



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Maria Clara do Nascimento

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA**

1573

Recife

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Maria Clara do Nascimento

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA**

1573

Monografia apresentada como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas de acordo com as exigências, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra

Coorientadora: Dra. Juanize Matias da Silva Batista

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D631p do Nascimento, Maria Clara
PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS
PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 / Maria Clara do Nascimento. - 2021.
68 f. : il.
- Orientadora: Raquel Pedrosa Bezerra.
Coorientadora: Juanize Matias da Silva Batista.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.
1. Biotecnologia. 2. Streptomycetaceae. 3. Trombólise. I. Bezerra, Raquel Pedrosa, orient. II. Batista, Juanize Matias da Silva, coorient. III. Título

CDD 574

Maria Clara do Nascimento

**PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEASES FIBRINOLÍTICAS PRODUZIDAS POR *Streptomyces parvulus* DPUA
1573**

Monografia apresentada como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas de acordo com as exigências, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra

Coorientadora: Dra. Juanize Matias da Silva Batista

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raquel Pedrosa Bezerra
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Dr. Thiago Pajeú Nascimento
(Universidade Federal do Piauí)

Dra. Márcia Nieves Caarneiro da Cunha
(Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Recife

2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Ivete, Rosalina e Gilvan, “*in Memoriam*”, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me propor forças e sabedoria para caminhar nessa trajetória tão extensa e árdua, pois certamente sem sua benção não seria eu, a vitoriosa hoje.

Gostaria de deixar registrado também o meu reconhecimento à minha mãe, Maria Auxiliadora do Nascimento, mãe solo, guerreira e vitoriosa, pois acredito que sem o apoio, ensinamentos e persistência seria muito difícil vencer esse desafio. E aos demais da minha família, que sempre acreditaram em mim e sempre me consideraram como uma mulher inteligente e vitoriosa obrigada, Luanna, Carol, Tê, Diana, Jaidete, Jéssica, Jair e Marcelo por todo o apoio e incentivo compartilhados.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Raquel, a Profa. Dr. Ana Lúcia Figueiredo Porto, aos meus coorientadores tão queridos e aperreados por mim Juanize e Thiago, as minhas colegas de bancada Julyanne e Viviane que sempre sorriram e choraram a comigo a cada experimento concluído com sucesso e aqueles que deram tanto trabalho e resultados negativos, pela sabedoria com que me guiaram nesta trajetória e por serem pontos cruciais e essências a profissional que me torno hoje.

Aos meus colegas de faculdade, Nilson, Eduarda, Yanara, Uelliton, Letícia, Paulo e Rinaldo por nunca me deixarem desistir de algo na faculdade ou na vida, por toda os elogios, incentivos, conversas e almoços tão divertidos no R.U., a todo carinho dado e pelo apoio tão recíproco a cada obstáculo que enfrentamos ao longo desses anos. Sucesso meus queridos biólogos e engenheiro de pesca!

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do meu pensamento e de minha gratidão. Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

"Há biologia em tudo, mesmo quando você está se sentindo espiritual"

- Helen Fisher

RESUMO

Devido ao seu potencial de degradação da fibrina, as proteases fibrinolíticas são uma alternativa promissora na indústria farmacêutica para o tratamento de doenças cardiovasculares, especialmente a trombose. Diversas são as fontes de proteases fibrinolíticas, porém, as fontes microbianas são as que mais se destacam em termos de baixo custo e altos índices de produção. Desde a sua produção até aplicação as enzimas precisam passar por diversos processos, o que soa negativo tornando as etapas mais custosas e tardias. Um método capaz de superar essas problemáticas é o sistema de duas fases aquosas (SDFA), processo capaz de diminuir as etapas do *downstream*. O objetivo deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar bioquimicamente a protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. A protease foi produzida por fermentação submersa utilizando resíduos ou coprodutos agroindustriais. O extrato bruto que apresentou a maior atividade enzimática (farinha da casca de maracujá) foi submetido a extração por SDFA constituído por polietilenoglicol (PEG) e sais de fosfato (potássio e sódio), seguindo um planejamento 2⁴. Após a extração por SDFA, a protease foi submetida a purificação por cromatografia em gel filtração, e já purificada teve sua caracterização bioquímica realizada. A protease produzida por *S. parvulus* DPUA 1573 demonstrou atividade fibrinolítica de 15.46 U/mL e foi capaz de formar um halo de 317.31 mm² agindo na degradação da fibrina. No SDFA, a protease fibrinolítica particionou preferencialmente para a fase rica em PEG. O melhor ensaio selecionado de acordo com a combinação do maior índice de atividade específica, fator de purificação e rendimento na atividade foi o 16, composto por PEG 8.000 gmol⁻¹, 17,5 v/v de PEG, pH 8,0 e 15 v/v de sais de fosfato. A atividade proteásica da enzima foi muito estimulada na presença do ferro, chegando a um aumento de 55% na atividade, e drasticamente diminuída diante o inibidor de proteases 2-mercaptoethanol (91%). A temperatura e o pH ótimo para a atividade enzimática foram 40°C e pH 7,0, respectivamente, se mantendo a atividade da enzima estável entre 30°C e 60°C e na faixa de pH de 7.0 a 8.5. Diante dos resultados analisados foi visto que, *S. parvulus* DPUA 1573 se mostrou uma boa produtora de proteases fibrinolíticas, e o sistema de duas fases aquosas PEG/Fosfato se mostrou uma ótima alternativa para a extração e pré-purificação de proteases fibrinolíticas.

