buscando otimizar as condições de produção de enzimas fibrinolíticas para aumentar seu rendimento usando diferentes métodos de fermentação, incluindo fermentação em estado sólido, submersa e extrativa (Silva; Alves; Porto, 2018; Al Farraj *et al.*, 2020 ; Che *et al.*, 2020; Alencar *et al.*, 2021), bem como, mutagênese (Naveena *et al.*, 2012; Raju; Divakar, 2013), recombinação (Che *et al.*, 2020), abordagens estatísticas (Chandramohan *et al.*, 2019; Joji; Santhiagu; Salim, 2019) e técnicas de clonagem genética (Nguimbi *et al.*, 2014).

O uso de diferentes ferramentas estatísticas, como metodologia de superfície de respostas (Vijayaraghavan *et al.*, 2017), central composto (Nascimento *et al.*, 2016) design Box-Benhken (Kumar; Haridas; Sabu, 2018), planejamento fatorial completo de dois níveis (Da Silva *et al.*, 2020; Couto *et al.*, 2022), rede neural artificial (Chandramohan, *et al.*, 2019 ; Joji; Santhiagu; Salim, 2019) e experimento ortogonal (Wu *et al.*, 2019), foram relatados para otimizar a concentração dos componentes do meio usado na fermentação para obtenção de enzimas fibrinolíticas, a fim de aumentar seu rendimento de produção e a atividade específica dessas proteases.

A produção proteases a partir do *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 foi realizada por Ferreira *et al.*, (2020). Em seu estudo foi utilizado a fermentação submersa e diferentes fontes de nitrogênio (resíduos agroindustriais) em um planejamento fatorial 2² para produção de proteases por esse microrganismo. Os resultados indicaram que o fungo *A. tamaraii* Kita UCP 1279 é produtor de proteases e o tipo de substrato pode influenciar diretamente na obtenção dessas biomoléculas. Os dados obtidos demonstram a importância de utilizar ferramentas estatísticas para selecionar condições que favoreçam a produção de proteases ou biomoléculas de interesse biotecnológico.

Além de otimizar a condição de fermentação, a clonagem genética, a mutagênese e a tecnologia de recombinação de DNA também têm sido utilizadas para aumentar a produção de enzimas fibrinolíticas (Yao; Kim; Kim, 2018; Che *et al.*, 2020). De acordo com as técnicas empregadas no bioprocesso, a demanda por tempo e verba podem se tornar altas, por isso é contínuo a busca por procedimentos que diminuam tais problemáticas (Iqbal *et al.*, 2016).

Utilizando a cepa de *A. tamarii* Kita UCP1279, Alencar *et al.*, (2020) realizou a partição de proteases fibrinolíticas através do sistema de duas fases aquosas PEG-Fosfato. Nesse estudo, essa enzima fibrinolítica demonstrou uma maior interação com a fase sal e o sistema proposto apresentou um bom fator de purificação na separação da biomolécula, se mostrando um excelente método para ser aplicado em etapas de purificação desta enzima. Os autores demonstraram a influência das variáveis no coeficiente de partição (K) da extração das proteases fibrinolíticas utilizando um planejamento fatorial 2^4 , comprovando a eficiência da otimização e do método de purificação escolhido.

Já Amaral *et al.* (2020), realizou a extração e um particionamento termodinâmico da protease de *A. tamarii* Kita UCP 1279, através de sistemas aquosos bifásicos de PEG-Citrato mediante um planejamento fatorial 2^4 . Nesse estudo, o sistema foi capaz de pré-purificar a protease e obteve 84% de rendimento de atividade. Ainda, em uma fermentação extrativa integrada (Alves *et al.*, 2022) no processo de produção de protease por *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279, os parâmetros cinéticos foram estimados e a protease apresentou características desejáveis que possibilitam futuras aplicações industriais.

3.5.2 Influência do pH e temperatura na atividade enzimática

Para que os fármacos atuem em seu alvo terapêutico, necessitam de condições ideais, sendo, por exemplo, necessário que o potencial hidrogeniônico (pH) esteja favorável para interações intermoleculares em seu alvo terapêutico (Nelson; Cox, 2019). Uma das vantagens fisiológicas das enzimas trombolíticas derivadas de microrganismos é a sua estabilidade em uma ampla faixa de valores de pH (5–11) e temperaturas (30–70°C) (Leedagger *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2015).

As atividades ótimas demonstradas por enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos são promissoras devido à sua afinidade com as condições fisiológicas de pH e temperatura. As enzimas provenientes de *Neurospora sitophila* e *Pleurotus*

ostreatus são estáveis em pH semelhante ao sanguíneo, situando-se em torno de 7.4 (Liu *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2018), caracterizando um ambiente levemente alcalino. Essa semelhança com o pH sanguíneo assemelha-se à plasmina humana, ao ativador de plasminogênio tecidual e à uroquinase (Sun *et al.*, 2016). Ademais, outras enzimas, como as obtidas de *Neurospora sitophila* (pH 7.6), *Cordyceps militaris* (pH 7.2) e *Agrocybe aegerita* (pH 7.6) também apresentam seu pH de máxima atividade próximo ao fisiológico sanguíneo (Lan Liu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021).

Ao revisar a literatura para analisar a temperatura ótima de atividade das enzimas fibrinolíticas derivadas de fungos, constatou-se que as enzimas produzidas por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (37°C), *Xylaria curta* (35°C), *Paecilomyces tenuipes* (35°C), *Cordyceps militaris* (37°C) e *Rhizopus microsporus var. tuberosus* (37°C) apresentam condições próximas à temperatura fisiológica humana (Kim *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2015; Meshram; Saxena, Paul, 2016; Meshram *et al.*, 2017; Nascimento *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).

A estabilidade dessas moléculas representa um parâmetro de extrema importância para as formulações e estratégias de armazenamento, uma vez que a escolha do processo produtivo pode influenciar diretamente na segurança e eficácia do produto (Moura *et al.*, 2023).

Estudos mostram que muitas enzimas fibrinolíticas apresentam faixas de estabilidade favoráveis para aplicação na corrente sanguínea, sem comprometer sua integridade. Entretanto, é válido destacar que algumas enzimas podem sofrer processos de degradação, uma vez que, em valores extremos a atividade catalítica é completamente perdida devido à desnaturação da proteína impactando diretamente na eficácia e segurança, dado que, suas faixas de estabilidade de pH e temperatura não correspondem à ideal para aplicação no organismo humano (Cha *et al.* 2010; Park *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2013).

3.5.3 Purificação de enzimas fibrinolíticas

O isolamento e a purificação de produtos biológicos são preocupações fundamentais para a indústria biotecnológica. A crescente demanda por biomoléculas com alto grau de pureza tem incentivado a pesquisa de novas estratégias para o desenvolvimento e produção desses elementos, com vistas a sua aplicação futura nas indústrias alimentícias, farmacêuticas e de cosméticos (Chavez-Santoscoy *et al.*, 2010).

Dessa forma, a pureza de uma enzima fibrinolítica desempenha um papel crucial em sua segurança e eficácia clínica, uma vez que, o processo de purificação tem um impacto significativo na produção de medicamentos, sendo um dos pilares essenciais para garantir a segurança e eficácia do produto farmacêutico (Moura *et al.*, 2023). Assim, a determinação da pureza é essencial para moléculas destinadas a fins terapêuticos, buscando alcançar a máxima pureza possível. Entretanto, alguns métodos, como a cromatografia, podem ser dispendiosos, apesar de serem amplamente utilizados na purificação de biomoléculas (Junqueira, 2012).

Muitas das enzimas fibrinolíticas reportadas na literatura são purificadas por métodos cromatográficos. Dentre os métodos, as enzimas podem ser purificadas por cromatografia de troca iônica, catiônica ou aniônica, utilizando resinas como Sulfopropil (SP) Sepharose, Dietilaminoetil (DEAE) Sepharose e Dietilaminoetil (DEAE) celulose, como também, cromatografia com resinas de interações hidrofóbicas como Octil Sepharose e a cromatografia por afinidade utilizando Carboximetil (CM) Sepharose (Zhang *et al.*, 2015; Lan Liu *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

Separações cromatográficas são amplamente utilizadas no isolamento e purificação de biomoléculas, pois permitem alta resolução a cada passo e têm sido o suporte para a separação de proteínas (Mohammed, 2017), em particular na indústria biofarmacêutica, onde são requeridos elevados graus de pureza. Entretanto, uma alternativa para purificação é a utilização do sistema de duas fases aquosas (SDFA) (Nascimento *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2017; Couto *et al.*, 2022), que é um processo de menor custo que os cromatográficos, visto que não necessita de diferentes fases estacionárias de alto custo, grande quantidade de fases móveis e equipamento especializado, sendo utilizado na purificação de biomoléculas como anticorpos monoclonais, células, DNA, proteínas, entre outras (Torres-Acosta *et al.*, 2019).

Adicionalmente aos processos cromatográficos, a precipitação proteica é um método de separação das proteínas do meio rico em outras moléculas, como o efeito *salting-out*. Essa precipitação é mediada por agentes salinos, como sulfato de amônio que em baixas concentrações tendem a neutralizar as cargas das proteínas, já em altas concentrações consegue polarizar a estrutura favorecendo sua agregação (Duong-Ly; Gabelli, 2014). Além disso, o pH pode induzir que a enzima precipite em seu ponto isoelétrico (pI) na adição de solventes orgânicos como etanol e acetona (Kim *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2014; Moon *et al.*, 2014).

Fica evidente que os métodos utilizados influenciam no grau de pureza obtido e, portanto, mais de um processo é geralmente utilizado durante a purificação dessas enzimas. Atrelado a eles, para identificar a pureza das enzimas fibrinolíticas os ensaios descritos na literatura relacionados a estudos com essas proteases são a eletroforese em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliação do peso molecular e o zimograma de fibrina para verificar a atividade da enzima (Scott; Willian, 2012), como mostrado no quadro 2.

Quadro 2: Métodos empregados na avaliação de pureza de enzimas fibrinolíticas.

Microrganismos	Avaliação de pureza	Referências
<i>Neurospora sitophila</i>	SDS-PAGE e atividade fibrinolítica	Lan Liu <i>et al.</i> (2016)
<i>Neurospora sitophila</i>	SDS-PAGE e atividade fibrinolítica	Deng <i>et al.</i> (2018)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Nascimento <i>et al.</i> (2017)
<i>Mucor subtilissimus</i> UCP 1262	SDS-PAGE e zimograma	Clementino <i>et al.</i> (2019)
<i>Xylaria curta</i>	SDS-PAGE e zimograma	Meshram, Saxena e Paul (2016)
<i>Xylaria curta</i>	SDS-PAGE e zimograma	Meshram <i>et al.</i> (2017)
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	SDS-PAGE e zimograma	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc	SDS-PAGE e método espectrofotométrico de Folin	Ali <i>et al.</i> (2014)
<i>Aspergillus oryzae</i> KSK-3	SDS-PAGE e zimograma	Shirasaka <i>et al.</i> (2012)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina modificado	Liu <i>et al.</i> (2017)
<i>Agrocybe aegerita</i>	SDS-PAGE e zimograma	Li <i>et al.</i> (2021)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SDSPAGE e método da placa de fibrina modificado	Liu <i>et al.</i> (2014)
<i>Schizophyllum commune</i>	SDS-PAGE e zimograma	Park <i>et al.</i> (2010)
<i>Pleurotus eryngii</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina modificado	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>Hericium erinaceum</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	Choi <i>et al.</i> (2013)
<i>Lyophyllum shimeji</i>	SDS-PAGE e zimograma	Moon <i>et al.</i> (2014)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e zimograma	Choi <i>et al.</i> (2011)

<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>tuberosus</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	Zhang <i>et al.</i> (2015)
<i>Pleurotus ferulae</i>	SDS-PAGE e zimograma	Choi <i>et al.</i> (2017)
<i>Cordyceps militaris</i>	SDS-PAGE e método da placa de fibrina	Liu <i>et al.</i> (2015)

Fonte: (Moura *et al.*, 2020)

3.5.4 Massa molecular e ação de inibidores e cofatores enzimáticos

O tamanho molecular das proteases fibrinolíticas desempenha um papel significativo na determinação da forma farmacêutica a ser considerada. O peso molecular de biomoléculas de natureza proteica pode dificultar a absorção e a permeabilidade, conforme indicado por um dos parâmetros das regras de Lipinski, o qual estabelece um limite de 500 kDa (Lipinski *et al.*, 2012). Isso acontece, pois, o tamanho interfere no processo de distribuição dessa classe de moléculas na corrente sanguínea para os vasos sanguíneos periféricos (Jing *et al.*, 2019).

O peso molecular das enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos encontrados na literatura se apresenta numa ampla faixa de tamanhos. É relatado desde tamanhos menores, como a produzida por *Paecilomyces tenuipe* (Cha *et al.*, 2010) e *Paecilomyces tenuipes* (Kim *et al.*, 2011) com 14kDa, a protease obtida de *Aspergillus oryzae* com aproximadamente 30kDa (Shirasaka *et al.*, 2012), e das enzimas derivadas de *Xylaria curta* com aproximadamente 33kDa (Meshram; Saxena; Paul, 2016; Meshram *et al.*, 2017).

Foi possível observar também enzimas com pesos moleculares maiores, como a produzida por *Mucor subtilissimus* com 97kDa (Nascimento *et al.*, 2016), *Schizophyllum commune* BL23 (66-97 kDa) (Patcharaporn *et al.*, 2008) e de *Bionectria* sp. (80-173 kDa) (Rovati *et al.*, 2010). Dentro do gênero *Aspergillus*, as espécies *Aspergillus terreus*, *Aspergillus. oryzae* LK-101 e *Aspergillus. nidulans* HA-10 apresentaram valores na faixa de 16 a 42 kDa (Charles *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010; Niyonzima; More, 2015).

A utilização de inibidores tais como ácido etilenoglicol-bis (éter β -aminoetílico) -N,N,N',N'-tetracético (EGTA), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), B-mercaptoetanol, ácido iodoacético e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) são frequentemente utilizados na caracterização de enzimas fibrinolíticas para identificação da sua classe. Esses inibidores desempenham um papel crucial, sendo capazes de temporariamente

ocupar o sítio ativo da enzima por semelhança estrutural com o substrato original (inibidor competitivo) ou modificar a conformação espacial da enzima, impedindo sua ligação ao substrato (inibidor não competitivo) (Arsalan; Younus, 2018).

Além disso, há associação dessas enzimas com cofatores, componentes não proteicos necessários para a atividade catalítica de algumas enzimas, como íons metálicos (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e Zn^{2+}), que são empregados visando obter informações sobre a possível ação desses íons como moduladores positivos ou negativos sobre a protease e melhorar ainda mais o processo de produção dessas enzimas, principalmente visando uma futura aplicação terapêutica da biomolécula (Liu *et al.*, 2017; Khursade *et al.*, 2019).

A maioria das enzimas fibrinolíticas obtidas pertence à categoria das serino proteases ou serino-metaloproteases (Ali; Bavisetty, 2020), caracterizadas pela presença do aminoácido serina em seu sítio ativo e pela participação de íons metálicos em seus mecanismos catalíticos. Dessa forma, são capazes de atuar tanto direta quanto indiretamente na degradação da fibrina, ou seja, por clivagem ou por ativação da plasmina. A relação dessas enzimas com cofatores é evidente ao observar que íons metálicos bivalentes como Mg^{2+} e Zn^{2+} têm a capacidade de aumentar suas atividades específicas (Barros *et al.*, 2020).

Na literatura é possível encontrar enzimas fibrinolíticas pertencente à família das serino protease oriundas de fungos (Shirazaka *et al.*, 2012; Yadav *et al.*, 2015; Lan Liu *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2021), bactérias (Jayakumar *et al.*, 2012; Majumdar *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2019; Alencar *et al.*, 2021; Couto *et al.*, 2022) e animais (Park *et al.*, 2013; Verma; Pulicherla, 2017; Yeon *et al.*, 2017). Esses achados são justificados pois, essa classe de proteases possui uma ligação com a fibrina, componente principal dos coágulos sanguíneos, sendo a plasmina, uma serino protease, responsável por sua degradação natural (Sun *et al.*, 2016).

3.5.5 Ensaios *in vitro* e *in vivo*

Para superar as limitações associadas aos agentes trombolíticos atualmente disponíveis, são empregadas diversas abordagens de avaliação preliminar. Essas abordagens visam testar a farmacocinética e a dinâmica de potenciais candidatos a medicamentos de origem microbiana quanto à sua eficácia farmacológica e relevância clínica. De maneira resumida, ensaios *in vitro* e *in vivo* são conduzidos para avaliar as

propriedades de lise de coágulos desses agentes. Esses ensaios utilizam fibrina como substrato direto ou induzem a formação de um coágulo de fibrina por meio da ação da trombina (Diwan *et al.*, 2021).

Os ensaios *in vitro* incluem: (i) Atividade antiagregante - mede a redução ou inibição da agregação plaquetária (Han *et al.*, 2005), (ii) Atividade anticoagulante e trombolítica - mede a capacidade de prevenir a formação de coágulos sanguíneos e a dissolução de um coágulo sanguíneo existente (Narasimhan; Chandrasekaran; Rajesh, 2015; Da Silva *et al.*, 2020; Miranda *et al.*, 2022), (iii) Ensaio de formação e lise de coágulos - medição quantitativa periódica da lise do coágulo, auxílio na avaliação clínica do equilíbrio hemostático líquido e distúrbios hemorrágicos e de coagulação (Chitlur; Simpson, 2015) e (iv) ensaio de lise de coágulos com euglobulina - método rápido e sensível de medição da fibrinólise na fração de euglobulina (Nordby *et al.*, 1981).

Os ensaios *in vivo* incluem: (i) modelo de trombose induzida por carragenina - ajuda na avaliação de agentes antitrombos e trombolíticos clinicamente relevantes Simkhada *et al.*, 2012), (ii) Teste D - Dímero - derivados de fibrina contendo domínios D – dímero reticulados ajudam a monitorar a fibrinólise (Olson *et al.*, 2013), (iii) modelo de trombose induzida por cloreto férrico - auxilia na avaliação de medicamentos antiplaquetários e anticoagulantes (Eckly *et al.*, 2011) e (iv) modelo de retalho inguinal de rato - uma ferramenta importante na análise comparativa de vários anticoagulantes e drogas vasomotoras (Wallmichrath *et al.*, 2014).

Além de oferecer a perspectiva de uma compreensão mais aprofundada do papel do candidato a fármaco no alívio da fisiopatologia da doença e na avaliação de seu potencial terapêutico, a combinação de ensaios *in vitro* e *in vivo* também facilita uma aplicação translacional eficaz de novos agentes trombolíticos derivados de microrganismos (Diwan *et al.*, 2021). Ademais, as estratégias de clonagem molecular impulsionam a caracterização de genes que codificam modos de ação específicos do alvo, com efeitos colaterais mínimos. Isso facilita a aplicação eficaz de enzimas trombolíticas no combate aos distúrbios de coagulação sanguínea (Leedagger *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHAMED, N. A. *et al.* In vitro thrombolytic potential of fibrinolytic enzyme from *Brevibacterium* sp. isolated from the root of the plant, *Aloe castellorum*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 3, p. 101868, 2022.
- AHMAD, M. S.; NOOR, Z. M.; ARIFFIN, Z. Z. Isolation and Identification Fibrinolytic Protease Endophytic Fungi from *Hibiscus* Leaves in Shah Alam. **International Journal of Biological, Veterinary, Agricultural and Food Engineering**, v. 8, n. 10, p. 1027–1030, 2014.
- AL FARRAJ, D. A. *et al.* Enhanced Production, Purification and Biochemical Characterization of Therapeutic Potential Fibrinolytic Enzyme from a New *Bacillus flexus* from Marine Environment. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 7, p. 3174–3180, 2020.
- ALBUQUERQUE, K. K. S. A. *et al.* Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 23, p. 101453, 2020.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Partição de proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamaritii* UCP 1279 através do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. In: NETO, B. R. S. (Org.) **Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. p. 118–129.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Purification and Characterization of Fibrinolytic Protease from *Streptomyces parvulus* by Polyethylene Glycol-Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1–17, 2021.
- ALENCAR, V. N. S. N. **Produção, Purificação, Caracterização e Aplicação de Proteases Fibrinolíticas Produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279**. 2023. 61f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica). Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.
- ALI, A. M. M.; BAVISETTY, S. C. B. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, n. 15, p. 1498-1517, 2020.
- ALI, S. M. *et al.* Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation And Purification Technology**, v. 122, p. 359-366, 2014.
- ALTAF, F.; WU, S.; KASIM, V. Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 28, n. 8, p. 680397, 2021.