Palavras-chave: Biotecnologia; Streptomycetaceae; Trombólise.

ABSTRACT

Due to their fibrin degradation potential, fibrinolytic proteases are a promising alternative in the pharmaceutical industry for the treatment of cardiovascular diseases, especially thrombosis. There are several sources of fibrinolytic proteases, however, the microbial sources are the ones that stand out in terms of low cost and high production rates. From their production to application, enzymes need to go through several processes, which sounds negative, making the steps more costly and late. A method capable of overcoming these problems is the aqueous two-phase system (SDFA), a process capable of reducing downstream steps. The objective of this work was to produce, purify and biochemically characterize the fibrinolytic protease produced by *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. The protease was produced by submerged fermentation using agro-industrial waste or co-products. The crude extract that showed the highest enzymatic activity (passion fruit peel flour) was subjected to extraction by SDFA consisting of polyethylene glycol (PEG) and phosphate salts (potassium and sodium), following a 2⁴ plan. After extraction by SDFA, the protease was subjected to purification by gel filtration chromatography, and already purified had its biochemical characterization performed. The protease produced by *S. parvulus* DPUA 1573 showed fibrinolytic activity of 15.46 U/mL and was able to form a halo of 317.31 mm² acting on fibrin degradation. In SDFA, the fibrinolytic protease partitioned preferentially to the PEG-rich phase. The best assay selected according to the combination of the highest specific activity index, purification factor and activity yield was 16, composed of PEG 8,000 gmol⁻¹, 17.5 v/v PEG, pH 8.0 and 15 v/v of phosphate salts. The protease activity of the enzyme was highly stimulated in the presence of iron, reaching a 55% increase in activity, and drastically decreased in the presence of the protease inhibitor 2-mercaptoethanol (91%). The optimum temperature and pH for the enzymatic activity were 40°C and pH 7.0, respectively, keeping the enzyme activity stable between 30°C and 60°C and in the pH range from 7.0 to 8.5. Based on the analyzed results, it was seen that *S. parvulus* DPUA 1573 proved to be a good producer of fibrinolytic proteases, and the PEG/Phosphate aqueous two-phase system proved to be a great alternative for the extraction and pre-purification of fibrinolytic proteases.

Keywords: Biotechnology; Streptomycetaceae; Thrombolysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.....	17
Figura 2 - Esquema de atuação dos agentes fibrinolíticos.....	23
Figura 3 - Esquema demonstrando a atuação das proteases (protrombina, trombina e plasmina) na cascata de coagulação clássica.....	25
Figura 4 - Ciclo reprodutivo de <i>Streptomyces sp.</i>	29
Figura 5 - Etapas do bioprocesso para produção de um biofármaco.....	32
Figura 6 - Esquema padrão do sistema de duas fases aquosas composto por polímero, sal e água.	33
Figura 7 - Representação esquemática dos possíveis comportamentos da partição das biomoléculas no SDFA.....	34
Figura 8 - Gráfico de Pareto apresentando a influência das variáveis no coeficiente de partição (K).....	45
Figura 9 - Gráfico cubo apresentando os efeitos da massa molar e concentração de PEG (MPEG; CPEG%) e concentração do fosfato de sódio (Cfosfato) sobre o fator de purificação (FP) na fase PEG do SDFA.	46
Figura 10 - Cromatograma das proteases fibrinolíticas produzidas por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 e extraídas por SDFA PEG-Fosfato.....	47
Figura 11 - Determinação da massa molecular da protease fibrinolítica por SDS-PAGE (12%) com marcador de massa molecular da proteína (Precision Plus Protein Dual Color Standards).	48
Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade proteolítica da enzima.....	50
Figura 13 - Estabilidade da atividade da protease a 40°C.	50
Figura 14 - Efeito do pH na atividade proteásica da enzima.....	51
Figura 15 - Estabilidade da atividade proteásica da enzima em pH 7,0.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Espécies de microrganismos produtores de proteases com atividade fibrinolítica. .28	
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^4 para a extração de proteases fibrinolíticas produzidas por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1279, através do sistema de duas fases aquosas PEG/sais de fosfato.36	
Tabela 3 - Produção de enzimas fibrinolíticas por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 utilizando diferentes substratos agroindustriais em fermentação submersa.42	
Tabela 4 - Partição das proteases fibrinolíticas produzidas por <i>Streptomyces parvulus</i> DPUA 1573 através do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.43	
Tabela 5 - Efeito de íons, surfactantes e inibidores sobre a atividade proteásica da enzima. ..49	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. HEMOSTASIA	16
2.2. TROMBOSE	19
2.3. PROTEASES FIBRINOLÍTICAS	24
2.4. <i>Streptomyces sp.</i>	28
2.5. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	31
3. OBJETIVOS	35
3.1. GERAL	35
3.2. ESPECÍFICOS	35
4. METODOLOGIA	36
4.1. MICRORGANISMO	36
4.3. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	36
4.4. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO	38
4.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	38
4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL	39
4.7. ATIVIDADE PROTEÁSICA	39
4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA	39
4.9. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA ENZIMA E TEMPERATURA ÓTIMA	40

4.10.	EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA E pH ÓTIMO.....	41
4.11.	INFLUÊNCIA DE ÍONS, INIBIDORES E SURFACTANTES	41
4.12.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
5.	RESULTADOS.....	42
5.1.	SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS	42
5.2.	SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)	43
5.3.	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA	46
5.4.	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	48
6.	DISCUSSÃO	52
7.	CONCLUSÃO	56
8.	REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

A trombose é uma doença cardiovascular caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma das três variações conhecidas como Tríade de Virchow: alterações hemodinâmicas, hipercoagulabilidade e paredes vasculares ou cardíacas modificadas. O trombo, massa sólida formada durante o processo da trombose é composto principalmente por plaquetas e uma rede de fibrina, quando formado o trombo causa uma interrupção no fluxo normal do sangue gerando complicações como a obstrução do vaso sanguíneo, processo denominado embolia. A formação do trombo pode ocorrer em veias ou artérias, podendo ou não desencadear o aparecimento de sintomas como rubor, dor e calor na região onde está localizado o trombo (GOMES, 2018). Considerada um problema de saúde pública, os atuais fármacos utilizados no tratamento da trombose apresentam intensos efeitos colaterais e alto custo, levando a um crescimento na procura de compostos que atuem diretamente no trombo e que supram as desvantagens dos fármacos já disponíveis no mercado (NASCIMENTO et al., 2016). Dentre as possíveis alternativas, ganham destaque as enzimas da classe das proteases.

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de proteínas. Foram as primeiras enzimas a serem biotecnologicamente exploradas e até os dias atuais são utilizadas na produção de detergentes, na indústria de alimentos e fármacos (GURUMALLESH *et al.*, 2019). No mercado global industrial de enzimas, elas caracterizam uma visão positiva no setor financeiro, já que o mercado está projetado para atingir US \$ 10,519 milhões em 2024, registrando uma taxa de crescimento anual composta de 5,7% de 2018 a 2024 (PORTLAND, 2018). As enzimas proteolíticas com atividade fibrinolítica são capazes de degradar a fibrina, rede que envolve os demais componentes do trombo, e vêm sendo estudada como uma alternativa na terapia trombolítica. Essas enzimas podem ser extraídas de diversas fontes como plantas, animais, fungos, microalgas e bactérias. No entanto, microrganismos são cada vez mais utilizados por apresentarem satisfatoriamente fácil manuseio, baixo custo e alto índice de produção, o que é essencial para o sucesso do índice de produção em escala industrial (DORNBUSCH et al. 2000; GURUMALLESH et al., 2019).