ALVES, R. O. *et al.* Extractive fermentation for process integration of protease production by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 and purification by PEG-Citrate Aqueous Two-Phase System. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 30-37, 2022.

AMARAL, Y. M. S. *et al.* Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1– 8, 2020.

ANANDAN, D.; MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 339-347, 2007.

ANDRADE, P. B.; BORGES, L. S. R. Antiplaquetários nas síndromes coronarianas agudas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, p. 442-451, 2017.

ARCUS, V. L.; MULHOLLAND, A. J. Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. **Annual Review of Biophysics**, v. 6, n. 49, p. 163-180, 2020.

ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1833–1847, 2018.

ASKEW, D. S.; KONTOYIANNIS, D. P.; CLEMONS, K. V. 2014. Advances Against Aspergillosis: Biology, Host response, Diagnosis and Treatment. **Mycopathologia**, v. 178, n. 5-6, p. 321-324, 2014.

BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo de farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

BARROS, P. D. S. *et al.* Fibrinolytic enzyme from *Arthrospira platensis* cultivated in medium culture supplemented with corn steep liquor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3446–3453, 2020.

BARROS, P. D. S. **Purificação e caracterização de enzimas fibrinolíticas obtidas de *Arthrospira platensis***. 2018. 58f. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde). Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

BARUZZI, A. C.; STEFANINI, E.; MANZO, G. Fibrinolíticos: indicações e tratamento das complicações hemorrágicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 421–427, 2018

BATISTA, J. M. S. *et al.* Produção e caracterização de protease fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 1, p.123-129, 2017.

BATISTA, J. M. S. *et al.* Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase-rich extract produced by *Aspergillus tamaris* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101647, 2020.

BATOMUNKUEVA, B. P.; EGOROV, N. S. Isolation, purification, and separation of the complex preparation of extracellular proteinases with fibrinolytic and anticoagulant properties from *Aspergillus ochraceus* 513. **Mikrobiologiya**, v. 70, n. 5, p. 602–606, 2001.

BENJAMIN, E. J. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 137 n. 12 p. e67-e492, 2018.

BONAR, R. A.; LIPPI, G.; FAVALORO, E. J. Overview of hemostasis and thrombosis and contribution of laboratory testing to diagnosis and management of hemostasis and thrombosis disorders. **Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols**, p. 3-27, 2017.

BRAY, M. A. *et al.* Microvascular thrombosis: experimental and clinical implications. **Transl Res.**, v. 225, p. 105-130, 2020.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Enzimas fibrinolíticas microbianas como abordagem promissora para distúrbios tromboembólicos. *In*: Costa, R. M. P. B. *et al.* (Org.). **Biotecnologia microbiana e suas aplicações na saúde**. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2023. p. 85-99.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Protease com atividade fibrinolítica e colagenolítica produzida por *Aspergillus ochraceus* URM604. **Research, society and development**, v. 11, p. e15511225500, 2022.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e13611225449, 2022.

CHA, W. S. *et al.* Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6475-6481, 2010.

CHANDRAMOHAN, M. *et al.* Production, Characterization and Optimization of Fibrinolytic Protease from *Bacillus pseudomycoides* Strain MA02 Isolated from Poultry Slaughter House Soils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101371, 2019.

CHANDRASEKARAN, S. D. *et al.* Exploring the In Vitro Thrombolytic Activity of Nattokinase From a New Strain *Pseudomonas aeruginosa* CMSS. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 10, p.1-8, 26 out. 2015.

CHAPIN, J. C.; HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. **Blood Reviews**, v. 29, n. 1, p. 17–24, 2015.

CHARLES, P. *et al.* Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 347-352, 2008.

CHAVEZ-SANTOSCOY, A. *et al.* Application of aqueous two-phase systems for the potential extractive fermentation of cyanobacterial products. **Chemical Engineering and Technology**, v. 33, n. 1, p. 177-182, 2010.

CHE, Z. *et al.* An Effective Combination of Codon Optimization, Gene Dosage, and Process Optimization for High-Level Production of Fibrinolytic Enzyme in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 63, 2020.

CHEN, Y. *et al.* Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 149 -159, 2016.

CHITLUR, M.; SIMPSON, M. Role of global assays in thrombosis and thrombophilia. In: GOLDENBERG, N., MANCO-JOHNSON, M. (Org.). **Pediatric Thrombotic Disorders**. Cambridge UK: Cambridge University Press, 2015. p. 142–157.

CHOI, B. S. *et al.* Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 609-622, 2013.

CHOI, D. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3279-3285, 2011.

CHOI, J. H. *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 539-546, 2017.

CHOI, J. H.; KIM, K. J.; KIM, S. Purification and antithrombotic potential of a fibrinolytic enzyme from shiitake culinary-medicinal mushroom, *Lentinus edodes* GNA01 (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 1, p. 47–59, 2018.

CINTRA, A. C. O. *et al.* Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v. 60, n. 1, p.70-82, 2012.

CLEMENTINO, E. L. *et al.* Produção e purificação integrada de protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 553-562, 2019.

COLLEN, D.; LIJNEN, H. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential?. **Blood**, v. 84, n. 3, 1994., v. 84, p. 680–686, 1994.

COSTA, B. A. M. *et al.* Extraction of collagenolytic proteases from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in an aqueous two-phase system for application in collagen hydrolysis. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 1, p. 1-13, 2023.

COSTA, R. B. *et al.* Hidrólise de colágeno catalisada por enzima assistida por ultrassom para produzir peptídeos com potencial biomédico: Colagenase de *Aspergillus terreus* UCP1276. **Bioeletromagnética**, v. 1, p. 1, 2020.

COUTO, M. T. T. *et al.* Production, Extraction and Characterization of a Serine Protease with Fibrinolytic, Fibrinogenolytic and Thrombolytic Activity Obtained by *Paenibacillus Graminis*. **Process Biochemistry**, v. 118, p. 335–345, 2022.

CRUZ, E. A. *et al.* Produção de Alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em Resíduo de Cascas de Mandioca. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 245–249, 2011.

DA SILVA, A. V. *et al.* Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 1–11, 2020.

DA SILVA, F. C. *et al.* Taxonomia Polifásica Para Identificação De *Aspergillus* Seção Flavi: Uma Revisão. **Revista Ifes Ciência**, v. 1, n. 1, p. 18–40, 2015.

DA SILVA, M. M. *et al.* Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 103, p. 282–291, 2019.

DA SILVA, M. M. *et al.* Immobilization of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in magnetic nanoparticles. **Protein Expression and Purification**, v. 192, p. 106044, 2022.

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.

DEAN, S. N. *et al.* Targeting and delivery of therapeutic enzymes. **Therapeutic delivery**, v. 8, n. 7, p. 577–595, 2017.

DENG, Y. *et al.* A dual-function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1338–1343, 2018.

DENG, Z. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1954–1960, 2010.

DEVARAJ, Y.; RAJENDER, S. K.; HALAMI, P. M. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Bacillus amyloliquefaciens* MCC2606 and analysis of fibrin degradation product by MS/MS. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 172–180, 2018.

DIWAN, D. *et al.* Thrombolytic Enzymes of Microbial Origin: A Review. **International Journal of Molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10468, 2021.

D'SOUZA, D. H.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A. Fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* S46: Purification, characterization, and evaluation of its in vitro thrombolytic potential. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 8, p. 661-668, 2020.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of Proteins Using Ammonium Sulfate Precipitation. **Methods In Enzymology**, p. 85- 94, 2014.

ECKLY, A. *et al.* Mechanisms underlying FeCl₃ induced arterial thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, p. 779–789, 2011.

ERGENE, U. *et al.* Disseminated Aspergillosis due to *Aspergillus niger* in Immunocompetent Patient: a case report. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2013, p. 1-3, 2013.

FERNANDES, L. M. G. *et al.* Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 1, p. 113957, 2020.

FERREIRA, J. V. S. *et al.* Produção de proteases por *Aspergillus tamarii* UCP 1279 isolado da caatinga utilizando resíduos agroindustriais. In: NETO, B. R. S. (Org.) **Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. p.130-139.

FLYNN, G. *et al.* Encapsulation of the thrombolytic enzyme, brinase, in photosensitized erythrocytes: a novel thrombolytic system based on photodynamic activation. **J Photochem Photobiol B**, v. 26, n. 2, p. 193–196, 1994.

GHALY, A. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. **J. Microb. Biochem. Technol.**, v. 2, p. 107–129, 2013.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14-22, 2012.

GOKTAY, A. Y.; SENTURK, C. Endovascular treatment of thrombosis and embolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 906, p. 195–213, 2017.

GONÇALEZ, E. *et al.* Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 312–317, 2013.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

HAMED, M. B. *et al.* A contradictory action of procoagulant ficin by a fibrinolytic serine protease from Egyptian *Ficus carica* latex. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00492, 2020.

HAN, F. *et al.* Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 201–207, 2005.

HAQ, I. Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1473-1476, 2004.

HU, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 9235, 2019.

HURST, S. *et al.* Impact of physiological, physicochemical and biopharmaceutical factors in absorption and metabolism mechanisms on the drug oral bioavailability of rats and humans. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 3, n. 4, p.469-489, 2007.

IQBAL, M. *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.

JAYAKUMAR, R. *et al.* Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from an Alkaliphilic Strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and Its Applications. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 168, p. 1849–1866, 2012.

JEONG, S. J. *et al.* Characterization of AprE176, a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* HK176. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 89–97, 2015.

JING, X. *et al.* Key Physicochemical Characteristics Influencing ADME Properties of Therapeutic Proteins. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, p. 115 - 129, 2019.

JOHNSON, G. *et al.* Biomarkers for invasive aspergillosis: the challenges continue. **Biomarkers in medicine**, v. 8, n. 3, p. 429-451, 2014.

JOJI, K.; SANTHIAGU, A.; SALIM, N. Computational Modeling of Culture media for Enhanced Production of Fibrinolytic Enzyme from Marine Bacterium *Fictibacillus* sp. Strain SKA27 and *In Vitro* Evaluation of Fibrinolytic Activity. **3 Biotech.**, v. 9, n. 9, p. 1–14, 2019.

JUNQUEIRA, C. A. **Determinação de pureza de fármacos por meio de métodos diretos e indiretos: vantagens e desvantagens.** 2012. 122f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

KARAMETOU, M. *et al.* PO-49 CNS thrombosis as initial symptom of ALK+ALCL in a child. **Thrombosis Research.**, v.200, p. S42-S43, 2021.

Kawecki, C.; LENTING, P. J.; DENIS, C. V. von Willebrand factor and inflammation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 7, p. 1285-1294, 2017.

KETFI, C. *et al.* Risk of venous thromboembolism in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 88, n. 3, p. 105122, 2021.

KHURSADE, P. S. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* Gd2: A potential and novel isolate for fibrinolytic enzyme production. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 1567–1575, 2019.

KIM, D. W. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1159–1167, 2015.

KIM, H. C. *et al.* Purification and Characterization of a Novel, Highly Potent Fibrinolytic Enzyme from *Paecilomyces Tenuipes*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1545-1553, 2011.

KIM, J. Y. *et al.* Isolation and Characterization of a 32-kDa Fibrinolytic Enzyme (FE32kDa) from *Gloydius blomhoffii* siniticus Venom. **Journal of Pharmacopuncture**, v. 17, n. 1, p. 44–50, 2014.

KLICH, M.A. **Identification of common *Aspergillus* species**. 1rd. edition. Utrecht: Centraalbureau vöör Schimmelcultures, 2002.

KLOK, F. A. *et al.* Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. **Thrombosis Research**, v. 191, p. 145-147, 2020.

KORALNIK, I. J.; TYLER, K. L. Covid-19: a global threat to the nervous system. **Annals of Neurology**, v. 88, n.1, p. 1–11, 2020.

KOTB, E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 15, p. 6647–6665, 2013.

KOTB, E. **Fibrinolytic Bacterial Enzymes with Thrombolytic Activity**. Egypt: Springer Briefs In Microbiology, 2012.

KOTB, E.; HELAL, G. E. D. A.; EDRIES, F. M. Screening for Fibrinolytic Filamentous Fungi and Enzymatic Properties of the Most Potent Producer, *Aspergillus brasiliensis* AUMC 9735. **Biologia**, v. 70, n. 12, p. 1565–1574, 2015.

KOUSHA, M.; TADI, R.; SOUBANI, A. O. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. **European Respiratory Review**, v. 20, n. 121, p. 156-174, 2011.

KREDICS L. *et al.* Case of keratitis caused by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3464-3467, 2007.

KUMAR, S. S.; HARIDAS, M.; SABU, A. Process Optimization for Production of a Fibrinolytic Enzyme from Newly Isolated Marine Bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KU1. **Biocatalysis Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 33–39, 2018.

KUMAR, S. S.; SABU, A. Fibrinolytic Enzymes for Thrombolytic Therapy. In: LABROU, Nikolaos (ed.). **Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications**. Athens: Springer, 2019. p. 345- 381.

LACAZ, C.S. *et al.* **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LAN LIU, X. L. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the food-grade fungus, *Neurospora sitophila*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 98-104, 2016.

LEE, S. K. *et al.* Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. **Food Science Biotechnology**, v. 19, p. 327-334, 2010.

LEEDAGGER, S. Y. *et al.* Cloning and characterization of a thermostable and alkaline fibrinolytic enzyme from a soil metagenome. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 6389–6399, 2013.

LI, G. *et al.* A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 631-639, 2021.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 4-17, 2012.

LIU, X. *et al.* Biochemical Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from *Cordyceps militaris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 793-801. 2017.

LIU, X. *et al.* Purification and Biochemical Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of *Cordyceps militaris*. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 2215-2224, 2015.

LIU, X. L. *et al.* Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 245-253, 2014.

LIU, X. L.; ZHENG, X. Q.; ZHANG, J. K. Production of a Fibrinolytic Enzyme from *Coprinus comatus* YY-20. **Applied Mechanics and Materials**, v. 138–139, p. 1195–1201, 2012.

LUTSEY, P. L.; ZAKAI, N. A. Epidemiology and prevention of venous thromboembolism. **Nature Reviews Cardiology**, v. 20, n. 4, p. 248-262, 2023.

MAJUMDAR, S. *et al.* Antiplatelet and Antithrombotic Activity of a Fibrin(Ogen)olytic Protease from *Bacillus Cereus* Strain FF01. **International Journal Biological Macromolecules**, v. 79, p. 477–489, 2015.

MALDONATO, R. R.; MACEDO, G. A.; RODRIGUES, M. I. Lipase Production Using Microorganisms from Different Agro-Industrial By-Products. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.4, n.1, p. 108-115, 2014.

MANCINI, I. *et al.* The ADAMTS13-von Willebrand factor axis in COVID-19 patients. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 19, n. 2, p. 513-521, 2021.

MARTÍNEZ-MEDINA, G. A. *et al.* Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. **Enzymes in Food Biotechnology**, v. 14, p. 221-245, 2019.

MASSA, K. H. C.; DUARTE, Y. A. O.; CHIAVEGATTO FILHO, A. D. P. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 24, n. 1, p. 105-114, 2019.

MATA-GOMEZ, M. *et al.* A Novel tannase from the xerophilic fungus *Aspergillus niger* GH1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 987- 996, 2009.

MESHRAM, V. *et al.* Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 181, n. 4, p. 1496–1512, 2017.

MESHRAM, V.; SAXENA, S.; PAUL, K. Xylarinase: A Novel Clot Busting Enzyme from an Endophytic Fungus *Xylaria curta*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1502-1511, 2016.

MESQUITA-ROCHA, S. *Aspergillus fumigatus*: *Aspergillus fumigatus*: general aspects and importance in contemporary medicine. **Journal Health Science Institute**, v. 37, n. 2, p. 169–73, 2019.

MIRANDA, V. M. A. M. Evaluation of Partial Thromboplastin Time, Thrombin Time and Prothrombin Time over Treated Plasma Using a Fibrinolytic Protease. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. 1–8, 2022.

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

MOON, S. M. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic α chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 544-550, 2014.

MOURA, J. A. S. *et al.* Caracterização físico-química de agentes trombolíticos produzidos por fungos: uma breve revisão. *In*: Costa, R. M. P. B. *et al.* (Org.). **Biotechnologia na saúde**. Volume 3. 1. ed. Belém-PA: RFB Editora, 2023. p.11-47.

MUKHOPADHYAY, S. *et al.* Fibrinolysis and inflammation in venous thrombus resolution. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1–14, 2019.

NARASIMHAN, M. K.; CHANDRASEKARAN, M.; RAJESH, M. Fibrinolytic enzyme production by newly isolated *Bacillus cereus* SRM-001 with enhanced in-vitro blood clot lysis potential. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 61, p. 157–164, 2015.

NASCIMENTO, B. R. *et al.* Carga de Doenças Cardiovasculares Atribuível aos Fatores de Risco nos Países de Língua Portuguesa: Dados do Estudo “Global Burden of Disease 2019”. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 1028-1048, 2022a.

NASCIMENTO, J. C. S. *et al.* Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. phoenicis URM 4924. **Research, society and development**, v. 11, p. e41311628994, 2022b.

NASCIMENTO, J. C. S. *et al.* Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. phoenicis URM 4924 utilizando planejamentos fatoriais. **PUBVET (LONDRINA)**, v. 13, p. 1-10, 2019.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v.3, n.3, p. 81–91, 2015.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/ sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p.16-24, 2016.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 40, n. 8, p.1209-1219, 2017.

NAVEENA, B. *et al.* Enhanced Production of Thrombinase by *Streptomyces venezuelae*: Kinetic Studies on Growth and Enzyme Production of Mutant Strain. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 417–424, 2012.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019. Cap. 3. p. 75-114.

NGUIMBI, E. *et al.* Optimization of Growth, Fibrinolytic Enzyme Production and PCR Amplification of Encoding Fibrinolytic Enzyme Gene in *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Ntoba Mbodi at Brazzaville. **International Journal of Science and Research**, v. 3, n. 11, p. 2799–2803, 2014.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. **3 Biotech** v. 5, p. 61-70, 2015.

NORDBY, E. *et al.* The euglobulin clot lysis time, a rapid and sensitive method for the as-say of fibrinolytic activity after venous stasis. **Scandinavian Journal of Haematology**, 1981; v. 25, p. 407–411, 1981.

OLIVEIRA, G. M. M.; MESQUITA, C. T. Heart Disease is the Leading Cause of Death for Women–We must Change the Status Quo. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 34, p. 336-337, 2021.

OLIVEIRA, M. C. L. *et al.* Lovastatin producing by wild strain of *Aspergillus terreus* isolated from Brazil. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 1, p. 1, 2020.

OLSON, J. D. *et al.* D-dimer: Simple test, tough problems. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 137, p. 1030–1038, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Organização Pan- -Americana de Saúde (OPAS). **Doenças cardiovasculares**. 2021. Disponível em: <[https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares#:~:text=Estima%2Dse%20que%2017%2C9,acidentes%20vascular es%20cerebrais%20\(AVCs\)>](https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares#:~:text=Estima%2Dse%20que%2017%2C9,acidentes%20vascular es%20cerebrais%20(AVCs)>). Acesso em: 10 fev. 2024.

PALANIVEL, P.; ASHOKKUMAR, L.; BALAGURUNATHAN, R. Production, Purification and Fibrinolytic Characterization of Alkaline Protease from Extremophilic Soil Fungi. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 101–110, 2013.

PAN, S. *et al.* Non-sterile submerged fermentation of fibrinolytic enzyme by marine *Bacillus subtilis* harboring antibacterial activity with starvation strategy. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–13, 2019.

PARK, I. S. *et al.* Purification and biochemical characterization of a 17 kDa fibrinolytic enzyme from *Schizophyllum commune*. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 836-841, 2010.

PARK, J. W. *et al.* Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriformia tentaculata*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5–6, p. 979-987, 2013.

PATCHARAPORN, P. *et al.* Production and properties of a fibrinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. **Journal Science Technology**, v. 30, p. 447-453, 2008.

PENG, Y. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douche, a traditional Chinese soybean food. **Elsevier Science**, v. 134, p. 45-52, 2003.

PITT, J. I.; SAMSON, R. A. Nomenclatural considerations in naming species of *Aspergillus* and its teleomorphs. **Studies in Mycology**, v. 59, p. 67–70, 2007.