Para serem utilizadas com êxito, biomoléculas produzidas por microrganismos devem passar por um bioprocessamento, conjunto de técnicas que envolvem resumidamente o planejamento, purificação e caracterização do bioativo até sua aplicação biotecnológica. Em alguns casos, restrições técnicas e econômicas transformam esses métodos em obstáculos gerando a necessidade de diminuir as etapas do bioprocessamento para que seu tempo seja otimizado, assim também como seu custo. Como alternativa de extração, pré-purificação ou partição de biomoléculas em uma única etapa, apresentando baixo custo, alta eficiência e de curto prazo destaca-se o sistema de duas fases aquosas (SDFA) (ZYDNEY, 2016).

O sistema de duas fases aquosas possui alto nível de água o que não permite a desnaturação das moléculas, característica que o torna mais interessante voltada a sua aplicação biotecnológica. O SDFA pode ser composto por dois polímeros ou por um polímero, sal e água, sendo essa última a mais adotada. Um dos polímeros mais utilizado é o polietilenoglicol (PEG) por ter uma grande variação de peso molecular e baixa toxicidade, já os sais mais utilizados são o fosfato e o cloreto de sódio. Um diagrama de fases determina as condições dos componentes para que ocorra a formação das duas fases, se estas forem acima dos valores da curva binodal ocorre a formação das duas fases, caso contrário não ocorre a separação das regiões. Condições como massa molar e concentração do polímero, concentração do sal, pH ou até mesmo o ponto isoelétrico da molécula podem influenciar nos resultados do sistema. Fator de purificação (FP), coeficiente de partição (K), índice de rendimento ou recuperação (Y) são os principais efeitos resposta estudados no SDFA. Sendo o sistema de duas fases aquosas uma técnica que pode com uma única etapa clarificar, extrair, purificar e concentrar a amostra (IQBAL et al., 2016; KHAN et al., 2019).

Logo, o objetivo desse trabalho foi produzir e extrair por sistema de duas fases aquosas proteases fibrinolíticas geradas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, e avaliar através de sua caracterização bioquímica seu potencial como agente fibrinolítico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HEMOSTASIA

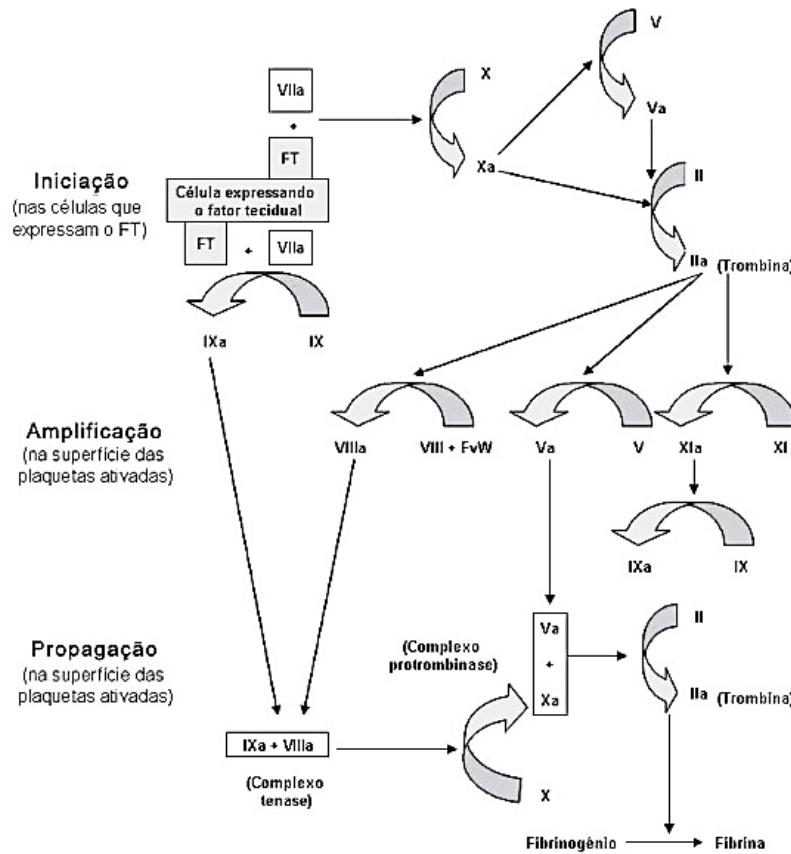
A fisiologia humana é dotada de um sistema composto por processos vasculares que agem no controle do fluxo sanguíneo. Esse sistema, a hemostasia, desenvolve diversas etapas mecânicas e bioquímicas para impedir uma perda de sangue descontrolada ou a até mesmo a extra concentração sanguínea. O sistema inclui como componentes as estruturas dos vasos sanguíneos, agentes vasoativos, plaquetas, tampão hemostático, ativação de uma cascata de coagulação e degradação de proteínas, que entram em ação ao longo de três etapas: hemostasia primária, secundária e terciária. (BONAR *et al.*, 2017).

Na hemostasia primária, ocorre a vasoconstrição, formação de edema, dilatação dos vasos tributários e agregação plaquetária no local da lesão. A redução de calibre do vaso sanguíneo e o acúmulo de líquido no meio extravascular consequentemente diminui o fluxo sanguíneo no local, sendo o sangue, direcionado com maior intensidade para ramos laterais que irão dilatar. Ainda nesta fase ocorre a formação de um tampão plaquetário onde, plaquetas previamente ativadas por estímulos fisiológicos irão aderem-se a superfície da membrana graças algumas interações adesivas, como a interrelação do complexo GPIb-V-IX e por uma proteína conhecida como “fator de von Willebrand (FvW)” que está ligada ao colágeno presente na membrana basal. Plaquetas já aderidas no local mediante ação do fibrinogênio e seu receptor, a glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb-IIIa), irão estimular o recrutamento de mais plaquetas para o local, gerando uma agregação plaquetária. Esse tampão se tornará uma perfeita superfície para o acontecimento da próxima etapa, o processo de coagulação sanguínea (BROOS *et al.*, 2011; STRAUSS *et al.*, 2011; URANO *et al.*, 2018; WARD *et al.*, 2020).

A hemostasia secundária é conhecida como cascata de coagulação e tem como função a formação de monômeros de fibrina estáveis que irão funcionar como uma rede que envolve o trombo. Por muitos anos foi aceita e muito comentada a teoria sobre a cascata de coagulação descrita por Macfarlane (1894) e pela dupla Davie & Ratnoff (1894). Segundo eles, o processo de coagulação funciona como um efeito dominó condicionado a ativação de fatores de coagulação que, em geral, proporcionam a ativação de enzimas proteolíticas levando a formação da fibrina. Os autores dividem a cascata em duas vias: Via Intrínseca, considerada quando todos os componentes dessa sequência estão presentes no sangue e a Via Extrínseca

que ocorre obrigatoriamente na presença da proteína da membrana celular subendotelial. Ocorrendo posteriormente, o encontro dessas duas em uma Via Comum levando ao produto final. Por não explicar muito bem o funcionamento da cascata de coagulação *in vivo*, o modelo proposto por Macfarlane, Davie e Ratnoff vem sendo substituído por um novo modelo baseado nas superfícies celulares considerando estágios e fases, deixando para trás a utilização das vias intrínseca e extrínseca, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Modelo de coagulação baseado em superfícies celulares.



Fonte: Silva & Melo (2016).

A nova representação do processo de coagulação se divide em quatro etapas: iniciação, amplificação, propagação e finalização (FERREIRA et al., 2010). Na fase de iniciação, o fator tecidual (FT) expresso por algumas células irá se ligar ao fator VII da coagulação, o transformando em sua forma ativa (FVIIa), o que acaba formando o complexo FVIIa/FT que conseqüentemente irá ativar os fatores IX e X. O fator Xa junto ao seu cofator

(FVa) irão expressar o fator V, que através de proteases não coagulantes ou Xa irá se transformar na sua forma ativada (Va). Assim, Xa e Va juntos com fosfolipídios e Ca^{2+} irão formar o complexo protrombinase que possui o propósito de transformar a protrombina (fator II) em trombina. Na fase de amplificação a trombina age, por intermédio dos fatores VIII e V plaquetário ou V plasmático, quando o fator VIII é ativado ocorre sua separação do FvW, o que influenciará na formação de plaquetas ativadas ligadas aos fatores Va e VIIIa. Várias plaquetas serão recrutadas na fase de propagação, ao mesmo tempo, o fator XIa se liga ao fator VIIIa na superfície dessas plaquetas formando o complexo tenase. A formação desse complexo proporcionará novamente a formação do complexo protrombinase e conseqüentemente a geração da trombina. Estando o coágulo de fibrina formado, na fase de finalização 4 anticoagulantes naturais irão agir no controle da ativação da coagulação, sendo eles: antitrombina (AT), proteína C (PC), inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e proteína S (OS). Todos os quatro anticoagulantes possuem como função a desativação dos fatores já mencionados. As proteínas S e C irão inibir os fatores Va e VIIIa, conseqüentemente levando a inativação da trombina. A antitrombina além de inibir a ação da trombina, também inibe os fatores IXa, Xa, XIa e XIIa. O inibidor da via do fator tecidual ao se associar com o fator Xa inibe o complexo FT/VIIIa/Xa causando a inibição da cascata de coagulação (FERREIRA et al., 2010; MONROE e HOFFMAN, 2014; SILVA e MELO, 2016; THAI et al., 2020).