POLANCZYK, C. A. Epidemiologia das Doenças Cardiovasculares no Brasil: a verdade escondida nos números. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 115, n. 2, p. 161-162, 2020.

PRADILLO, J. M. *et al.* Del laboratorio a la clínica en el ictus isquémico agudo. Modelos experimentales in vitro e in vivo. **Revista de neurologia**, v. 75, n. 9, p. 283–293, 2022.

PRADO, F. B. *et al.* Production of bioactive compounds by *Aspergillus kept* under two preservation conditions. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 12, n. 1, p. 37–47, 2017.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, C. S.; SARMA, P. N. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1449–1454, 2006.

PREHL, V. B. *et al.* Etiopatogenia e diagnóstico da trombose venosa profunda na gestação: revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 4, p. 51-55, 2018.

PRYZDIAL, E. L. G. *et al.* Blood coagulation dissected. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 57, n. 4, p. 449–457, 2018.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. **Os Reinos dos Fungos**. Vol. 1. 2 ed. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004.

RAJASELVAM, J. *et al.* n vitro fibrinolytic activity of an enzyme purified from *Bacillus amyloliquefaciens* strain KJ10 isolated from soybean paste. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 4117-4123, 2021.

RAJU, E. V. N.; DIVAKAR, G. *Bacillus cereus* GD 55 Strain Improvement by Physical and Chemical Mutagenesis for Enhanced Production of Fibrinolytic Protease. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 5, p. 81–93, 2013.

RAOL, G.G. *et al.* Utilization of agro-industrial waste for β -galactosidase production under solid state fermentation using halotolerant *Aspergillus tubingensis* GR1 isolate. **3 Biotech**. v. 5, p. 411–421, 2015.

REINEHR, C. O. *et al.* Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation: evaluation of substrate specificity and use in esterification and alcoholysis reactions. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 454–460, 2014.

ROCHA, F. T. B. *et al.* Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. **Anais da academia brasileira de ciências**, v. 93, p. e20200867, 2021.

RODRIGUES, E. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218–233, 2012.

RODRIGUES, E. S. *et al.* New concepts on the physiology of hemostasis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

ROTH, G. A. *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, 2020.

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

SALIHU A. *et al.* Utilization of Groundnut Husk as a Solid Substrate for Cellulase Production by *Aspergillus niger* Using Response Surface Methodology. **Waste Biomass-Valorization**., v. 5, p. 585–593, 2013.

SAMSON, R. A. *et al.* Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 141-173, 2014.

SAMSON, R. A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, p. 13-20. 2009.

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

SCHUSTER, S. *et al.* On the safety of *Aspergillus niger*: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426-425. 2002.

SCOTT, J. E.; WILLIAN, K. P. Validating Identity, Mass Purity and Enzymatic Purity of Enzyme Preparations. *In*: MARKOSSIAN S. *et al.* (Org.) **The Assay Guidance Manual**. Bethesda (Md): Eli Lilly & Company And The National Center For Advancing Translational Sciences, 2004. p. 1-13.

SHARMA, C. *et al.* Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020.

SHARMA, C.; OSMOLOVSKIY, A.; SINGH, R. Microbial fibrinolytic enzymes as antithrombotics: Production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, 2021.

SHIRASAKA, N. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 354-364, 2012.

SHUKOR, N. A. A. *et al.* (2015). Isolation of Thermotolerant Bacteria Producing Fibrinolytic Enzyme. **Jurnal Teknologi**, v. 77, n. 25, p. 83–87, 2015.

SILVA, O. S. *et al.* Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, p. 125-143, 2016.

SILVA, O. S. *et al.* Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168-173, 2017.

SILVA, O. S.; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 209-216, 2018.

SILVA, P. E. C. E. *et al.* In vitro thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1092, p. 524–529, 2018.

SIMKHADA, J. R. *et al.* Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model. **Thromb. Res.**, v. 129, p. 176–182, 2012.

SIQUEIRA, J. G. W. *et al.* Extraction of protease from *Aspergillus tamaritii* URM 4634 in aqueous two-phase system under continuous and discontinuous process. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 1, p. 1-8, 2020.

SOARES, I. A. *et al.* Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 700-705. 2010.

SOUZA, P. M. *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 1-10, 2015.

SUN, Z. *et al.* A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 346-354, 2016.

TAIPA, M. A.; FERNANDES, P.; CARVALHO, C. C. C. R. Production and Purification of Therapeutic Enzymes. *In*: LABROU, N. (Ed.). **Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications**. Athens: Springer, p. 1-24, 2019.

TEN CATE, H.; HACKENG, T. M.; DE FRUTOS, P. G. Coagulation factor and protease pathways in thrombosis and cardiovascular disease. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 117, n. 7, p. 1265–1271, 2017.

TIAN, Z. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme, PSLTro01, from a medicinal animal *Porcellio scaber* Latreille. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 536–546, 2015.

TORRES-ACOSTA, M. A. *et al.* Aqueous Two-Phase Systems at Large Scale: challenges and opportunities. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1800117, 2018.

VAZQUEZ-GARZA, E. *et al.* Venous thromboembolism: thrombosis, inflammation, and immunothrombosis for clinicians. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v. 44, n. 3, p. 377–385, 2017.

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

VIANA, T. *et al.* Acute Myocardial Infarction with Coronary Thrombosis in a Covid-19 Patient without Risk Factors for Cardiovascular Disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, n. 3, p. 511-515, 2021.

VIJAYARAGHAVAN, P. *et al.* Bioconversion of agro-industrial wastes for the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus halodurans* IND18: Purification and biochemical characterization. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 1–8, 2016.

VIJAYARAGHAVAN, P. *et al.* Novel Sequential Screening and Enhanced Production of Fibrinolytic Enzyme by *Bacillus* sp. IND12 Using Response Surface Methodology in Solid-State Fermentation. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 3909657, 2017.

WALLMICHATH, J. *et al.* The free groin flap in the rat: A model for improving microsurgical skills and for microvascular perfusion studies. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 48, p. 191–196, 2014.

WANG, S. *et al.* A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 18–25, 2011.

WANG, Y. *et al.* Proteomics and transcriptome analysis coupled with pharmacological test reveals the diversity of anti-thrombosis proteins from the medicinal insect, *Eupolyphaga sinensis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 42, n. 8, p. 537–544, 2012.

WARD, O. P. *et al.* Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. **Advances in Applied Microbiology**, v. 58, p. 75. 2006.

WARDLAW, J. M. *et al.* Thrombolysis for acute ischaemic stroke. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 7, 2014.

WEISEL, J. W.; LITVINOV, R. I. **Fibrin formation, structure and properties**. 1. ed. New York: Springer, Cham, 2017.

WEITZ, J. I. Coagulação sanguínea e fármacos anticoagulantes, fibrinolíticos e antiplaquetários. In: BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMAN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 13. ed. Porto Alegre: Amgh, 2019. Cap. 30. p. 723-747.

WEYAND, A. C., SHAVIT, J. A., GINSBURG, G., **Disorders of Hemostasis and Thrombosis**. Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition) p. 173-211, 2023.

WINTER, W. E.; FLAX, S. D.; HARRIS, N. S. Coagulation Testing in the Core Laboratory. **Laboratory Medicine**, v. 48, n. 4, p.295-313, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cardiovascular Diseases**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 30 jan. 2024.

WU, R. *et al.* Cost-Effective Fibrinolytic Enzyme Production by *Bacillus subtilis* WR350 using Medium Supplemented with Corn Steep Powder and Sucrose. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 6824, 2019.

YADAV, S. K. *et al.* Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667-677, 2015.

YAO, Z., KIM, J. A.; KIM, J. H. Gene Cloning, Expression, and Properties of a Fibrinolytic Enzyme Secreted by *Bacillus pumilus* BS15 Isolated from Gul (Oyster) Jeotgal. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 23, n. 3, p. 293–301, 2018.

YEON, S. J. *et al.* Purification of serine protease from polychaeta, *Lumbrineris nipponica*, and assessment of its fibrinolytic activity. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Animal**, v. 53, n. 6, p. 494–501, 2017.

ZABELL, R. A.; MORELL, J. J. The characteristics and classification of fungi and bacteria. **Wood Microbiology**, p. 55-98, 2020.

ZAGO, M. A. *et al.* **Tratado De Hematologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2013.

ZHAI, Z. *et al.* Prevention and treatment of venous thromboembolism associated with coronavirus disease 2019 infection: a consensus statement before guidelines. **Thromb Haemost.**, v. 120 n. 6, p. 937–948, 2020.

ZHANG, S. *et al.* Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 243-248, 2015.

ZHU, X. *et al.* Isolation and characterization of an activator-dependent protease from *Aspergillus ochraceus* screened from low denatured defatted soybean meal and the proteolysis of soy proteins. **LWT**, v. 150, p. 112026, 2021.

4 CAPÍTULO I

O artigo abaixo desenvolvido será submetido a Preparative Biochemistry & Biotechnology.

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, CITOTÓXICA E HEMATOLÓGICA DE UMA SERINO PROTEASE COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA OBTIDA POR *Aspergillus tamari* Kita UCP 1279

RESUMO

O objetivo desse estudo foi realizar a caracterização bioquímica e avaliação *in vitro* dos aspectos fibrinolítico, trombolítico, hematológico e tóxico de uma protease oriunda de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279. A enzima purificada pelo sistema de duas fases aquosas foi avaliada quanto aos parâmetros bioquímicos: pH e temperatura ótima e estabilidade, efeito de íons metálicos, inibidores e surfactantes. Além disso, foi avaliada a atividade amidolítica, fibrinogenolítica, trombolítica, SDS-PAGE e o zimograma de fibrina da enzima. Ainda, foram realizados ensaios de citotoxicidade, determinação dos tempos de coagulação, atividade hemolítica e efeito da albumina sérica sobre a atividade enzimática. A protease fibrinolítica purificada foi caracterizada como uma serino protease e demonstrou uma temperatura ótima de 50°C, mantendo-se estável até 120 minutos, com pH ótimo de 7,0 e estável por 36 horas. A atividade enzimática foi potencializada pela adição de Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ e surfactantes não iônicos como Tween-80 e 20. Entretanto, foi inibida na presença dos íons Cu²⁺ e Fe³⁺ e pelos Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio, com uma diminuição de 37,66 e 62,35%, respectivamente. A enzima exibiu ainda uma maior especificidade para o substrato N-succinil-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilida, um substrato típico de quimotripsina. A massa molecular da protease foi em torno de 90 kDa, exibindo também atividade no zimograma de fibrina. A protease purificada não degradou o fibrinogênio, entretanto promoveu uma degradação de 38,81% do trombo *in vitro* de fibrina após 90 minutos. No ensaio de citotoxicidade, a protease fibrinolítica produzida foi atóxica, com viabilidade celular superior a 80% e na verificação da ação da enzima sobre os parâmetros de coagulação, observou um discreto prologamento do TP e TPPa à medida que aumentou a concentração da enzima, não afetando também o tempo de trombina. Por fim, foi verificado que nenhuma concentração utilizada demonstrou promover a lise das células sanguíneas e que a albumina promoveu um aumento da atividade em 31,70% da atividade enzimática. Mediante os resultados obtidos, a pesquisa revelou que o *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 possui potencial para a produção de enzimas fibrinolíticas, oferecendo uma alternativa promissora no desenvolvimento de uma nova droga para o tratamento da trombose.

Palavras chaves: enzima proteolítica; Ascomycota; trombose; efeito anticoagulante, atividade trombolítica; hemólise.

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morte em todo o mundo, sendo reconhecidas como doenças com maior morbimortalidade, e por isso, consideradas problemas de saúde pública (Nascimento *et al.*, 2022a). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 17 milhões de pessoas morrem todos os anos por doenças cardiovasculares (Roth *et al.*, 2020). Em geral, são patologias que afetam o sistema circulatório, como a doença cardíaca coronária, doença vascular periférica, hipertensão arterial, arritmia, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e angina pectoris (Yang *et al.*, 2020).

A formação de coágulos de fibrina está intimamente envolvida no desenvolvimento das DCV (Sharma *et al.*, 2020) e por isso, a trombose desempenha um papel importante na patogênese de vários distúrbios cardiovasculares devido ao acúmulo de coágulos que bloqueiam a passagem do fluxo sanguíneo (Mukai; Oka, 2018). O principal componente proteico dos coágulos sanguíneos, a fibrina, é formado a partir do fibrinogênio via proteólise pela trombina e podem ser hidrolisados pela plasmina para evitar trombose nos vasos sanguíneos. Em uma situação desequilibrada devido a alguns distúrbios, os coágulos não são hidrolisados e, portanto, ocorre a trombose (Nascimento *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2019).

As abordagens terapêuticas vigentes para combater a formação de coágulos compreendem o uso de medicamentos antiplaquetários, anticoagulantes e agentes trombolíticos (Afonso *et al.*, 2016). Contudo, diversos desses fármacos apresentam desvantagens, tais como custos elevados, breve eficácia quando administrados por via intravenosa, falta de especificidade, potencial toxicidade, risco de reações alérgicas e uma variedade de outros efeitos colaterais (Andrade; Borges, 2017; Taipa; Fernandes; Carvalho, 2019). Diante disso, um medicamento com capacidade de remover efetivamente coágulos sanguíneos e restaurar o fluxo sanguíneo é de suma importância para o tratamento eficaz de doenças trombóticas e por isso, as enzimas fibrinolíticas se apresentam como uma alternativa no tratamento dessas doenças (Bray *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a última década testemunhou um aumento na descoberta de agentes trombolíticos de numerosos microrganismos, e isto desencadeou o desenvolvimento e a caracterização dessas enzimas com atividade trombolítica e

efeitos colaterais mínimos ou inexistentes (Mukherjee *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Vijayaraghavan; Vincent, 2014; Meshram *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Costa e Silva *et al.*, 2018; Kumar; Haridas; Abdulhameed, 2020). No cenário atual, as proteases fibrinolíticas produzidas por microrganismos têm o potencial de inibir a coagulação sanguínea e são capazes de degradar a fibrina desempenhando um papel fundamental no tratamento das DCV (Diwan *et al.*, 2021).

Os fungos demonstraram ser uma boa fonte dessas enzimas, com possibilidade de produção em larga escala em curto período e com custos menores, devido à sua capacidade de crescer em substratos sólidos, como resíduos agroindustriais, facilitando a produção e a purificação deste bioproduto, e assim, tornaram-se alvos atraentes, uma vez que as enzimas fibrinolíticas por eles produzidas são geralmente liberadas extracelularmente, tornando sua recuperação mais fácil e barata (Nascimento *et al.*, 2020; Alencar *et al.*, 2021).

As propriedades bioquímicas de proteases fúngicas possui grande potencial para ser exploradas, existindo uma literatura exígua sobre o potencial fibrinolítico desses microrganismos. A literatura mostra que espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* tem atraído atenção como fonte de novos compostos bioativos (Costa *et al.*, 2023; Nascimento *et al.*, 2022b; Cardoso *et al.*, 2022; Rocha *et al.*, 2021; Albuquerque *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020), sendo a espécie *Aspergillus tamarii* já conhecida por ser um bom produtor de enzimas de interesse industrial com atividade collagenolítica, queratinolítica, produção de frutossiltransferase, proteases e em formulações de detergentes (Silva *et al.*, 2018; Amaral, *et al.*, 2020; Batista *et al.*, 2020).

Nos últimos anos vem sendo dada particular atenção, a produção e purificação de proteases fibrinolíticas, que tem um potencial de degradar coágulos de fibrina, no entanto, são escassos estudos de toxicidade dessas enzimas e seus efeitos *in vivo*. Diante disso, o objetivo desse estudo foi realizar a caracterização bioquímica e avaliar *in vitro* aspectos da ação fibrinolítica, trombolítica e toxicidade da protease oriunda de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, uma vez que a intervenção de pesquisas nessa área pode ajudar no desenvolvimento de agentes trombolíticos mais seguros para o uso terapêutico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DA PROTEASE FIBRINOLÍTICA

A produção da protease com atividade fibrinolítica obtida a partir do *Aspergillus tamarii* Kita (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado/ Cadastro N° AA30B0B) por fermentação em estado sólido e purificada por sistema de duas fases aquosas (SDFA) foi obtida de acordo com Alencar *et al.* (2020). Vale ressaltar que foi utilizada a fase rica em sal que é para onde a protease fibrinolítica é particionada, de acordo com as condições pré-determinadas 12,5% de polietilenoglicol 8000g/mol, 15% de Fosfato de sódio e pH 8.0

2.2 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para a quantificação de proteínas foi utilizada a metodologia descrita por Smith *et al.* (1985), no qual foi utilizado BSA (albumina bovina sérica) como substância padrão para a curva de calibração.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA

A atividade proteásica foi determinada conforme descrito por Ginther (1979). 150µL da protease purificada foi adicionada a 250µL de azocaseína (1%) em tubos Eppendorf (1,5 mL; Kasvi, Curitiba, Brasil), sendo incubados a 28 °C no escuro por 60 min, seguido da adição de 1mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% para interrupção da reação. Em seguida, a mistura reacional foi centrifugada (14000 g, 15 min) e o sobrenadante (800µL) foi transferido para um segundo tubo contendo 200 µL de NaOH 1,8 M e posteriormente agitadas num misturador de vórtex. A absorbância foi medida a 420 nm e a atividade enzimática foi definida como um aumento de 0,1 na absorbância.

2.4 ENSAIO DE ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

A atividade fibrinolítica foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Wang, Wu e Liang (2011). 0,72% de fibrinogênio dissolvido em 400µL de tampão Tris HCl-NaCl 150mM pH 7,75 e 100µL de fosfato 245 mM pH 7,0 foram adicionados a tubos contendo uma solução de 100µL de trombina 20 U/ml [T9326-150UN - Trombina humana, BioUltra, recombinante, expressa em Células HEK 293,

solução aquosa, $\geq 95\%$ (SDS-PAGE) - Sigma-Aldrich] e incubados a 37°C por 10 minutos. Posteriormente foram adicionados 100µL da protease fibrinolítica purificada ao tubo e a incubação continuou a 37°C por 60 min. Esta solução foi misturada a cada 20 min e após 1h a 37 °C, a reação foi interrompida pela adição de 700 µL de ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M. A mistura reacional foi centrifugada a 15.000 x g por 10 min. Em seguida, foi coletado 1mL do sobrenadante e a absorbância da amostra foi medida a 275nm. Neste ensaio, uma unidade (unidade de degradação de fibrina) de atividade enzimática foi definida como um aumento de 0,01 na absorbância a 275 nm.

2.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEASE FIBRINOLÍTICA PURIFICADA

Toda caracterização bioquímica (pH e temperatura ótima e estabilidade, efeito de íons metálicos, inibidores e ação de surfactantes) sobre a atividade da protease fibrinolítica foram realizadas conforme Nascimento *et al.* (2017).

2.5.1 Efeito do pH e temperatura na atividade proteásica

O pH ótimo da protease fibrinolítica foi determinado através do ensaio da atividade proteásica. Para avaliar os efeitos do pH na atividade, a enzima purificada foi mantida em temperatura ambiente nas seguintes soluções tampão a 0,1 M: tampão acetato de sódio - ácido acético (pH 3,0 a 5,0), tampão citrato fosfato (pH 5,0 a 7,0), tampão Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e tampão glicina-NaOH (pH 9,0 a 11,0). Para estabilidade ao pH, a enzima foi incubada em seu pH ideal por 36h e as atividades enzimáticas residuais foram analisadas nos tempos 0, 1, 6, 12, 24 e 36h. Os efeitos da temperatura na atividade foram determinados incubando a enzima em diferentes temperaturas (10, 20, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C) por 60 min e depois foi determinada a atividade residual. A estabilidade térmica foi testada em sua temperatura ótima até 120min e as atividades enzimáticas residuais foram analisadas nos tempos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 min). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5.2 Efeito de íons metálicos, inibidores e surfactantes

A atividade da protease fibrinolítica foi determinada na presença dos íons metálicos (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ e K^+), sendo misturado 200µL

da protease purificada com 200µL das referidas soluções de íons, todos na concentração de 5,0mM após incubação por 60 min em temperatura ambiente.

Para avaliar o efeito dos inibidores na atividade proteásica, a enzima purificada (200µL) foi exposta por 60 min em temperatura ambiente frente a 200µL dos seguintes inibidores: 10mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 10mM de β-mercaptoetanol, 10mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 1% de ácido iodoacético e 10mM de Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) e Tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK).