A terceira e última etapa do processo hemostático é a fibrinólise. O foco da hemostasia terciária é a dissolução do trombo para que ocorra a reativação do fluxo sanguíneo normal. Nessa etapa ocorre a ativação do plasminogênio que será convertido em plasmina, transformação que pode ocorrer por duas vias de ativação: via mediada pelo ativador do plasminogênio do tipo tissular (tPA) ou através da via realizada a partir da estimulação do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPA). Proteases inibidoras são enzimas que também podem atuar na fibrinólise, como é o caso das enzimas α_2 -antiplasmina e α_2 -macroglobulina e de outras proteases fibrinolíticas quem vem sendo descobertas, estudadas e aplicadas no sistema fibrinolítico da hemóstase (RODRIGUES et al., 2012; GROVER & MACKMAN, 2018; LIPPI & FAVALORO, 2018; WEISEL & LITVINOV, 2019; GIL, 2019).

Alterações no processo hemostático podem acarretar problemas ao organismo que ocasionem uma perda excessiva de sangue ou o desenvolvimento de doenças

tromboembólicas. A doença de von Willebrand (DVW) é um exemplo de doença hemorrágica ocasionada por um defeito quantitativo ou qualitativo no fator von Willebrand (fvW), esse tem a função de se ligar as plaquetas e ao colágeno da camada subendotelial da pele produzindo assim um tampão plaquetário no local da lesão, e também a responsabilidade de se associar, transportar e proteger o fator VIII contra proteólise no plasma. Acontecendo então uma anormalidade na função da glicoproteína fvW, o organismo apresenta manifestações hemorrágicas como sangramento nasal, menstruação excessiva, hematomas e até mesmo a formação de hematomas (CASTAMAN, 2020). A não dissolução de trombos formado durante o funcionamento do sistema hemostático podem atrapalhar o fluxo normal de sangue nos vasos sanguíneos, podendo se transformar em um dos fatores causadores das doenças cardiovasculares (DCVs), grupo de doenças que mais causam óbitos em todo o mundo, como por exemplo o desenvolvimento de embolia pulmonar, o acidente vascular cerebral (AVC), os ataques cardíacos e trombose (KAWECKI et al., 2018; OMS, 2018; MANCINI, 2021).

2.2. TROMBOSE

A trombose é uma das doenças cardiovasculares ocasionada principalmente pela formação de trombos na corrente sanguínea e caracterizada pela ocorrência de pelo menos uma das três variações conhecidas como Tríade de Virchow: lesão vascular endotelial, alterações hemodinâmicas e hipercoagulabilidade. A estase do fluxo sanguíneo e a lesão vascular levam potencialmente a trombose por estarem associadas intimamente com a hemostasia secundária (agregação plaquetária) (KETFI *et al.*, 2020). Hipertensão, gravidez, toxinas bacterianas e peçonhas ofídicas são exemplos de acontecimentos que podem ocasionar uma lesão endotelial, esse dano além de ocasionar os processos da hemostasia, pode esgotar a quantidade de prostaglandinas I₂ e de plasminogênio presente no local a partir de fatores teciduais, levando assim a possibilidade de ação simultânea de vários processos pró-trombóticos (REGAN, 2000; BRASIL 2010). Algumas alterações hemodinâmicas estão interligadas a lesão vascular endotelial, como é o caso da turbulência ocorrida no interior das artérias durante um quadro de hipertensão arterial. Um fluxo sanguíneo lento também é um fator hemodinâmico que pode ocasionar trombose, o movimento laminar do sangue evita com que plaquetas se acumulem em

determinado local, logo durante a diminuição no fluxo as plaquetas podem entrar em contato com endotélio proporcionando uma adesão entre leucócitos que pode evitar a diluição de coágulos pré-existentes (HONGDA *et al.*, 2020). A hipercoagulabilidade pode ser ocasionada por duas vias, a via primária é ocasionada por fatores hereditários sendo os principais: a mutação de Leiden onde uma alteração no gene do Fator V o torna resistente a proteína C, fazendo com que a formação de trombina e consequente coagulação do sangue seja inativada; e a mutação do gene da protrombina (Fator II) que leva a uma produção excessiva dessa proenzima que converte o fibrinogênio em fibrina, ocasionando um acúmulo de coágulos. A via secundária é desencadeada por fatores adquiridos multifatoriais, como a gravidez, obesidade e o tabagismo (KATTULA *et al.*, 2017).