Do mesmo modo, para substâncias surfactantes 200µL da enzima purificada foi colocada em contato com 200µL dos referidos surfactantes: Monolaurato de sorbitano etoxilado (Tween 20), monooleato de sorbitano etoxilado (Tween 80), Triton X-100 e dodecilsulfato de sódio (SDS) por um período de 60 minutos. Foram utilizadas soluções contendo 1,0 % das referidas substâncias anteriormente mencionadas. Após a incubação, a atividade residual da protease foi medida e os resultados foram expressos como uma percentagem do teste controle.

2.5.3 Determinação da atividade amidolítica

A atividade amidolítica foi medida espectrofotometricamente usando cloridrato de Nα-benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida (número de catálogo B4875, Sigma-Aldrich), N-succinil-Gly– Gly–Phe-p-nitroanilida (número de catálogo S1899, SigmaAldrich) e N-succinil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (número de catálogo S2628, SigmaAldrich) como substratos cromogênicos. A mistura de reação (200µL) contendo 30 µL de solução da protease purificada, 30 µL do substrato cromogênico e 140µL de 20mM Tris–HCl, pH 7,4, foi incubada por 30 min à 37°C, e a quantidade de p- nitroanilina determinada por espectrofotometria UV-Vis a 405nm. Uma unidade de atividade amidolítica (UA) foi expressa como o número de micromoles de substrato hidrolisado pela enzima por minuto e por mL, conforme Kim *et al.* (1996).

2.6 ELETROFORESE EM GEL DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO- POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE foi realizado seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi conduzida com um sistema de eletroforese em gel vertical utilizando um gel de poliacrilamida a 12% (Bio-Rad Laboratories, Inc, Life Sciences).

O peso molecular foi determinado com marcador padrão (250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20 kDa). Após a separação, os géis de eletroforese foram visualizados por coloração de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,02% (v/v) em 50% (v/v) de metanol e 7,5% (v/v) de ácido acético.

2.7 ZIMOGRAMA DE FIBRINA

A atividade fibrinolítica da enzima foi verificada realizando um zimograma de fibrina de acordo com a metodologia de Kim, Choi e Lee (1998) com algumas modificações. 0,12% (m/v) de fibrinogênio foi misturado na solução de gel de poliacrilamida 12% e incubados em banho maria a 37°C até dissolução completa do fibrinogênio. Em seguida, uma solução de trombina (1U/ml) foi adicionada a solução e 10uL da enzima purificada foi utilizada para realização da eletroforese no gel de fibrina. Após a eletroforese, o gel foi lavado em Triton X-100 2,5% (v/v) por 10min, lavado três vezes com água destilada e incubado em tampão de reação (100mM Tris-HCl pH 7,5) em banho maria a 37°C por 16 horas. Ao final do procedimento, o gel foi lavado novamente em água destilada e para a coloração foi utilizado Coomassie Brilliant Blue R-250, seguindo a metodologia de Laemmli (1970). A observação de uma região digerida em gel de fibrina evidencia a atividade da enzima fibrinolítica.

2.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Foram utilizadas células de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231) e macrófagos (J774A.1) obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem MDA-MB-231 foi mantida em meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 (proporção de 50% de cada meio) com L-glutamina 2 mM, sem bicarbonato de sódio e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO₂. Já a linhagem J774A.1 foi mantida em Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de SFB e 5% de CO₂. As células foram contabilizadas em câmara de Neubauer para o teste de viabilidade celular. Um ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) foi utilizado para determinar a viabilidade celular a partir da enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279, seguindo a metodologia de Mosmann (1983). As células foram inseridas em placas de 96 poços, a uma densidade de 1x10⁴ de células/mL e após 24h de incubação a enzima fibrinolítica foi exposta durante 24h nas concentrações

finais de 300, 150, 75, 17,5 e 8,75 µg/mL. Após o período de exposição, foi adicionado 20µL de solução de MTT (4mg/mL), e as placas foram incubadas durante 2-3h. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e 100µL de DMSO (Dimethylsulfoxide) foram adicionados. A absorbância foi medida em Leitor de Microplaca (Biotek Elx808) no comprimento de 630nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular: (Abs da população celular tratada X 100/Abs da população celular não tratada) e os resultados da atividade citotóxica foram expressos como as médias das repetições ± desvio padrão (Da Silva *et al.*, 2019).

2.9 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE COAGULAÇÃO

Os tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcialmente ativada (TTPa) foram realizados em um coagulômetro semiautomático (Maxcoag, Urit medical Eletronic CO., China) e os reagentes da BIOS Diagnóstica (Sorocaba, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização do ensaio, foi utilizado um pool de plasma humano de 5 indivíduos saudáveis para os testes fornecidos pelo fabricante. O estudo foi realizado mediante a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE (Parecer nº 63547722.6.0000.5208). Os controles dos ensaios TTPa e TP foram realizados com 25µL de solução salina (NaCl, 0,9%) e 100µL de plasma. Para avaliar o efeito anticoagulante, foi utilizada protease fibrinolítica purificada nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mg/mL, deixando-se em contato com o plasma padrão por 15 e 45 min. Após esse tempo, seguiu-se para obtenção dos tempos de coagulação através do equipamento apropriado. A avaliação de tempo de trombina (TT) foi realizada de acordo com a metodologia de Miranda *et al.*, (2022) com algumas modificações. Primeiramente, 50 µL de protease fibrinolítica (1mg/mL) foram colocados em contato com 100µL de trombina (20 U/mL) por 45 min, logo após este período, a solução foi transferida para eppendorfs (2 mL) contendo uma mistura de 400 µL de Tris-HCl-NaCl 150 mM pH 7,75, 100 µL de tampão fosfato 245 mM pH 7,0 e fibrinogênio bovino 0,72%, sendo colocados em banho-maria a 37°C até observação da formação de coágulo de fibrina.

2.10 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica foi realizada usando sangue humano de um voluntário saudável do sexo masculino. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa

da UFPE com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE: 63547722.6.0000.5208). O ensaio foi realizado seguindo as orientações de Rajendran *et al.* (2017). 2 mL de sangue total foram adicionados a 4 mL de PBS (Tampão fosfato de sódio 0,2M, pH 7,4) e centrifugados a 5000 rpm por 5 min para isolar as células vermelhas do sangue (RBCs). As hemácias foram lavadas duas vezes com 10 mL de PBS e finalmente diluídas em 20 mL de PBS. Da suspensão final, 0,4 mL foi diluído em 1,6 mL da enzima fibrinolítica em uma concentração final de 2,5; 5 e 10 mg/mL. Os grupos controles foram divididos em: PBS (grupo negativo), água destilada e Triton-X (grupo positivo). Os tubos foram mantidos a 37°C por 1h e posteriormente centrifugados por 5 min a 10.000 rpm a 20 °C e a absorbância foi medida a 540 nm. O grau hemolítico foi expresso pela seguinte fórmula: $(\text{Absorbância teste} - \text{Absorbância negativo}) / (\text{Absorbância positivo} - \text{Absorbância negativo}) \times 100$.

2.11 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA E ENSAIO DE DEGRADAÇÃO TROMBOLÍTICA *IN VITRO*

2.11.1 Obtenção de fibrinogênio

O fibrinogênio foi obtido diretamente do plasma sanguíneo para o ensaio de degradação do coágulo de fibrina e atividade fibrinogenolítica. O plasma utilizado ao longo da pesquisa foi cedido pela Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), e os Comitês de Ética em Pesquisa aprovaram a parceria UFPE e HEMOPE (Processo nº 1.727.579). Os testes sorológicos, determinados em legislação sanitária específica, foram realizados pelo próprio HEMOPE para detectar eventual contaminação viral, visando garantir a segurança do plasma obtido e as informações dos doadores foram mantidas em sigilo pelo hemocentro.

2.11.2 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi realizada de acordo com Park *et al.* (2013). Para o ensaio incubou-se a 37°C uma mistura consistindo em 100µg de fibrinogênio humano (oriundo das bolsas de plasma do HEMOPE), com a adição de 100 µL da protease fibrinolítica em tampão Tris-HCl 25mM (pH 7,5). Foram retirados 20µL dessa mistura de reagentes nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min. A reação foi interrompida pela adição de 4 µL de tampão desnaturante de amostra SDS-PAGE. Os produtos

resultantes foram analisados em SDS-PAGE 12% seguindo o protocolo descrito por Chang *et al.* (2005).

2.11.3 Ensaio de degradação trombolítica *in vitro*

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia descrita por Couto *et al.* (2022). Em tubos de vidro, foram adicionados 1 mL de plasma humano (oriundo das bolsas de plasma do HEMOPE) e 200 µL de solução de trombina (20 U/mL), incubados a 37°C por 10 min; após esse tempo, cada trombo de fibrina formado foi pesado em balança analítica. Em cada tubo de vidro contendo o trombo já pesado, foram adicionados 200 µL da protease fibrinolítica e incubados novamente a 37°C por 90 min. O percentual de degradação foi calculado conforme (Da Silva *et al.*, 2020). Todo o experimento foi feito em triplicata, e o controle foi feito com 200 µL de solução salina 0,15 M.

2.12 EFEITOS DA ALBUMINA SÉRICA SOBRE A ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

100 µL da protease fibrinolítica foi misturado com 100 µL de solução de 6,7 mg/mL de BSA (albumina bovina sérica) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 150 mM. Após 1 hora, foi retirada uma alíquota de 100 µL e o ensaio foi realizado conforme descrito no item 2.4.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.1.1 Influência da temperatura sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279

Os efeitos da temperatura na atividade fibrinolítica e na termoestabilidade da enzima são ilustrados nas Figuras 6 e 7, respectivamente. A protease fibrinolítica purificada pelo SDFA demonstrou máxima eficiência (32,86 U/mL) na temperatura de 50°C, resultados que coincidiram com os relatados por Dienes *et al.* (2007), Shirasaka *et al.* (2012), Choi *et al.* (2017a) e Deng *et al.* (2018) para uma enzima fibrinolítica produzida por *Trichoderma reesei* QM9414, *Aspergillus oryzae* KSK-3, *Pleurotus ferulae* e *Neurospora sitophila*, respectivamente. A atividade máxima a 50 °C também

foi relatada para uma enzima produzida por *Aspergillus tamarii* URM 4634 (Silva *et al.*, 2018), assim como foi verificado neste estudo para a mesma espécie.

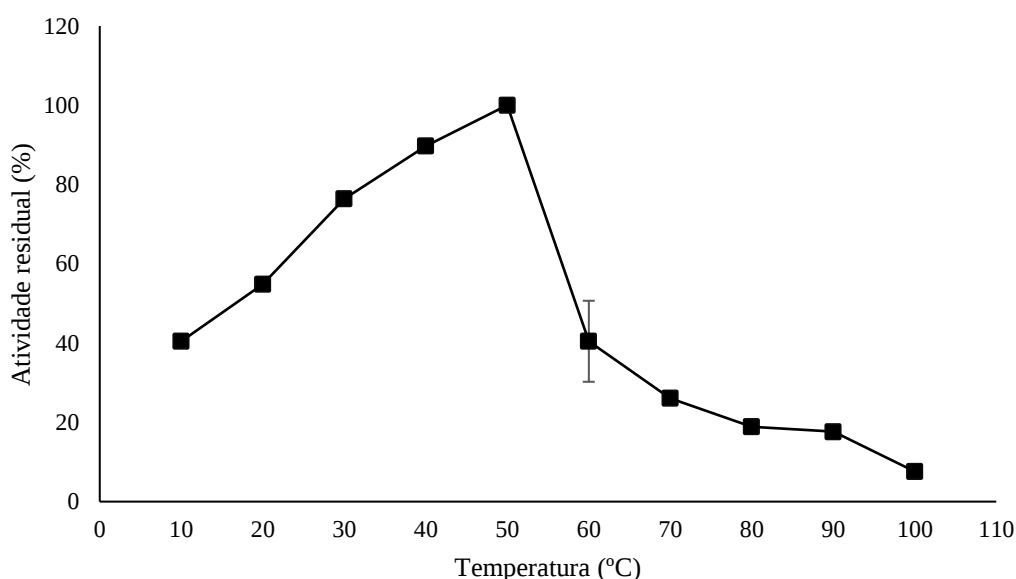


Figura 6 - Efeito da temperatura sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279 e purificada por SDFA.

A atividade residual da protease ficou acima de 80% no intervalo de 30 a 50°C, e em razão do aumento de temperatura (maior ou igual a 60°C) a protease sofreu uma redução da sua atividade devido à desnaturação, seguindo os resultados relatados para outras enzimas fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus ochraceus* (Zhu *et al.*, 2021), *Xylaria curta* (Meshram *et al.*, 2017), *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Nascimento *et al.*, 2016) e *Virgibacillus halodenitrificans* (Montriwong *et al.*, 2012) que observaram perda de atividade semelhante na mesma faixa de temperatura.

Quanto à estabilidade a temperatura, a enzima permaneceu praticamente inalterada em relação a sua atividade enzimática inicial durante 120min de incubação na faixa de temperatura de 50°C, como pode ser observado na Figura 7.

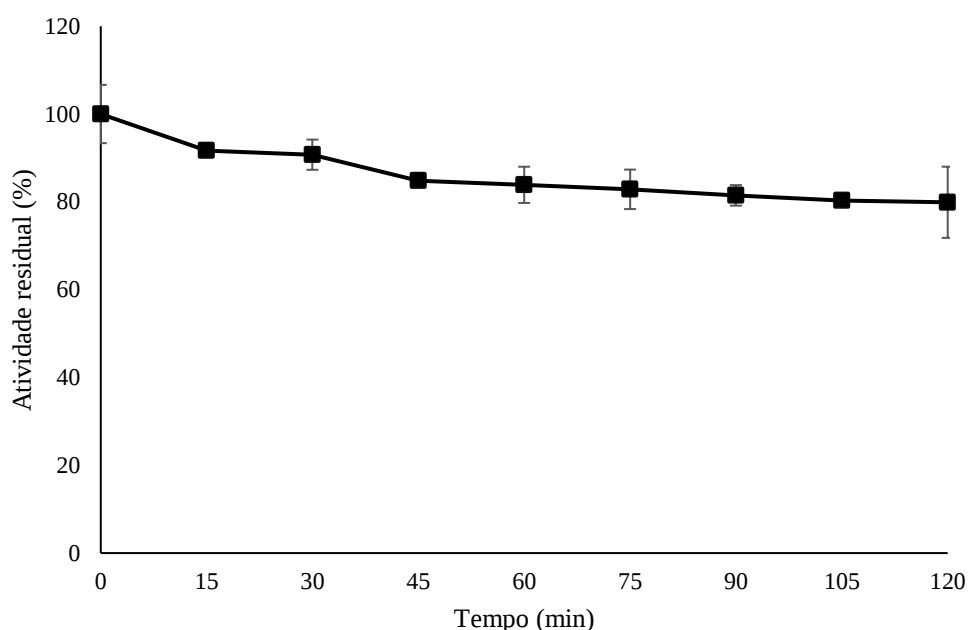


Figura 7 - Estabilidade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP1279 e purificada por SDFA a 50°C.

3.1.2 Influência do pH sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279

Em relação ao efeito do pH, a atividade da enzima produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 atingiu seu valor máximo de 53,06 U/mL em pH 7,0 na presença de tampão Tris-HCl, sugerindo que a enzima é capaz de funcionar bem na faixa do pH fisiológico humano (Figura 8). Resultados semelhantes também foram relatados por outros autores, para uma protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (Alencar *et al.*, 2021), *Bacillus subtilis* DC27 (Hu *et al.*, 2019) *Brevibacillus brevis* (Majumdaar *et al.*, 2014), e pelas espécies fúngicas: *Aspergillus fumigatus* (Hernández-Martínez *et al.*, 2011), *Hericium erinaceum* (Choi *et al.*, 2013), *Rhizopus microsporus* var. *Tuberosus* (Zhang *et al.*, 2015), *Neurospora sitophila* (Lan Liu *et al.*, 2016), e *Cordyceps militaris* (Choi *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017).

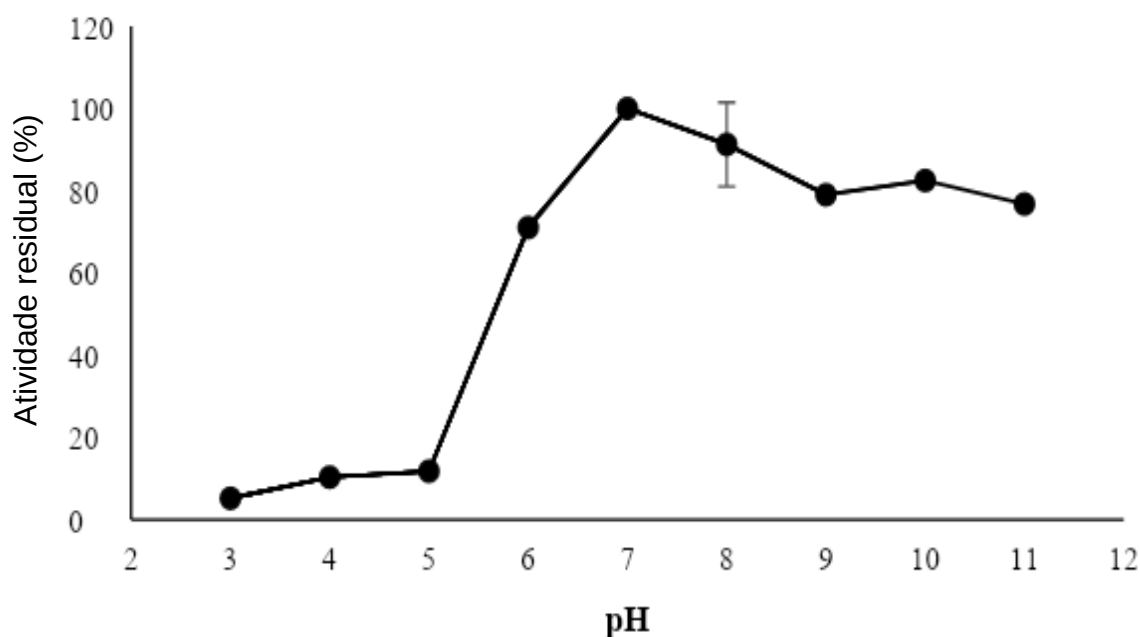


Figura 8 - Influência do pH sobre a atividade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamarai* Kita UCP1279 e purificada por SDFA.

A atividade da protease permaneceu estável no intervalo entre o pH 7,0 a 11, resultado semelhante a Silva *et al.* (2018) e Amaral *et al.* (2020). Entretanto, em pH ácido (<6), nota-se considerável diminuição da atividade enzimática, sendo assim, caracterizada como uma protease neutra a alcalina. A estabilidade do pH da enzima é importante para a caracterização enzimática, antes de ser comercializada. Protease com propriedades alcalinas podem ser utilizadas na indústria de couro, detergentes e indústrias farmacêuticas (Silva *et al.*, 2016). Além disso, a protease demonstrou estabilidade após 36h de exposição, com atividade residual próxima a 100%, como pode ser observado na Figura 9.

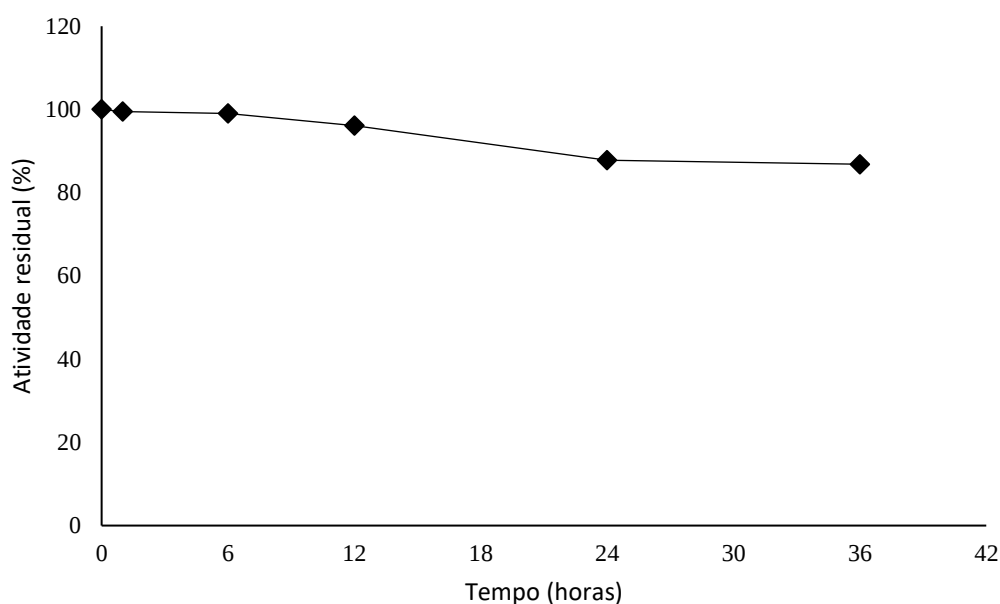


Figura 9 - Estabilidade da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 e purificada por SDFA em pH 7,0.

Ademais, os dados obtidos neste trabalho estão de acordo com Clementino *et al.* (2019), no qual, a protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 utilizando SDFA apresentou temperatura e pH ótimo de 50°C e 7,0 respectivamente. Em outros estudos, utilizando uma protease fibrinolítica produzida por *Petasites japonicus*, os autores obtiveram pH ótimo em torno de 7,0 e em relação à temperatura, conseguiram máxima eficiência com 60°C e estabilidade entre 30°C e 60°C (Kim *et al.*, 2015). Já Patel, Kawale e Sharma (2012) demonstraram que uma serina protease com atividade fibrinolítica de *Euphorbia hirta* apresentou pH e temperatura ideais para a atividade enzimática em pH 7,2 e 50 °C, respectivamente. Tais características físico-químicas se assemelham às apresentadas pela protease fibrinolítica de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279.

3.1.3 Efeito de íons metálicos

O efeito de íons metálicos sobre a atividade enzimática foi avaliado observando-se a atividade residual da protease fibrinolítica purificada utilizando SDFA, visando obter informações sobre a possível ação desses íons como moduladores positivos ou negativos sobre a protease. Verificou-se que a atividade enzimática foi potencializada pela adição de Na⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, K⁺ e um efeito

inibitório na atividade da protease foi observado na presença dos íons Cu^{2+} e Fe^{3+} (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito de íons metálicos (5mM) sobre a atividade proteásica da enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA.

Íons metálicos (5mM)	Atividade residual (%)
Controle	100.00
Cu^{2+}	87,82
Mn^{2+}	103,74
K^{+}	102,99
Zn^{2+}	106,17
Mg^{2+}	105,61
Na^{+}	107,67
Ca^{2+}	98,87
Fe^{2+}	100,37
Fe^{3+}	87,07

Esses dados coincidem com os estudos para a protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus* UCP 1262, que demonstraram aumento da atividade enzimática na presença de Na^{+} Zn^{2+} Mg^{2+} K^{+} na concentração de 5mM (Nascimento *et al.*, 2017) e diminuição parcial da atividade frente a íons de Cu^{2+} e Fe^{3+} (Clementino *et al.*, 2019). Silva, Alves e Porto (2018), encontraram resultados semelhantes com uma protease de *Aspergillus tamaraii* URM 4634, obtida por sistemas de duas fases aquosas, já que Na^{+} e Cu^{2+} foram ativadores e inibidores da atividade enzimática, respectivamente. Ademais, este resultado é consistente com os de outros pesquisadores, que observaram efeitos inibidores do Cu^{2+} na atividade de outras enzimas fibrinolíticas (Nascimento *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016; Meshram *et al.*, 2017; Costa e Silva *et al.*, 2018; Chimbekujwo; Ja'afaru; Adeyemo, 2020; Da Silva *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020). Os íons de Cu^{2+} foram identificados como agentes oxidantes de grupos tiol e a supressão da atividade enzimática por esse íon pode indicar a existência de grupos (-SH) no sítio ativo ou nas proximidades do mesmo, e dessa forma, o Cu^{2+} pode atacar diretamente o (s) resíduo (s) de cisteína para inibir a protease (Karlstrom; Levine, 1991; Balaji *et al.*, 2008; Daroit; Correa; Brandelli, 2009).

3.1.4 Efeito de inibidores

Os efeitos de diferentes inibidores de protease foram investigados (Tabela 2). A atividade enzimática foi fortemente diminuída pelos inibidores típicos de serino protease, PMSF, TPCK e TLCK, apresentando uma atividade residual de 15,95%, 13,58% e 69,29% respectivamente.

Tabela 2: Efeito de inibidores na enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA.

Inibidores (5mM)	Atividade residual (%)
Controle	100,00
β -mercaptoethanol	99,60
EDTA	94,88
Ácido iodoacético	102,95
PMSF	15,95
TPCK	13,58
TLCK	69,29

No entanto, a atividade enzimática não foi afetada por EDTA (94,88%), inibidor de metaloprotease e B-mercaptoetanol (99,6%), inibidor de cisteíno protease. Os resultados desse estudo permitem a identificação da protease obtida pelo *Aspergillus tamarii* Kita e purificada por SDFA como uma serino protease, similar às produzidas por *Bacillus pumilus* MCAS8 (Jayakumar *et al.*, 2012), *Bacillus cereus* FF01 (Majundar *et al.*, 2015) *Neurospora sitophila* (Lan Liu *et al.*, 2016), *Cordyceps militaris* (Liu *et al.*, 2017), *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Nascimento *et al.*, 2016; Clementino *et al.*, 2019), *Bacillus subtilis* DC27 (Hu *et al.*, 2019), *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (Alencar *et al.*, 2021) e *Paenibacillus graminis* (Couto *et al.*, 2022).

Diversos estudos demonstram proteases obtidas de *Aspergillus* identificadas como serino protease com base no seu perfil de inibição: *Aspergillus nidulans* HA-10 (Charles *et al.*, 2008), *Aspergillus oryzae* (Lee *et al.*, 2010; Shirazaka *et al.*, 2012), *Aspergillus flavus* MTCC 9952 (Yadav *et al.*, 2015), *Aspergillus terreus* (Niyonzima; More, 2015) e *Aspergillus ochraceus* (Zhu *et al.*, 2021). Silva *et al.* (2016, 2018) e Amaral *et al.* (2020) comprovaram que proteases fibrinolíticas de *Aspergillus tamarii*

foram fortemente inibidas por fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), sugerido- as como serino protease, assim como verificado neste trabalho para a mesma espécie. De acordo com Sun *et al.* (2016), a maioria das enzimas fibrinolíticas de origem microbiana são pertencentes a esta classe.

A serina protease é um grupo de enzimas proteolíticas que possuem o grupo ativo (OH) do aminoácido serina no sítio catalítico e o PMSF é conhecido por sulfonar irreversivelmente o resíduo essencial de serina no sítio ativo de uma protease, resultando na perda da atividade enzimática (Koffman; Modarress; Bshirelahi, 1991; Costa e Silva *et al.*, 2018). Há uma conexão entre essa classe de proteases e sua afinidade pela fibrina, o componente principal dos coágulos sanguíneos, que é naturalmente degradado pela plasmina, uma serino protease (Barros *et al.*, 2020).

3.1.5 Efeito de surfactantes

Segundo Wang, Wu e Liang (2011) normalmente, as enzimas são desativadas pela introdução de surfactantes na solução de reação, já que esses surfactantes atuam sobre a enzima, promovendo uma modificação em sua estrutura tridimensional, resultando na redução da disponibilidade do substrato. Conforme demonstrado na Tabela 3, a atividade da protease de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 foi moderadamente inibida por Triton X-100 e SDS, com diminuição de 37,66% e 62,35%, respectivamente. No entanto, surfactantes não iônicos como Tween-80 e Tween-20 aumentaram ligeiramente a atividade enzimática.

Tabela 3: Efeito de surfactantes sobre a atividade da protease fibrinolítica de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 e purificada pelo SDFA.

Surfactantes	Atividade residual (%)
Control	100,00
Tween 20	103,10
Tween 80	110,70
SDS	37,65
Triton X-100	62,34

Alencar *et al.* (2021), relatou diminuição da atividade residual para o Triton X-100 e SDS, em um estudo com enzima fibrinolítica de *Streptomyces parvulus* DPUA

1573. Surfactantes não iônicos na maioria dos casos não induzem alterações conformacionais nas proteínas, diferentemente dos surfactantes aniônicos e catiônicos com características desnaturantes (Rocha, 1999).

O SDS, um forte surfactante aniônico, é conhecido por ser um forte desnaturante de proteínas, incluindo proteases. A capacidade desse surfactante de reduzir a atividade enzimática também foi verificada por outros autores (Tremacoldi *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2020; Da Silva *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2021). O seu efeito pode ser atribuído à ação desnaturante relacionada à sua carga líquida negativa, de modo que envolve as moléculas da enzima impedindo sua atividade (Wang; Wu; Liang, 2011). Além disso, entende-se que esse surfactante tem a capacidade de desdobrar a maioria das proteínas através das interações entre o grupo principal carregado do SDS e as cadeias laterais de aminoácidos carregadas positivamente das proteínas (Otzen, 2002).

3.1.6 Atividade amidolítica

A atividade amidolítica da protease fibrinolítica de *A. tamaritii* Kita UCP 1279 foi avaliada usando três tipos diferentes de substratos cromogênicos (Tabela 4). A enzima exibiu maior especificidade para o substrato S-1899 (N-succinil- Gly- Gly- Phe-p-nitroanilida), um substrato típico de quimotripsina e não exibiu afinidade para o substrato B-4875 (N α -benzoil-DL-arginina 4-nitroanilida). Esse resultado sugere que a enzima pode ser considerada uma serino protease semelhante à quimotripsina, resultado similar a outras enzimas fibrinolíticas (Kim *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016; Couto *et al.*, 2022).

Tabela 4: Atividade amidolítica da enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 utilizando substratos cromogênicos típicos por 30 min de incubação.

Substrato	Enzima	Atividade amidolítica
N-Succinyl-Gly-Gly-Phe-p-nitroanilide	Quimotripsina	+++
N-Succinyl-L-phenylalanine-p-nitroanilide	Quimotripsina	+
N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride	Tripsina	-

Em um estudo realizado por Nascimento *et al.* (2016) uma serino protease fibrinolítica de *Mucor subtilissimus*, purificada por sistemas aquosos bifásicos, apresentou atividade amidolítica semelhante à quimotripsina. Características semelhantes também foram relatados para proteases fibrinolíticas obtidas de fungos, como *Mucor subtilissimus* UCP 1262 (Nascimento *et al.*, 2017), *Lyophyllum shimeji* (Moon *et al.*, 2014) e *Neurospora sitophila* (Deng *et al.*, 2018).

3.2 SDS-PAGE E ZIMOGRAMA DE FIBRINA

O SDS-PAGE e zimograma de fibrina foram empregados para verificar o grau de pureza da protease fibrinolítica produzida pelo *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 e que foi preferencialmente particionada na fase rica em sal após extração por SDFA como relatado por Alencar *et al.* (2020). Como mostrado na Figura 10, a massa molecular desta protease foi em torno de 90 kDa, resultado que está de acordo com outras enzimas fibrinolíticas produzidas por fungos como as relatadas para *Mucor subtilissimus* UCP 1262, como peso molecular de 97 kDa (Nascimento *et al.*, 2016) e para proteases de *Schizophyllum commune* BL23 (66-97 kDa) (Pandee *et al.*, 2008) e de *Bionectria* sp. (80-173 kDa) (Rovati *et al.*, 2010), mas significativamente maior do que as relatadas para enzimas fibrinolíticas de *Fusarium* sp. com massa molecular variando de 27 kDa a 32 kDa (Sugimoto *et al.*, 2007), *Rhizopus chinensis* 12 (17–18 kDa) (Xiao-Lan, *et al.*, 2005), *Pleurotus eryngii* (14 kDa) (Cha *et al.*, 2010) e *Schizophyllum commune* (21 kDa) (Lu; Chen; Chen, 2010).

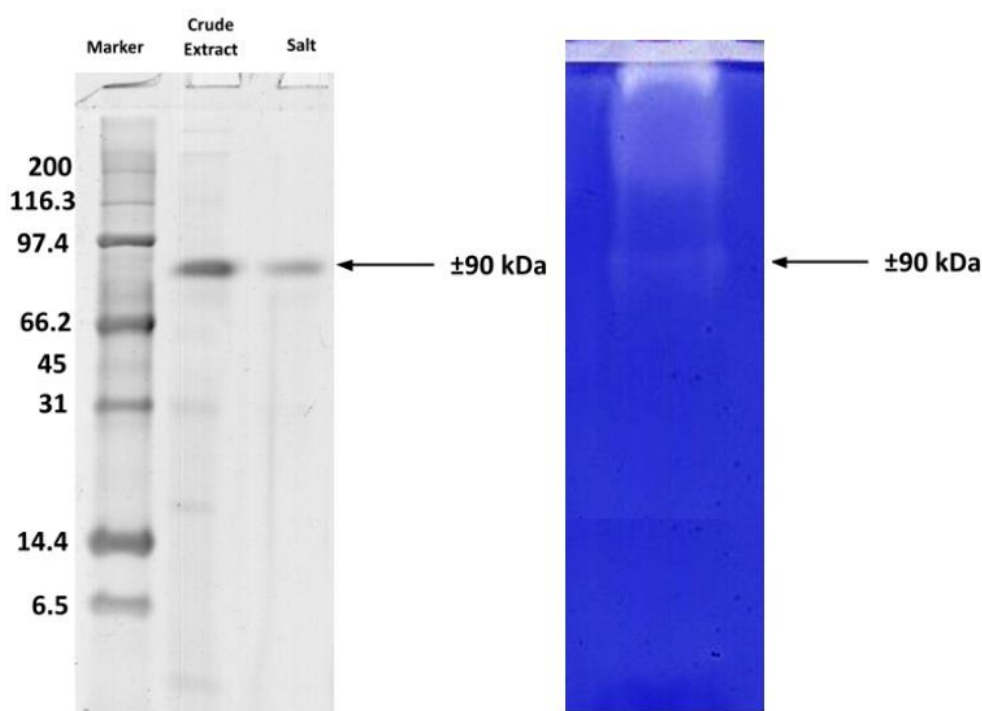


Figura 10: Determinação da massa molecular da protease fibrinolítica de *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279 por SDS-PAGE (12%) e zimograma de fibrina. A – Marcador de massa molecular proteica, B - Extrato Bruto, C – Fase salina, D - Zimograma de fibrina da fase salina.

Silva *et al.* (2018) utilizando análise que seguiu o método de eletroforese SDS-PAGE para uma protease de *Aspergillus tamaris* URM4634 estimou o peso molecular da protease em 49,3 kDa. Outras espécies de *Aspergillus*, como *A. terreus*, *A. oryzae* LK-101 e *A. nidulans* HA-10 apresentaram valores na faixa de 16 a 42 kDa (Niyonzima; More, 2015; Lee *et al.*, 2010; Charles *et al.*, 2008). Proteases fibrinolíticas com menor massa molecular também foram identificadas em bactérias como *Paenibacillus graminis* (50 kDa) (Couto *et al.*, 2022), *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 (42,65 kDa) (Alencar *et al.*, 2021) e *Bacillus tequilensis* (27 kDa) (Xin *et al.*, 2018). Já Baehaki *et al.*, (2012) verificaram uma protease com aproximadamente 124 kDa purificada de *Bacillus licheniformis* F11.4.

A atividade fibrinolítica da protease purificada na fase salina foi confirmada pelo zimograma de fibrina ilustrado na Figura 10. A enzima foi purificada na fase salina, apresentando apenas uma banda, o que comprova a capacidade e eficácia na extração desta protease fibrinolítica. O valor da massa molecular encontrada é

praticamente coincidente com o observado pelo zimograma de fibrina da enzima particionada na fase rica em sal.

3.3 CITOTOXICIDADE

Embora tenham sido publicados muitos estudos descrevendo a purificação e a caracterização bioquímica de enzimas fibrinolíticas microbianas, poucos esforços vêm sendo direcionados para investigar sua toxicidade, no entanto, esse ensaio é primordial para detectar o perfil toxicológico em diferentes linhagens celulares de maneira controlada. Para avaliar o potencial citotóxico da protease fibrinolítica, empregou-se nesse estudo o método de redução de sal de tetrazólio, no qual as células metabolicamente ativas convertem o MTT solúvel em água em um produto insolúvel em água de coloração púrpura (Da Silva *et al.*, 2019).

As linhagens MDA-MB-231 e J774.A1 são amplamente empregadas para avaliar os perfis iniciais de citotoxicidade de moléculas candidatas a fármacos, uma vez que, oferecem informações preliminares sobre potenciais alterações ou toxicidade nos rins e no sistema imunológico, antes mesmo da realização de testes *in vivo*. Os resultados demonstraram que a protease fibrinolítica extraída de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 não apresentou toxicidade, e a viabilidade celular permaneceu acima de 80% durante o intervalo de tempo de 24 horas nas linhagens celulares testadas (Figura 11).

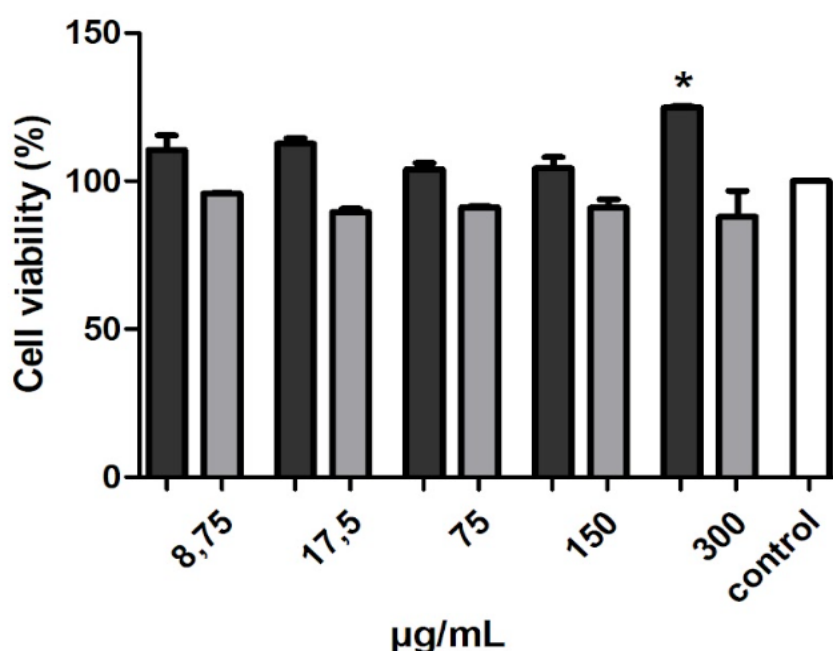


Figura 11: Viabilidade celular da protease fibrinolítica de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 purificada por SDFA frente as células MDA-MB-231 (preto) e J774.A1 (cinza). As diferenças estatísticas com o controle foram determinadas por ANOVA seguida por Bonferroni, *P < 0,05 vs Controle.

Outros estudos corroboram com os achados deste artigo, que também obtiveram resultados de viabilidade celular superior a 80%, ao avaliarem a citotoxicidade de uma protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces* sp. CC5 em células endoteliais da veia umbilical humana (Sun *et al.*, 2016). Da mesma maneira, Da Silva *et al.* (2019), verificaram que a protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262 foi atóxica para linhagem J774A.1 com viabilidade celular nesse mesmo patamar. Dado semelhante também foi demonstrado por Yeon *et al.* (2017), verificando que uma serino protease fibrinolítica extraída de *Lumbrineris nipponica*, não apresentou citotoxicidade frente às células endoteliais.

A utilização de linhagens cancerígenas para verificar a citotoxicidade pode ser relevante na avaliação da segurança de substâncias em pacientes com câncer. Isso ocorre porque existe uma relação direta entre trombose e neoplasia, em que células neoplásicas promovem a ativação das vias de coagulação, levando à formação de coágulos sanguíneos (Mukai; Oka, 2018; Fernandes *et al.*, 2019). Portanto, a investigação da citotoxicidade em células cancerígenas pode ajudar a determinar se uma substância, como uma enzima fibrinolítica, é segura para uso em pacientes com câncer, considerando os riscos potenciais de trombose associados a essa condição médica (Kim; Khorana; McCrae, 2020).

Ainda, a avaliação da citotoxicidade em linhagens tumorais pode analisar a seletividade e o impacto na proliferação celular. Estudos realizados com linhagens tumorais já foram empregados para investigar a citotoxicidade de enzimas fibrinolíticas, como adenocarcinoma do cólon humano (Mukherjee *et al.*, 2012), carcinoma epitelial do colo do útero humano (Majumdar *et al.*, 2015) e carcinoma mamário de camundongo (Da Silva *et al.*, 2019). Verificou-se que nenhuma dessas linhagens tumorais demonstraram toxicidade, assim como observado neste trabalho, além disso, na linhagem MDA-MB-231 não ocorreu proliferação das células tumorais quando exposta a enzima fibrinolítica extraída do *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279.