Amplamente a trombose pode ser dividida em dois grupos, a Trombose Venosa (TV) na qual as veias terão seus fluxos sanguíneos comprometidos a formação de trombos e a Trombose Arterial (TA) a qual os trombos irão se prender as paredes de artérias. No primeiro grupo encontra-se: a trombose venosa profunda (TVP) a qual acontece em veias profundas atingindo geralmente as veias dos membros inferiores como a veia femoral, popliteia, peroneais e ilíaca; trombose de veia renal (TVR) que atinge a veia renal; trombose da veia jugular; trombose da veia portal; trombose cerebral que atinge os seios venosos cerebrais (TVC); síndrome de Budd-Chiari que atinge o fígado; e síndrome de Paget-Schroetter que ocorre no segmento venoso subclávioaxilar. Já as trombozes arteriais são: curso thrombotic que atinge a artéria cerebral e o infarto agudo do miocárdio onde na artéria coronariana irá ocorrer a formação de trombos (LERMAN *et al.*, 2019; PORCEDDU *et al.*, 2020; PALOMEQUE *et al.*, 2020; ISHIDA *et al.*, 2021).

A trombose se torna um caso grave de saúde pública devido à sua alta incidência e por altos gastos gerados aos cofres públicos referidos a tratamentos, intervenções cirúrgicas, exames e internações hospitalares. Segundo a Associação Nacional de Hospitais Privados (2018) é estimado que no Brasil ocorram, a cada ano, cerca de 400.000 casos só de trombozes venosas profundas (TPV), além disso, a trombose faz parte do grupo de complicações recorrentes da Covid-19, doença causadora de uma das maiores pandemias da história humana. A ocorrência da trombose durante a Covid-19 pode ser causada por diversos fatores, entre eles a inflamação do endotélio desencadeando uma resposta trombogênica endotelial descontrolada

(CASELLA, 2020; JOLY *et al.*, 2020). Além dos fatores já mencionados, algumas das causas da trombose envolve a presença de varizes, imobilidade prolongada, cirurgias, uso de anticoncepcional e reposição hormonal (BRASIL, 2020). 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. Para o tratamento da trombose existem vários fármacos já disponíveis no mercado sendo eles os anticoagulantes, antiplaquetários e fibrinolíticos (KARAMETOU *et al.*, 2021).

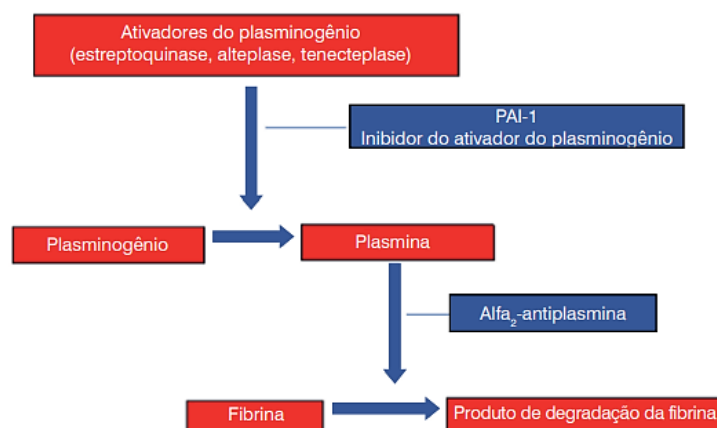
A classe dos anticoagulantes é representada por fármacos que inibem a síntese ou a ação de fatores coagulantes como a proteína C, proteína S, antitrombina III e inibidor da via do fator tissular como o Etxilato de Dabigatrana, Varfarina, Argatrobana, Fondaparinux, Heparina, Heparina de Baixo Peso Molecular, Rivaroxabana, Apixabana, Bivalirudina e Desirudina (VALERIANI *et al.*, 2021). A heparina é um dos anticoagulantes de ação rápida mais utilizados na terapia trombolítica, seu mecanismo de ação ocorre a partir da ligação do fármaco à glicoproteína antitrombina III que é uma molécula que age neutralizando a trombina (fator IIa) e fator Xa, e a partir disso inibe a formação da fibrina. Apesar da ação da antitrombina III ser natural a cascata de coagulação, sua ação é lenta e a presença da heparina faz com que a inibição da trombina seja 1.000 vezes mais rápida. Seu uso é predominante em casos de TVP, infarto agudo do miocárdio e tromboembolismo pulmonar, mas apesar disso é um medicamento que deve ter seu uso bem monitorado por apresentar diversos efeitos adversos como febre, calafrios, urticárias e outros mais graves como choque anafilático e hemorragia (NAJARZADEH *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