3.4 INFLUÊNCIA DA PROTEASE FIBRINOLÍTICA PURIFICADA SOBRE OS TEMPOS DE COAGULAÇÃO (TP, TPPA E TT)

A atividade anticoagulante foi avaliada através dos tempos de coagulação: tempo de protrombina (TP) para avaliação das vias extrínsecas e comuns (Tabela 5), tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa), usado na avaliação das vias intrínsecas e comuns da coagulação (Tabela 6) e Tempo de Trombina (TT) que reflete o tempo gasto na conversão do fibrinogênio em proteína fibrosa.

Tabela 5: Tempo de protrombina (TP) em função da concentração da protease fibrinolítica de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279.

TP /Tempo	Controle	2,5 mg/mL	5mg/mL	10 mg/mL
15 minutos	12,8 ± 0,3	12,95 ± 0,35	13,4 ± 0,141	14,15 ± 0,92
45 minutos	13,4 ± 0,1	13,4 ± 0,07	13,55 ± 0,21	13,85 ± 1,48

Tabela 6: Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em função da concentração da protease fibrinolítica de *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279.

TTPa/Tempo	Controle	2,5 mg/mL	5mg/mL	10 mg/mL
15 minutos	27,1 ± 0,9	27,8 ± 1,70	28,45 ± 0,07	28,55 ± 1,34
45 minutos	29,0 ± 0,2	30 ± 1,98	32,1 ± 0,14	34,5 ± 0,42

Quando se trata de enzimas fibrinolíticas é importante avaliar não apenas sua atuação na fibrina, mas também investigar se essas proteases exercem impacto sobre

as enzimas envolvidas na cascata da coagulação sanguínea. Os resultados desses ensaios são determinados pelo método de reconhecimento de coágulos e pelos kits de ensaio utilizados. Conforme mostrado na Tabela 5, houve um discreto prolongamento do TP quando comparado com o grupo controle em ambos os tempos testados. Esse prolongamento foi de 1,10 vezes em comparação ao controle ($12,8 \pm 0,3$) no tempo de 15 minutos para a concentração de 10 mg/mL. Já em relação ao TPPa (Tabela 6), observou-se o prolongamento sobre o tempo de coagulação à medida que aumentou a concentração da enzima, situação evidenciada principalmente com 45 minutos de contato da protease fibrinolítica com o plasma humano, prolongando o TPPa em 1,18 vezes comparando-se o grupo controle ($29,0 \pm 0,2$) e a maior dosagem testada.

No tempo de trombina (TT) foi avaliada se a enzima fibrinolítica produzida pelo *A. tamarii* Kita UCP 1279 altera o tempo necessário para a formação do coágulo após a adição da trombina. Observou-se que não houve interferência sobre a ação da trombina ou do fibrinogênio na formação dos trombos, pois os coágulos foram formados com menos de 1 minuto. Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a protease fibrinolítica prolonga discretamente as vias extrínsecas, vias intrínsecas e comuns de coagulação, mas não afeta a etapa final da coagulação que é a conversão do fibrinogênio em proteína fibrosa.

Poucos estudos foram realizados para verificar o efeito anticoagulante completo de enzimas fibrinolíticas. Alhawiti (2022), verificou a atividade anticoagulante utilizando apenas a avaliação do tempo de tromboplastina parcial ativada (TPPa). Miranda *et al.* (2022) obteve resultados semelhantes para uma serino protease fibrinolítica obtida de *Mucor subtilissimus* UCP 1262, no qual, verificaram um prolongamento significativo sobre o tempo de coagulação do TP e do TPPa conforme o aumento da concentração da enzima. Resultado similar foi encontrado em outro estudo, em que a velefibrinase, uma enzima fibrinolítica de *Bacillus velezensis* Z01 afetou TP, TPPa e TT de maneira dose-dependente (Zhou *et al.*, 2022). A atividade dos anticoagulantes consiste na prevenção da formação de coágulos sanguíneos, enquanto os agentes antiplaquetários e trombolíticos atuam na redução dos coágulos sanguíneos (Ajarem *et al.*, 2021).

A trombose e o sangramento são prevenidos em condições normais pelo equilíbrio entre coagulação e fibrinólise. Qualquer desequilíbrio favorece a coagulação, o que leva à trombose, agregação plaquetária, produção de fibrina e

aprisionamento de glóbulos vermelhos nas artérias ou veias (Altaf; Wu; Kasim, 2021).

Um efeito anticoagulante proeminente foi observado em enzimas fibrinolíticas de *Streptomyces* sp. CC5 (Sun *et al.*, 2016), *Bacillus subtilis* C142 (Choi *et al.*, 2017b) e para a protease-CFR15 produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MCC2606 (Devaraj; Rajender, Halami, 2018) devido ao aumento *in vitro* do tempo de tromboplastina parcial ativada e do tempo de protrombina dependente do tempo e da dose. O provável mecanismo bioquímico para isso é a inibição da conversão de protrombina em trombina, uma etapa crítica na formação de filamentos de fibrina insolúvel e na catálise de outros fatores de coagulação (Jin; Gopinath, 2016).

Os dados obtidos nesse estudo indicam que a protease fibrinolítica de *A. tamarii* Kita UCP 1279 tem discreto potencial para bloquear a ativação da cascata de coagulação inibindo a interação com fatores de coagulação ou até mesmo hidrolisar diretamente a fibrina. Mais investigações podem ser necessárias para esclarecer os mecanismos detalhados de ação desses efeitos.

3.5 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Outro ensaio realizado para verificar a toxicidade da enzima fibrinolítica produzida pelo *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 e purificado pelo SDFA foi a atividade hemolítica. A hemólise é uma condição clínica que pode ser potencialmente grave. De maneira resumida, existem quatro principais causas de lise celular no organismo: imunológica, mecânica, tóxica e infecciosa. Por isso, a avaliação da compatibilidade sanguínea é de extrema importância, uma vez que é fundamental analisar as implicações nas células antes de empregar um biofármaco (Selvakumar *et al.*, 2018; Dara; Sharma; Bhardwa, 2020).

A determinação da atividade hemolítica foi conduzida conforme as diretrizes estabelecidas pela ASTM (Associação Americana para Testes e Padrões de Materiais). Conforme as normas da ASTM, substâncias que demonstram uma taxa de hemólise superior a 5% são categorizadas como hemolíticas, aquelas com uma taxa entre 2% e 5% são consideradas levemente hemolíticas, enquanto as que apresentam uma taxa inferior a 2% não são classificadas como hemolíticas. A enzima fibrinolítica de *A. tamarii* Kita UCP 1279 apresentou um percentual de 0,82; 1,02 e 1,07% de hemólise nas concentrações 2,5; 5 e 10mg/mL respectivamente, demonstrando assim, não ser hemolítica. A visualização do teste hemolítico pode ser verificada na Figura 12.

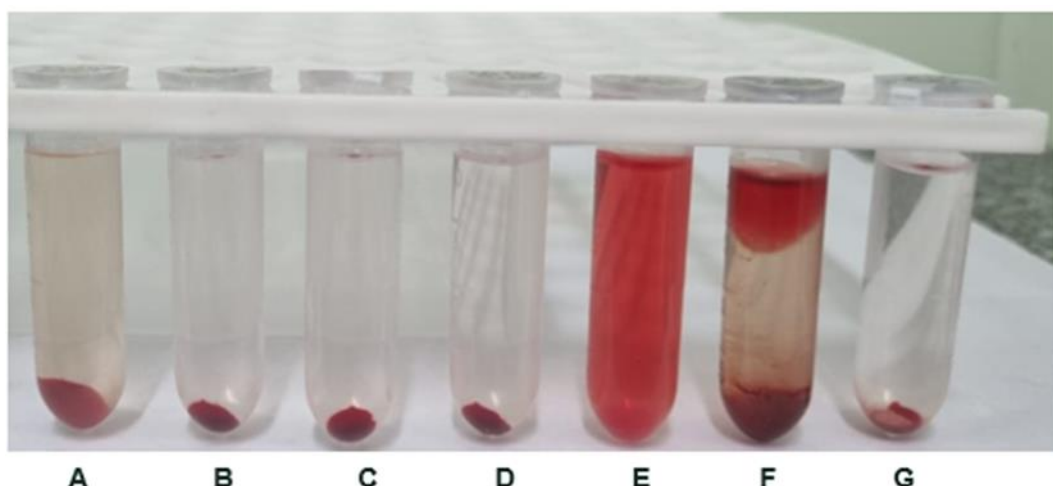


Figura 12: Atividade hemolítica frente a enzima obtida pelo *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 purificada pelo SDFA em diferentes concentrações. A: Enzima pura; B: 2,5mg/ml; C: 5mg/ml; D: 10mg/ml; E e F: Controle positivo; G: Controle negativo.

Outros pesquisadores também investigaram a capacidade de enzimas fibrinolíticas em induzir hemólise. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes ao trabalho de Majumdar *et al.* (2014), que não apresentou atividade hemolítica contra eritrócitos nas concentrações testadas (0–0,5 μ M) da enzima produzida de *Brevibacillus brevis* FF02B. Em outro trabalho, Majumdar *et al.* (2015) também verificou que a enzima fibrinolítica obtida do *Bacillus cereus* FF01 não era hemolítica.

Costa e Silva *et al.* (2018), constataram que a enzima parcialmente purificada de *Chlorella vulgaris* não apresentou uma taxa significativa de hemólise, causando menos de 4% de lise de eritrócitos. Outras enzimas fibrinolíticas de origem microbiana também apresentaram resultados similares, como a enzima do *Mucor subtilisimus* com 2,8% de hemólise (Da Silva *et al.*, 2019) que demonstrou ser levemente hemolítica a 10 mg/mL, enquanto em concentrações mais baixas, o grau de hemólise foi insignificante. Já Mukherjee *et al.* (2012), verificaram que a cepa de *Bacillus* sp. AS-S20-I induziu em 3 % de hemólise dos eritrócitos testados, enquanto o ensaio realizado com o *Bacillus subtilis* LD-8547 (Yuan *et al.*, 2012) apresentou uma taxa hemolítica superior a 5%.

3.6 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

Para verificar o modo de ação da enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 frente ao fibrinogênio humano, produtos de degradação do fibrinogênio foram analisados por SDS-PAGE 12%. A figura 13 exibe a degradação do fibrinogênio em 0, 15, 30, 60, 120, minutos mostrando que a protease não hidrolisou nenhuma das cadeias do fibrinogênio. O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática com um peso molecular de 340 kDa, sintetizada pelo fígado e composta por três subunidades distintas: A α , B β e γ , apresentando massas moleculares de 64, 55 e 47 kDa, respectivamente. Essa molécula desempenha um papel crucial na cascata de coagulação, sendo a última antes da conversão em fibrina mediante a ação da trombina. Sua função essencial reside na promoção da formação do coágulo, contribuindo significativamente para o processo de coagulação (Wang *et al.*, 2011; Simkhada *et al.*, 2012).

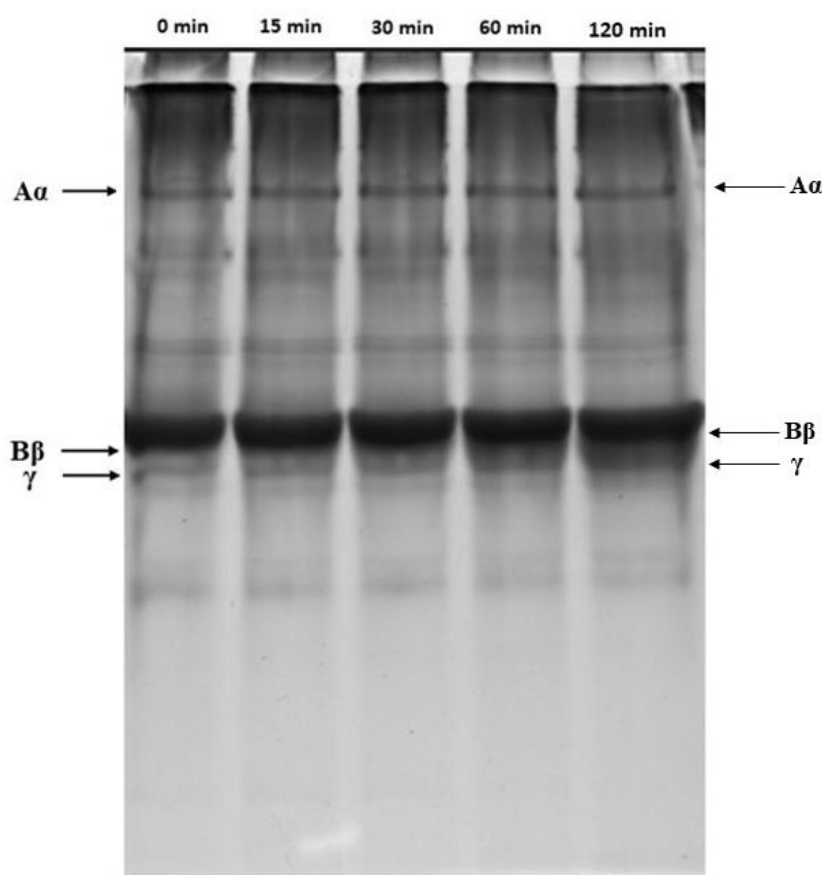


Figura 13: Atividade fibrinogenolítica da protease fibrinolítica obtida do *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 em SDS-PAGE 12%. Cadeias do Fibrinogênio Humano sob ação da protease fibrinolítica por 0, 15, 30, 60 e 120 min de incubação.

Diversos estudos mostram enzimas fibrinolíticas que atuam degradando as cadeias do fibrinogênio em tempos distintos. O padrão de degradação das cadeias não é uniforme, com proteases hidrolisando apenas uma (Da Silva *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021; Couto *et al.*, 2022), duas (Choi *et al.*, 2017b) ou até mesmo as 3 subunidades do fibrinogênio (Deng *et al.*, 2018). Quando há hidrólise do fibrinogênio, ocorre uma redução no estoque de fibrinogênio “*in vivo*”, causando efeito anticoagulante, inibindo a agregação plaquetária, que por consequência reduz a viscosidade do sangue e aumenta o fluxo sanguíneo causando efeito hemorrágico (Henriques; Fonseca, Ramos, 2004).

Assim, a protease de *A. tamarii* Kita UCP 1279 parece ser um agente fibrinolítico de ação direta na fibrina, pois não degradou o fibrinogênio e, portanto, não tem efeito anticoagulante. Ademais, esse resultado vai ao encontro com os dados obtidos na determinação dos tempos de coagulação, evidenciado pelo baixo ou nulo efeito anticoagulante e não alterando o tempo de trombina (TT), no qual é influenciado pela concentração de fibrinogênio e pela presença de inibidores da formação da fibrina. Essa característica configura uma vantagem sobre os ativadores de plasminogênio, como Estreptoquinase, Uroquinase e o fator tecidual do plasminogênio (tPA), os quais promovem efeito hemorrágico.

3.7 DEGRADAÇÃO TROMBOLÍTICA *IN VITRO*

Coagulação e fibrinólise são mecanismos distintos que coexistem e se desenvolvem simultaneamente proporcionando um equilíbrio dinâmico contínuo entre ambos (Langer; Wolosker, 2006). A formação de coágulos desempenha um papel fundamental na contenção de sangramentos excessivos de feridas e lesões, atuando como um mecanismo de proteção. Esse processo pode ser resumido de maneira concisa em três etapas fundamentais: inicialmente, a ruptura do vaso sanguíneo desencadeia a formação de um complexo de substâncias chamado ativador de protrombina; em seguida, o ativador de protrombina catalisa a transformação da protrombina em trombina; por último, a trombina converte o fibrinogênio em filamentos de fibrina, que cercam as plaquetas, eritrócitos e o plasma, resultando na formação do coágulo sanguíneo (Guyton; Hall, 2017).

A remoção de fibrina e coágulos sanguíneos, por sua vez, fica a cargo do sistema fibrinolítico. No entanto, o acúmulo de fibrina nos vasos sanguíneos pode

levar à obstrução do fluxo sanguíneo e está associado ao surgimento de doenças cardiovasculares, resultando em complicações clínicas graves (Choi *et al.*, 2011). Infelizmente, o sistema de coagulação sanguínea também pode levar a coágulos indesejados nos vasos sanguíneos (trombose patológica), que é uma das principais causas de morte e incapacidade em muitos pacientes (Ariens, 2016).

Os resultados desse trabalho mostraram que a enzima fibrinolítica produzida pela *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 degradou parte do trombo *in vitro* após 90 minutos de contato com a enzima. A degradação trombolítica tanto pelo extrato bruto quanto pela protease fibrinolítica purificada por SDFA, resultou em taxas de degradação de 53,44% e 38,81%, respectivamente, confirmando a redução no volume e peso dos trombos (Figura 14).

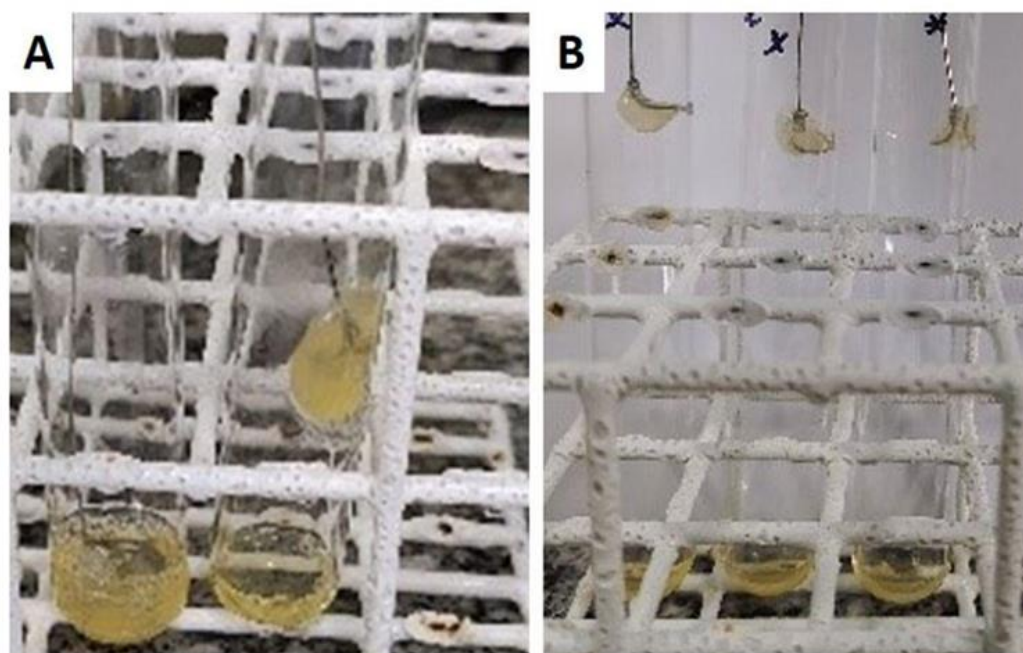


Figura 14: Degradação trombolítica *in vitro* da enzima fibrinolítica de *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279. (A) trombo inicial (0 minutos); (B) trombo degradado após 90 minutos em contato com a enzima.

Estudos semelhantes também demonstraram a eficácia de enzimas fibrinolíticas na degradação de trombos sanguíneos, como da enzima produzida pelo *Paenibacillus graminis*, que revelou uma degradação do coágulo sanguíneo de 36,72% pela ação do extrato bruto e 46,96% pela ação da enzima purificada também por SDFA (Couto *et al.*, 2022). Ahamed *et al.* (2022) avaliou o potencial trombolítico através de um experimento *in vitro* da enzima fibrinolítica produzida pela *Brevibacterium* sp. confirmando a hidrólise do coágulo sanguíneo de fibrina. Atividade

semelhante também foi verificada na serino protease fibrinolítica produzida pela cepa *Bacillus* sp. AS-S20-I, que demonstrou propriedades trombolíticas ao promover a lise de coágulos em um estudo *in vitro* (Mukherjee *et al.*, 2012). Ainda, a hidrólise do coágulo *in vitro* pela ação da enzima fibrinolítica produzida por microrganismos do gênero *Bacillus* também foi relatada em outros estudos (Mahajan; Nayak.; Lele, 2012; Yuan *et al.*, 2012; Vijayaraghavan *et al.*, 2016).

Diante disso, pode-se observar que a degradação do trombo *in vitro* verificado nesse estudo foi superior ao observado na redução do volume do coágulo em um ensaio realizado por Nighat *et al.* (2020), que utilizando extratos de *Bacillus clausii* KP10 relataram um percentual de 35,16%. Da mesma maneira, na protease fibrinolítica extraída do *Mucor subtilissimus*, que obteve uma degradação de 32,18% (Da Silva *et al.*, 2022) e da protease da *Chlorella vulgaris*, que apresentou 25,6% de degradação do coágulo *in vitro* no período de 90 minutos (Costa e Silva *et al.*, 2018). Segundo Prasad *et al.* (2006), a lise de coágulos sanguíneos *in vitro* é um método confiável para avaliar as atividades trombolíticas dos agentes fibrinolíticos produzidos por microrganismos. Portanto, o potencial da protease fibrinolítica de *A. tamaraii* Kita UCP 1279 encontrada neste estudo, pode ter algumas aplicações clínicas úteis para prevenir trombose e outras doenças relacionadas

3.8 EFEITOS DA ALBUMINA SÉRICA SOBRE A ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Estudos realizados por Anderson e Anderson (1977) e Adkins *et al.*, (2002) comprovaram que o plasma sanguíneo humano contém uma quantidade de proteínas normalmente em torno de 60-85 mg por mL, dentre essas destacam-se: a albumina (~55%), a globulina (~38%), o fibrinogênio (~7%), pro-enzimas e inibidores de protease (menos de 1%). A ação das proteases fibrinolíticas pode ser afetada por todos esses componentes citados acima que estão presentes no plasma sanguíneo, sendo assim, resolvemos analisar os efeitos da albumina na atividade enzimática da protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus tamaraii* Kita UCP 1279 purificada pelo SDFA. O resultado obtido demonstrou que houve influência da albumina sobre a atividade fibrinolítica da enzima purificada, promovendo um aumento dessa atividade em 31,70%. Estes dados são discordantes com os apresentados por Park *et al.*, (2013) que na presença de BSA, observaram uma redução da atividade enzimática das três enzimas fibrinolíticas estudadas tendo uma média de 77,5% de redução em comparação com o controle sem a presença da albumina.

CONCLUSÃO

No presente estudo foi possível observar que a serino protease fibrinolítica do tipo quimotripsina produzida por *Aspergillus tamaritii* Kita UCP 1279 e purificada por sistema de duas fases aquosas, mostrou potencial para atuar como futuro candidato a possível agente trombolítico, uma vez que não apresentou citotoxicidade, nem alterou os parâmetros de coagulação. Todos os aspectos bioquímicos foram caracterizados evidenciando a estabilidade dessa enzima, que possui boa atividade fibrinolítica, não promoveu a lise das células sanguíneas e não apresentou a atividade fibrinogenolítica. Isso reforça a possível utilização desta enzima em diversas aplicações médicas, abrindo perspectivas para possibilidade da sua aplicação como uma nova droga trombolítica.

REFERÊNCIAS

- ADKINS, J. N. *et al.* Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 1, n. 12, p. 947-955, 2002. Doi: 10.1074/mcp.m200066-mcp200.
- AFONSO, A. *et al.* A terapêutica antitrombótica: atual e em desenvolvimento. **Angiologia e Cirurgia Vascular**, v. 12, n. 3, p. 170–179, 2016. Doi: 10.1016/j.ancv.2016.08.001.
- AHAMED, N. A. *et al.* In vitro thrombolytic potential of fibrinolytic enzyme from *Brevibacterium* sp. isolated from the root of the plant, *Aloe castellorum*. **Journal of King Saud University-Science**, v. 34, n. 3, p. 101868, 2022. Doi: 10.1016/j.jksus.2022.101868.
- AJAREM, J. S. *et al.* Benign synthesis of cobalt oxide nanoparticles containing red algae extract: antioxidant, antimicrobial, anticancer, and anticoagulant activity. **Journal of Cluster Science**, p. 1-12, 2021. Doi: 10.1007/s10876-021-02004-9.
- ALBUQUERQUE, K. K. S. A. *et al.* Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101453, 2020. Doi: 10.1016/j.bcab.2019.101453.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Partição de proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamarii* k1a UCP 1279 através do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato. In: NETO, B. R. S. (Org.) **Projetos Inovadores e Produção Intelectual na Microbiologia**. 1. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2020. p. 118–129. Doi: 10.22533/at.ed.74720171112.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Purification and Characterization of Fibrinolytic Protease from *Streptomyces parvulus* by Polyethylene Glycol-Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. 1–17, 2021. Doi: 10.1590/0001-3765202120210335.
- ALHAWITI, A. S. Citric acid-mediated green synthesis of selenium nanoparticles: antioxidant, antimicrobial, and anticoagulant potential applications. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-10, 2022. Doi: 10.1007/s13399-022-02798-2.
- ALTAF, F.; WU, S.; KASIM, V. Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, p. 680397, 2021. Doi: 10.3389/fmolb.2021.680397.
- AMARAL, Y. M. S. *et al.* Production, extraction, and thermodynamics protease partitioning from *Aspergillus tamarii* K1a UCP1279 using PEG/sodium citrate aqueous two-phase systems. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 50, n. 6, p. 619-626, 2020. Doi: 10.1080/10826068.2020.1721535.

ANDERSON, L.; ANDERSON, N. G. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5421-5425, 1977. Doi: 10.1073/pnas.74.12.5421.

ANDRADE, P. B.; BORGES, L. S. R. Antiplaquetários nas síndromes coronarianas agudas. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, v. 30, p. 442-451, 2017. Doi: 10.5935/2359-4802.20170058.

ARIENS, R. A. S. Novel mechanisms that regulate clot structure/function. **Thrombosis research**, v. 141, p. S25-S27, 2016. Doi: 10.1016/S0049-3848(16)30358-9.

BAEHAKI, A. *et al.* Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11. 4. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2373-2379, 2012. Doi: 10.5897/AJMR11.1379.

BALAJI, S. *et al.* Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2741-2745, 2008. Doi: 10.1007/s11274-008-9782-7.

BARROS, P. D. S. *et al.* Fibrinolytic enzyme from *Arthrospira platensis* cultivated in medium culture supplemented with corn steep liquor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3446-3453, 2020. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.217.

BATISTA, J. M. S. *et al.* Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase-rich extract produced by *Aspergillus tamaris* Kita UCP1279. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 26, p. 101647, 2020. Doi: 10.1016/j.bcab.2020.101647.

BRAY, M. A. *et al.* Microvascular thrombosis: experimental and clinical implications. **Transl Res.**, v. 225, p. 105-130, 2020. Doi: 10.1016/j.trsl.2020.05.006.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Protease with fibrinolytic and collagenolytic activity produced by *Aspergillus ochraceus* URM604. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e15511225500, 2022. Doi: 10.33448/rsd-v11i2.25500.

CHA, W. S. *et al.* Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource technology**, v. 101, n. 16, p. 6475-6481, 2010. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.048.

CHANG, A. K. *et al.* *Vibrio vulnificus* secretes a broad-specificity metalloprotease capable of interfering with blood homeostasis through prothrombin activation and fibrinolysis. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 6909-6916, 2005. Doi: 10.1128/JB.187.20.6909.

CHARLES, P. *et al.* Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 5, p. 347-352, 2008. Doi: 10.1002/jobm.200800043.

CHIMBEKUJWO, K. I.; JA'AFARU, M. I.; ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2. **Scientific African**, v. 8, p. e00398, 2020. Doi: 10.1016/j.sciaf.2020.e00398.

CHOI, B. S. *et al.* Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 3, p. 609-622, 2013. Doi: 10.1007/s12010-013-0206-2.

CHOI, D. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3279-3285, 2011. Doi: 10.1016/j.biortech.2010.10.002.

CHOI, J. H. *et al.* Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 539-546, 2017a. Doi: 10.1080/10826068.2016.1181083.

CHOI, J. H. *et al.* Purification and partial characterization of a low molecular fibrinolytic serine metalloprotease C142 from the culture supernatant of *Bacillus subtilis* C142. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 724-731, 2017b. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.025.

CHOI, J. H. *et al.* Thrombolytic, anticoagulant and antiplatelet activities of codiase, a bi-functional fibrinolytic enzyme from *Codium fragile*. **Biochimie**, v. 95, p. 1266–1277, 2013. Doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.023.

CLEMENTINO, E. L. *et al.* Integrated production and purification of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 553-562, 2019. Doi: 10.1590/1678-4162-9495.

COSTA E SILVA, P. E. *et al.* In Vitro Thrombolytic Activity of a Purified Fibrinolytic Enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p. 524-529, 2018. Doi: 10.1016/j.jchromb.2018.04.040.

COSTA, B. A. M. *et al.* Extraction of collagenolytic proteases from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in an aqueous two-phase system for application in collagen hydrolysis. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 1, p. 1-13, 2023. Doi: 10.1080/10826068.2023.2263870.

COUTO, M. T. T. *et al.* Production, Extraction and Characterization of a Serine Protease with Fibrinolytic, Fibrinogenolytic and Thrombolytic Activity Obtained by *Paenibacillus Graminis*. **Process Biochemistry**, v. 118, p. 335–345, 2022. Doi: 10.1016/j.procbio.2022.05.005.

DA SILVA, A. V. *et al.* Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 27, p. 101669, 2020. Doi: 10.1016/j.bcab.2020.101669.

DA SILVA, M. M. *et al.* Effect of acute exposure in swiss mice (*Mus musculus*) to a fibrinolytic protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262: An histomorphometric, genotoxic and cytological approach. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 103, p. 282-291, 2019. Doi: 10.1016/j.yrtph.2019.02.009.

DA SILVA, M. M. *et al.* Immobilization of fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in magnetic nanoparticles. **Protein Expression and Purification**, v. 192, p. 106044, 2022.

DARA, R. C.; SHARMA, R.; BHARDWAJ, H. Severe drug-induced immune hemolysis due to ceftriaxone. **Asian Journal of Transfusion Science**, v. 14, n. 2, p. 187, 2020. Doi: 10.4103/ajts.AJTS_67_17.

DAROIT, D. J.; CORREA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 358-363, 2009. Doi: 10.1016/j.ibiod.2008.11.008.

DENG, Y. *et al.* A dual-function chymotrypsin-like serine protease with plasminogen activation and fibrinolytic activities from the GRAS fungus, *Neurospora sitophila*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1338-1343, 2018. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.142.

DEVARAJ, Y.; RAJENDER, S. K.; HALAMI, P. M. Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Bacillus amyloliquefaciens* MCC2606 and analysis of fibrin degradation product by MS/MS. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 172-180, 2018. Doi: 10.1080/10826068.2017.1421964.

DIENES, D. *et al.* Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1087-1094, 2007. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2006.08.013.

DIWAN, D. *et al.* Thrombolytic Enzymes of Microbial Origin: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10468, 2021. Doi: 10.3390/ijms221910468.

FERNANDES, C. J. *et al.* Cancer-associated thrombosis: the when, how and why **European Respiratory Review**, v. 27-28, n. 151, p. 180119, 2019. Doi: 10.1183/16000617.0119-2018.

GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, p. 522-526, 1979. Doi: 10.1128/aac.15.4.522.

GUYTON, A. C. HALL, J. E. **Tratado De Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2017. p. 475-485.

HENRIQUES, E. S.; FONSECA, N.; RAMOS, M. J. On the modeling of snake venom serine proteinase interactions with benzamidine-based thrombin inhibitors. **Protein science**, v. 13, n. 9, p. 2355-2369, 2004. Doi: 10.1110/ps.04746804

- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. *et al.* Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011. Doi: 10.1016/j.procbio.2011.07.013.
- HU, Y. *et al.* Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 9235, 2019. Doi: 10.1038/s41598-019-45686-y.
- JAYAKUMAR, R. *et al.* Characterization of thermostable serine alkaline protease from an alkaliphilic strain *Bacillus pumilus* MCAS8 and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 7, p. 1849-1866, 2012. Doi: 10.1007/s12010-012-9902-6.
- JIANG, Q. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Whitmania pigra* Whitman. **Protein Expression and Purification**, v. 174, p. 105680, 2020. Doi: 10.1016/j.pep.2020.105680.
- JIN, N. Z.; GOPINATH, S. C. B. Potential blood clotting factors and anticoagulants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 356-365, 2016. Doi: 10.1016/j.biopha.2016.09.057.
- KARLSTRÖM, A. R.; LEVINE, R. L. Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 88, n. 13, p. 5552-5556, 1991. Doi: 10.1073/pnas.88.13.5552.
- KIM, A. S.; KHORANA, A. A.; MCCRAE, K. R. Mechanisms and biomarkers of cancer-associated thrombosis. **Translational Research**, v. 225, p. 33-53, 2020. Doi: 10.1016/j.trsl.2020.06.012.
- KIM, D. W. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Petasites japonicus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1159-1167, 2015. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.09.046.
- KIM, S. H. CHOI, N. S.; LEE, W. Y. Fibrin Zymography: A Direct Analysis of Fibrinolytic Enzymes on Gels. **Analytical Biochemistry**, v. 263, p. 115-116, 1998. Doi: 10.1006/abio.1998.2816.
- KIM, W. *et al.* Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme Produced from *Bacillus* Sp. Strain CK 11-4 Screened from Chungkook-Jang. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2482-2488, 1996. Doi: 10.1128/aem.62.7.2482-2488.1996.
- KOFFMAN, B.; MODARRESS, K. J.; BASHIRELAHI, N. The effects of various serine protease inhibitors on estrogen receptor steroid binding. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 5, p. 569-574, 1991. Doi: 10.1016/0960-0760(91)90314-U.

KUMAR, S. S.; HARIDAS, M.; ABDULHAMEED, S. A novel fibrinolytic enzyme from marine *Pseudomonas aeruginosa* KU1 and its rapid in vivo thrombolysis with little haemolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 470–479, 2020. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.06.178.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. Doi: 10.1038/227680a0.

LAN LIU, X. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from the food-grade fungus, *Neurospora sitophila*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 134, p. 98-104, 2016. Doi: 10.1016/j.molcatb.2016.10.006.

LANGER, B.; WOLOSKE, M. Coagulação e fibrinólise: idéias atuais e suas aplicações clínicas. **Revista de Medicina**, v. 85, n. 4, p. 157-164, 2006. Doi: 10.11606/issn.1679-9836.v85i4p157-164.

LEE, S. K. *et al.* Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 327-334, 2010. Doi: 10.1007/s10068-010-0047-5.

LI, G. *et al.* A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 168, p. 631-639, 2021. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.118.

LIU, X. *et al.* Biochemical characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Cordyceps militaris*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 793-801, 2017. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.048.

LU, C. L.; CHEN, S.; CHEN, S. N. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Schizophyllum commune*. **Journal of Food and Drug analysis**, v. 18, n. 2, p. 4, 2010. Doi: 10.38212/2224-6614.2283.

MAHAJAN, P. M.; NAYAK, S.; LELE, S. S. Fibrinolytic enzyme from newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* ICTF-1: Media optimization, purification and characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 307-314, 2012. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.023.

MAJUMDAR, S. *et al.* Antiplatelet and Antithrombotic Activity of a Fibrin (ogen) olytic Protease from *Bacillus cereus* strain FF01. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 477-489, 2015. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.04.075.

MAJUMDAR, S. *et al.* Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochimie**, v. 103, p. 50-60, 2014. Doi: 10.1016/j.biochi.2014.04.002.

MESHRAM, V. *et al.* Production, Purification and Characterisation of a Potential Fibrinolytic Protease from Endophytic *Xylaria curta* by Solid Substrate Fermentation.

Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 181, p. 1496–1512, 2017. Doi: 10.1007/s12010-016-2298-y.

MIRANDA, V. M. A. M. *et al.* Evaluation of Partial Thromboplastin Time, Thrombin Time and Prothrombin Time over Treated Plasma Using a Fibrinolytic Protease. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e15311225439-e15311225439, 2022. Doi: 10.33448/rsd-v11i2.25439.

MONTRIWONG, A. *et al.* Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 2379-2387, 2012. Doi: 10.1016/j.procbio.2012.09.020.

MOON, S. M. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic α chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 5, p. 544-550, 2014. Doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.10.019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

MUKAI, M.; OKA, T. Mechanism and management of cancer-associated thrombosis. **Journal of Cardiology**, v. 72, n. 2, p. 89-93, 2018. Doi: 10.1016/j.jjcc.2018.02.011.

MUKHERJEE, A. K. *et al.* Bafibrinase: A non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus* sp. strain AS-S20-I exhibits in vivo anticoagulant activity and thrombolytic potency. **Biochimie**, v. 94, n. 6, p. 1300-1308, 2012. Doi: 10.1016/j.biochi.2012.02.027.

NASCIMENTO, B. R. *et al.* Carga de Doenças Cardiovasculares Atribuível aos Fatores de Risco nos Países de Língua Portuguesa: Dados do Estudo “Global Burden of Disease 2019”. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 118, p. 1028-1048, 2022a. Doi: 10.36660/abc.20210680

NASCIMENTO, J. C. S. *et al.* Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 6, p. e41311628994, 2022b. Doi: 10.33448/rsd-v11i6.28994.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 3, n. 3, p. 81-91, 2015. Doi: 10.4236/aer.2015.33009.
NASCIMENTO, T. P. *et al.* Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262: Evaluation of several specific protease activities and purification of a fibrinolytic enzyme. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, n. 4, 2020. Doi: 10.1590/0001-3765202020200882.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016. Doi: 10.1016/j.jchromb.2016.04.046.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 8, p.1209-1219, 2017. Doi: 10.1007/s00449-017-1781-3.

NIGHAT, F. *et al.* Cytotoxic, α -amylase inhibitory and thrombolytic activities of organic and aqueous extracts of *Bacillus clausii* KP10. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, n. 1, 2020. Doi: 10.36721/PJPS.2020.33.1.REG.135-139.1.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. **3 Biotech**, v. 5, p. 61-70, 2015. Doi: 10.1007/s13205-014-0200-6.

OLIVEIRA, M. C. L. *et al.* Lovastatin producing by wild strain of *Aspergillus terreus* isolated from Brazil. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 164-172, 2021. Doi: 10.1080/10826068.2020.1805624.

OTZEN, D. E. Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. **Biophysical Journal**, v. 83, n. 4, p. 2219-2230, 2002. Doi: 10.1016/S0006-3495(02)73982-9.

PANDEE, P. *et al.* Production and properties of a fibrinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. **Journal Science Technology**, v. 30, p. 447-453, 2008.

PARK, J. W. *et al.* Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 979-987, 2013. Doi: 10.1016/j.procbio.2013.03.017.

PATEL, G. K.; KAWALE, A. A.; SHARMA, A. K. Purification and physicochemical characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from latex of a medicinal herb *Euphorbia hirta*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 104-111, 2012. Doi: 10.1016/j.plaphy.2011.12.004.

PRASAD, S. *et al.* Development of an in vitro model to study clot lysis activity of thrombolytic drugs. **Thrombosis Journal**, v. 4, p. 1-4, 2006. Doi: 10.1186/1477-9560-4-14.

RAJENDRAN, K. *et al.* Evaluation of cytotoxicity of hematite nanoparticles in bacteria and human cell lines. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 157, p. 101-109, 2017. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.052.

ROCHA, F. T. B. *et al.* Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by

solid state fermentation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20200867, 2021. Doi: 10.1590/0001-3765202120200867.

ROCHA, J. M. S. Aplicações de agentes tensoativos em biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, v. 64, p. 5-11, 1999.

ROTH, G. A. *et al.* Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 76, n. 25, p. 2982-3021, 2020. Doi: 10.1016/j.jacc.2020.11.010.

ROVATI, J. I. *et al.* A novel source of fibrinolytic activity: *Bionectria* sp., an unconventional enzyme-producing fungus isolated from Las Yungas rainforest (Tucumán, Argentina). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 55-62, 2010. Doi: 10.1007/s11274-009-0142-z.

SELVAKUMAR, P. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Acalypha hispida* and its application in blood compatibility. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 182, p. 52-61, 2018. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2018.03.018.

SHARMA, C. *et al.* Thrombolytic potential of novel thiol-dependent fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* RSA1. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2019. Doi: 10.3390/biom10010003.

SHIRASAKA, N. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 354-364, 2012. Doi: 10.1007/S10267-011-0179-3.

SILVA, O. S. *et al.* Novel protease from *Aspergillus tamaris* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, n. 04, p. 125-143, 2016. Doi: 10.4236/aer.2016.44012.

SILVA, O. S. *et al.* Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaris* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1081-1088, 2018. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.002.

SILVA, O. S.; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamaris* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 209-216, 2018. Doi: 10.1016/j.bcab.2018.08.001.

SIMKHADA, J. R. *et al.* Purification, biochemical properties and antithrombotic effect of a novel *Streptomyces* enzyme on carrageenan-induced mice tail thrombosis model. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 2, p. 176-182, 2012. Doi: 10.1016/j.thromres.2011.09.014.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985. Doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.

SUGIMOTO, S. *et al.* The fibrinolytic activity of a novel protease derived from a tempeh producing fungus, *Fusarium* sp. BLB. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2184-2189, 2007. Doi: 10.1271/bbb.70153.

SUN, Z. *et al.* A fibrinolytic protease AfeE from *Streptomyces* sp. CC5, with potent thrombolytic activity in a mouse model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 346-354, 2016. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.12.059.

TAIPA, M. A.; FERNANDES, P.; CARVALHO, C. C. C. R. Production and Purification of Therapeutic Enzymes. *In*: LABROU, N. (Ed.). **Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications**. Athens: Springer, p. 1-24, 2019.

TREMACOLDI, C. R. *et al.* Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 295-299, 2007. Doi: 10.1007/s11274-006-9211-8.

VIJAYARAGHAVAN, P. *et al.* Cow dung is a novel feedstock for fibrinolytic enzyme production from newly isolated *Bacillus* sp. IND7 and its application in in vitro clot lysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 361, 2016. Doi: 10.3389/fmicb.2016.00361.

VIJAYARAGHAVAN, P.; VINCENT, S. G. P. Statistical Optimization of Fibrinolytic Enzyme Production Using Agroresidues by *Bacillus cereus* IND1 and Its Thrombolytic Activity In Vitro. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, p. 725064, 2014. Doi: 10.1155/2014/725064.

WANG, S. *et al.* A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 18-25, 2011. Doi: 10.1016/j.cbpb.2011.01.004.

WANG, S. L.; WU, Y. Y.; LIANG, T. W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 196-202, 2011. Doi: 10.1016/j.nbt.2010.09.003.

XIAO-LAN, L. *et al.* Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 209-214, 2005. Doi: 10.1007/s00253-004-1846-5.

XIN, X. *et al.* Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from a bacterium isolated from soil. **3 Biotech**, v. 8, p. 1-8, 2018. Doi: 10.1007/s13205-018-1115-4.

YADAV, S. K. *et al.* Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 667-677, 2015. Doi: 10.1016/j.bcab.2015.08.007.

YANG, L. *et al.* Study of cardiovascular disease prediction model based on random forest in eastern China. **Scientific Reports**, v. 10, p. 5245, 2020. Doi: 10.1038/s41598-020-62133-5.

YEON, S. J. *et al.* Purification of serine protease from polychaeta, *Lumbrineris nipponica*, and assessment of its fibrinolytic activity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 53, p. 494-501, 2017. Doi: 10.1007/s11626-017-0137-2.

YUAN, J. *et al.* Thrombolytic effects of Douchi Fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* LD-8547 *in vitro* and *in vivo*. **BMC biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-9, 2012. Doi: 10.1186/1472-6750-12-36.

ZHANG, S. *et al.* Purification and Characterization of a Fibrinolytic Enzyme from *Rhizopus microsporus* var. *tuberosus*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, p. 243-248, 2015. Doi: 10.17113/ftb.53.02.15.3874.

ZHOU, Y. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from marine *Bacillus velezensis* Z01 and assessment of its therapeutic efficacy *in vivo*. **Microorganisms**, v. 10, n. 5, p. 843, 2022. Doi: 10.3390/microorganisms10050843.

ZHU, X. *et al.* Isolation and characterization of an activator-dependent protease from *Aspergillus ochraceus* screened from low denatured defatted soybean meal and the proteolysis of soy proteins. **LWT**, v. 150, p. 112026, 2021. Doi: 10.1016/j.lwt.2021.112026.

5 CONCLUSÃO GERAL

A protease fibrinolítica obtida pelo *Aspergillus tamarii* Kita UCP 1279 e purificada utilizando o sistema de duas fases aquosas (PEG/Fosfato) foi caracterizada bioquimicamente, sendo classificada como uma serino protease do tipo quimotripsina, constatado na realização da atividade amidolítica, classe enzimática compatível com demais estudos realizados para enzimas fibrinolíticas. Ainda, apresentou um pH ótimo de 7,0 permanecendo estável por 36 horas e temperatura ótima de 50 °C, estável por 120 minutos.

O peso molecular desta protease identificada seguindo o método de eletroforese SDS-PAGE foi em torno de 90 kDa e a atividade fibrinolítica na enzima purificada na fase salina foi confirmada pelo zimograma de fibrina. A atividade da enzima foi aumentada pela adição dos íons Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ e surfactantes não iônicos como Tween-80 e Tween-20. Entretanto, teve sua ação inibida na presença dos íons Cu^{2+} e Fe^{3+} e de agentes surfactantes como o Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio (SDS), com diminuição de 37,66 e 62,35%, respectivamente. Essas características físico-químicas coincidem com outros estudos, o que torna essa enzima um produto desejável para futuras aplicações industriais.

Na degradação trombolítica *in vitro*, houve uma degradação do trombo sanguíneo pela ação do extrato bruto e da protease fibrinolítica purificada. Adicionalmente, não foi observado ação na atividade fibrinogenolítica pela enzima, permanecendo as frações α , β e γ do fibrinogênio humano. Ademais, quanto aos parâmetros hematológicos avaliados, essa enzima promoveu um discreto prolongamento do tempo de protrombina quando comparado com o grupo controle, e em relação ao tempo de protrombina parcialmente ativada, observou-se um prolongamento do tempo de coagulação à medida que aumentou a concentração da enzima. Já em relação ao tempo de trombina, não houve interferência sobre a ação da trombina ou do fibrinogênio na formação dos trombos.

Quanto a toxicidade da enzima, ela se mostrou biocompatível com as hemácias sanguíneas, não promovendo hemólise acima do desejável e no ensaio de citotoxicidade, a protease foi considerada atóxica para as linhagens celulares testadas. Por fim, foi verificado que em contato com albumina a enzima teve um aumento da sua atividade em 31,70%.

Os achados dessa pesquisa evidenciam o potencial do microrganismo *Aspergillus tamaritii* Kita UCP1279 para a produção de uma protease fibrinolítica, com possível aplicação como agente trombolítico, entretanto, são necessários ainda a realização de estudos futuros visando suas aplicações *in vivo*. Pois, quando se trata de enzimas fibrinolíticas é importante avaliar não apenas sua atuação na remoção do coágulo de fibrina, mas também, investigar se essas proteases exercem impacto sobre as demais enzimas envolvidas na cascata de coagulação, alterações nos parâmetros bioquímicos no organismo, análise de aspectos histomorfométricos de órgãos envolvidos nesse processo, como também, testes de ensaio do cometa e o de micronúcleo para verificar possíveis danos no DNA dos eritrócitos.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO PUBLICADA EM PERIÓDICOS E CONGRESSOS

- Participação como coautor em artigos publicados:

MIRANDA, V. M. A. M.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; COSTA, R. M. P. B.; LEITE, A. C. L.; OLIVEIRA, V. M.; BATISTA, J. M. S.; PASTRANA, L.; NASCIMENTO, T. P.; PORTO, A. L. F. Evaluation of Partial Thromboplastin Time, Thrombin Time and Prothrombin Time over Treated Plasma Using a Fibrinolytic Protease. Research, Society and Development, v. 11, n. 2, p. e15311225439-e15311225439, 2022. Doi: 10.33448/rsd-v11i2.25439.

- Livros publicados:

COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; MARQUES, D. A. V.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; CARDOSO, K. B. B.; SILVA, M. R. O. B.; NASCIMENTO, M. C.; NASCIMENTO, T. P. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE - Volume III. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2023. 107 p. ISBN: 978-65-5889-589-3. DOI: 10.46898/rfb.97bbdb0e-c3f2-4562-9502-0769182ec0bd.

PORTO, A. L. F.; SANTANA, B. F. M.; MARQUES, D. A. V.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; CARDOSO, K. B. B.; SILVA, M. R. O. B.; COSTA, R. M. P. B.; NASCIMENTO, T. P. BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA - Volume 2. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. 54 p. ISBN: 978-65-5889-381-3. DOI: 10.46898/rfb.9786558893813.

PORTO, A. L. F.; MARQUES, D. A. V.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; CARDOSO, K. B. B.; SILVA, M. R. O. B.; NASCIMENTO, M. C.; COSTA, R. M. P. B.; NASCIMENTO, T. P. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE - Volume 2. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. 58 p. ISBN: 978-65-5889-375-2. DOI: 10.46898/rfb.9786558893752.

PORTO, A. L. F.; SANTANA, B. F. M.; MARQUES, D. A. V.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; CARDOSO, K. B. B.; SILVA, M. R. O. B.; COSTA, R. M. P. B.; NASCIMENTO, T. P. BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA - Volume 1. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. 56 p. ISBN: 978-65-5889-378-3. DOI: 10.46898/rfb.9786558893783.

- Participação em capítulos de livros publicados:

FREITAS, K. H.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; NASCIMENTO, T. P.; SILVA, M. J. C.; OLIVEIRA, F. J. P.; SA, R. D.; OLIVEIRA, G. T. C.; SANTANA, B. F. M.; MAGGI, S. C. ATUAÇÃO DO FARMACÊUTICO NOS DISTÚRBIOS DO SONO EM IDOSOS E O USO IRRACIONAL DOS MEDICAMENTOS BENZODIAZEPÍNICOS: UMA REVISÃO NARRATIVA. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE - Volume III. 1. ed. Belém: RBF Editora, 2023, p. 73-101. DOI: 10.46898/rfb.9786558895893.4

BARBOSA FILHO, J. P. M.; BRANDAO FILHO, J. O. C.; VIEIRA, D. D. S.; SANTANA, J. C.; MIRANDA, V. M. A. M.; NASCIMENTO, T. P. ABORDAGEM EPIDEMIOLÓGICA E HISTÓRICA DO GÊNERO ENTAMOEBA. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE. 1. ed. Belém: RBF Editora, 2022. p. 21-30. DOI: 10.46898/rfb.9786558892335.2

BARBOSA FILHO, J. P. M.; BRANDAO FILHO, J. O. C.; MIRANDA, V. M. A. M.; DINIZ, M. A.; SILVA, M. R. O. B.; COSTA, R. M. P. B.; NASCIMENTO, T. P. ATUAÇÃO DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA NO BRASIL: ASPECTOS HISTÓRICOS E SUA CONTRIBUIÇÃO PARA A SAÚDE. BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA - Volume 1. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. p. 11-26.

BARBOSA FILHO, J. P. M.; SILVA, M. R. O. B.; BRANDAO FILHO, J. O. C.; MIRANDA, V. M. A. M.; NASCIMENTO, T. P.; MARQUES, D. A. V.; COSTA, R. M. P. B. ACANTHAMOEBA: ASPECTOS HISTÓRICOS E CLÍNICOS DE UMA AMEBA DE VIDA LIVRE. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE - Volume 2. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. p. 12-18. DOI: 10.46898/rfb.9786558893752.1

SILVA, I. M. S.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; CAVALCANTE JUNIOR, J. P.; CAMPOS, T. A.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; COUTO, M. T. T.; SOBRAL, R. V. S.; NASCIMENTO, T. P.; LEITE, A. C. L. MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA G: UMA BREVE REVISÃO. BIOTECNOLOGIA NA SAÚDE - Volume 2. 1. ed. Belém: RFB Editora, 2022. p. 39-54. DOI: 10.46898/rfb.9786558893752.3.

- Participação em resumos publicados em congressos:

BARBOSA FILHO, J. P. M.; SOBRAL, R. V. S.; ALENCAR, V. N. E. S.; MIRANDA, V. M. A. M.; SILVA, M. M.; BATISTA, J. M. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P.; LEITE, A. C. L. AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO TROMBOLÍTICA, ATIVIDADE ANTICOAGULANTE E HEMOLÍTICA DE UMA PROTEASE FIBRINOLÍTICA OBTIDA PELO FUNGO *Aspergillus tamarit*. *In*: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.

BARBOSA FILHO, J. P. M.; MIRANDA, V. M. A. M.; RODRIGUES, C. H.; SANTOS, E. C. F.; GARCIA, J. E.; SILVA, S. M.; SANTANA, P. R.; NASCIMENTO, T. P. ANÁLISE DO DESCARTE DE MEDICAMENTOS VENCIDOS NA REGIÃO DE TUPARETAMA (PERNAMBUCO). *In*: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.

CARDOSO, K. B. B.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; MIRANDA, V. M. A. M.; BATISTA, J. M. S.; NASCIMENTO, T. P.; COSTA, R. M. P. B. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DE UMA PROTEASE COLAGENOLÍTICA IMOBILIZADA EM FILME DE QUITOSANA PARA FUTURA APLICAÇÃO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS. *In*: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.

COSTA, R. M. P. B.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; FREITAS, K. H.; PORTO, A. L. F.; CARDOSO, K. B. B.; BATISTA, J. M. S.; NASCIMENTO, T. P. ISOLAMENTO E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE CELULASES ORIUNDAS *Fusarium moniliforme*. *In*: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.

NASCIMENTO, T. P.; CARDOSO, K. B. B. ; BARROS, A. C. S. ; SILVA, M. J. C.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; PORTO, A. L. F. Efeito da radiação gama sobre uma protease fibrinolítica produzida por um fungo isolado de solo da Caatinga e o efeito de cofatores sobre a atividade enzimática pós-irradiação. *In*: I Congresso Nacional de Ciências Aplicada à Farmácia, 2023. Anais do I Congresso Nacional de Ciências Aplicada à Farmácia, 2023.

BARBOSA FILHO, J. P. M.; SOBRAL, R. V. S.; ALENCAR, V. N. S.; SILVA, M. M.; BATISTA, J. M. S.; COSTA, R. M. P. B.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P.; LEITE, A. C. L. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ATIVIDADE CITOTÓXICA DE UMA PROTEASE FIBRINOLÍTICA OBTIDA POR UM FUNGO ISOLADO DA CAATINGA. *In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023, Recife. Anais do I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023.*

SOBRAL, R. V. S.; REGUEIRA, B. V. B.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; ALENCAR, V. N. S.; SILVA, A. V.; OLIVEIRA, J. P.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P.; LEITE, A. C. L. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA OBTIDA POR *Bacillus megaterium* ISOLADA DA CANA DE AÇÚCAR. *In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023, Recife. Anais do I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023.*

ALENCAR, V. N. S.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; SOBRAL, R. V. S.; BATISTA, J. M. S.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P.; LEITE, A. C. L. AVALIAÇÃO DE UMA ENZIMA FIBRINOLÍTICA QUANTO A INFLUÊNCIA SOBRE OS TEMPOS DE COAGULAÇÃO E ATIVIDADE HEMOLÍTICA. *In: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023, Recife. Anais do I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023.*

COSTA, E. R.; PINHEIRO, L. F. C.; SILVA, G. K. C.; SILVA, R. A.; SILVA, N. A.; SOUSA, T. O.; SILVA, S. C.; SCHWARZ, D. G. G.; FARIAS, M. P. O.; MIRANDA, V. M. A. M.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P. EXTRAÇÃO DE UMA PROTEASE COM ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA ORIUNDA DA CASTANHA DE *Dipteryx lacunifera* DUCKE (FAVA DO MORCEGO) E AVALIAÇÃO DE SUA TOXICIDADE. *In: Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023. Anais do Congresso CFF de Ciências Farmacêuticas - Edição Natal-RN, 2023.*

SOUSA, T. O.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; COSTA, T. B.; SILVA, H. F.; SANTOS, A. M. G.; NASCIMENTO, T. P. APLICAÇÃO DE PROTEASES ORIUNDAS DE *Trichoderma orientale* ISOLADO DO CERRADO PIAUIENSE NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Urochloa brizantha* cv. MARANDÚ. *In: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023, Recife. Anais do VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023.*

PINOTTI, T. I.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; LOPES, M. S. L.; SANTOS, A. M. G.; OLIVEIRA, R. P.; NASCIMENTO, T. P. AVALIAÇÃO DO EXTRATO DE *Trichoderma orientale* FERMENTADO EM CASCAS DE LARANJAS FRENTE A BACTÉRIAS ISOLADAS DE UM HOSPITAL VETERINÁRIO. *In*: VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023, Recife. Anais do VII Encontro Pernambucano de Micologia, 2023.

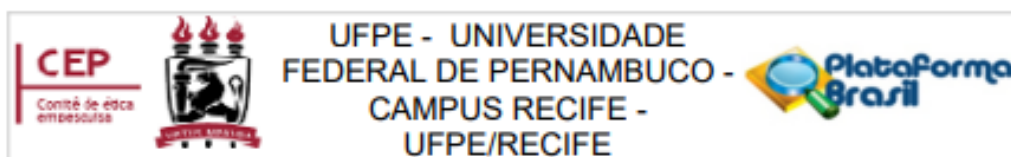
PINHEIRO, L. F. C.; RAMOS, E. R. M.; MONTE, D. L.; COSTA, T. B.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; SILVA, S. C.; NASCIMENTO, T. P. EXTRAÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES DO LEITE BOVINO OBTIDAS DA CASTANHA DE *Dipteryx lacunifera* (FAVA DO MORCEGO). *In*: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023, Recife. Anais do I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023.

SILVA, G. K. C.; SILVA, R. A.; COSTA, E. R.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; COSTA, R. M. P. B.; PORTO, A. L. F.; SILVA, S. C.; NASCIMENTO, T. P. POTENCIAL DA CASCA DA CASTANHEIRA DO GURGUEIA (*Dipteryx lacunifera*) COMO FONTE DE ENZIMAS COAGULANTE DO LEITE. *In*: I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023, Recife. Anais do I Simpósio Pernambucano de Práticas Inovadoras em Saúde, 2023.

RAMOS, A. V. S.; GUIMARAES, K. S.; SOUSA, T. O.; SILVA, L. C. A.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; BATISTA, J. M. S.; COSTA, R. M. P. B.; SCHWARZ, D. G. G.; FARIAS, M. P. O.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. P. F.; SANTOS, A. M. G.; NASCIMENTO, T. P. PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES DO LEITE POR UM FUNGO ISOLADO DO ECÓTONO CERRADO-CAATINGA PIAUIENSE, UTILIZANDO RESÍDUOS E CO-PRODUTOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO. *In*: 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023, Foz do Iguaçu. Anais do 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023.

REGIS, V. G. V. A.; MIRANDA, V. M. A. M.; **BARBOSA FILHO, J. P. M.**; CARDOSO, K. B. B.; BATISTA, J. M. S.; PORTO, A. L. F.; NASCIMENTO, T. P.; COSTA, R. M. P. B. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS OBTIDAS POR UM FUNGO FILAMENTOSO UTILIZANDO BORRA DE CAFÉ COMO SUBSTRATO. *In*: II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022, Foz do Iguaçu. Anais do II Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 2022.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS (CEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, *Bacillus megaterium* IPA CC65 e *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279

Pesquisador: VIVIANE DO NASCIMENTO E SILVA ALENCAR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 63547722.6.0000.5208

Instituição Proponente: Centro de Biosciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.844.143

Apresentação do Projeto:

O projeto "Produção, purificação, caracterização e aplicação de proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, *Bacillus megaterium* IPA CC65 e *Aspergillus tamarii* kita UCP 1279" trata-se de um projeto de Doutorado, do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, da Universidade Federal de Pernambuco, de Viviane do Nascimento e Silva Alencar, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, contando com a participação de José Pedro Martins Barbosa Filho e Renata Vitória da Silva Sobral. Neste projeto de pesquisa investiga-se novas enzimas de origem microbianas com atividade fibrinolíticas. Essas enzimas podem vir a serem usadas futuramente como agentes trombolíticos. A maioria dos agentes trombolíticos atualmente disponíveis apresentam baixa especificidade pela fibrina, o que propicia uma maior probabilidade de efeitos adversos hemorrágicos, além de possuírem um custo elevado. Portanto, com a realização do estudo haverá a possibilidade de se obter enzimas fibrinolíticas específicas produzidas por novas fontes com propriedades benéficas, como alta especificidade de substrato e baixo custo de produção.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 04 de Janeiro de 2023

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br