Antiplaquetários são fármacos que agem na adesão e agregação das plaquetas, desse jeito dificultando a formação/estabilidade do tampão plaquetário e a ocorrência da cascata de coagulação. Atualmente há vários agentes antiplaquetários disponíveis para uso, sendo alguns deles o Ácido Acetilsalicílico, Ticlopidina, Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Abciximab, Tirofiban e o Eptifibatide. A aspirina, como é popularmente conhecido o ácido acetilsalicílico, é um fármaco conhecido como um anti-inflamatório não esteroideal que ao ser utilizado em doses menores do que o habitual, funciona como um agente antiplaquetário desencadeando um efeito anticoagulante. Seu mecanismo de ação é sobre a enzima ciclooxigenase (COX), bloqueando-a de modo irreversível (BRENES, 2012). A inativação da COX leva a interrupção

da produção de agentes importantes da coagulação, o tromboxano A₂ e o antiagregante endotelial PGI₂. Na hemóstase, o tromboxano A₂ produzido por plaquetas ativas age estimulando a agregação plaquetária através da ativação de novas plaquetas, já a prostaciclina (PGI₂) atua dilatando o vaso sanguíneo e na inibição da agregação de plaquetas. O bloqueio da COX plaquetária diminui a quantidade de tromboxano A₂ no meio e a inativação de COX do endotélio reduz a produção de PGI₂. Apesar da aspirina reduzir a produção do antiagregante endotelial PGI₂, esse logo consegue equilibrar sua produção e realizar sua função anticoagulante, ao contrário do tromboxano A₂ que não possui a capacidade de se reproduzir (LINARDI & SILVA, 2017). Muito utilizado no tratamento de trombose venosa profunda, o ácido acetilsalicílico é administrado via oral e logo é absorvido pelo organismo (ANDRADE & BORGES, 2017).

Fármacos fibrinolíticos são drogas que atuam na ativação de uma fibrinólise endógena, catalisando a formação de plasmina a partir da sua forma inativa, o plasminogênio (RAO *et al*, 2019; STEWART & KLINE, 2020). A plasmina é uma importante enzima da corrente sanguínea por sua ação lítica sobre estruturas de fibrinas presentes no trombo e em coágulos sanguíneos, liberando após a lise apenas produtos solúveis dessa degradação. Esse processo é um processo autolimitado pelo organismo devido a produção de solúveis e dentre os mecanismos inibidores da fibrinólise estão os inibidores de ativadores de plasminogênio e os anti-plasminas (BARUZZI *et al*, 2018). A Figura 2 abaixo esquematiza a forma de atuação dos fibrinolíticos ao mesmo tempo em que a atuação dos seus reguladores. O primeiro fármaco fibrinolítico foi formulado a partir da enzima estreptoquinase, uma enzima de uma bactéria estreptococo que ativa tanto o plasminogênio circundante no organismo quanto os ligados a fibrinas (BHARGAVA *et al*, 2021). A partir disso houveram mais classificações quanto a geração do fibrinolítico e quanto ao seu grau de especificidade a fibrina, surgindo então as alteplases e as tenecteplases. As alteplases são enzimas de síntese genéticas produzidas pelo endotélio humano, assim como as uroquinases, enzimas responsáveis pela inibição da formação de coágulos no epitélio urogenital. As tenecteplases designam um grupo de enzimas derivadas das alteplases, que sofreram modificações para aumento de meia vida e resistência aos inibidores de ativadores de plasminogênio (AHMED *et al*, 2021).

Figura 2 - Esquema de atuação dos agentes fibrinolíticos.



Fonte: Baruzzi *et al.* (2018).

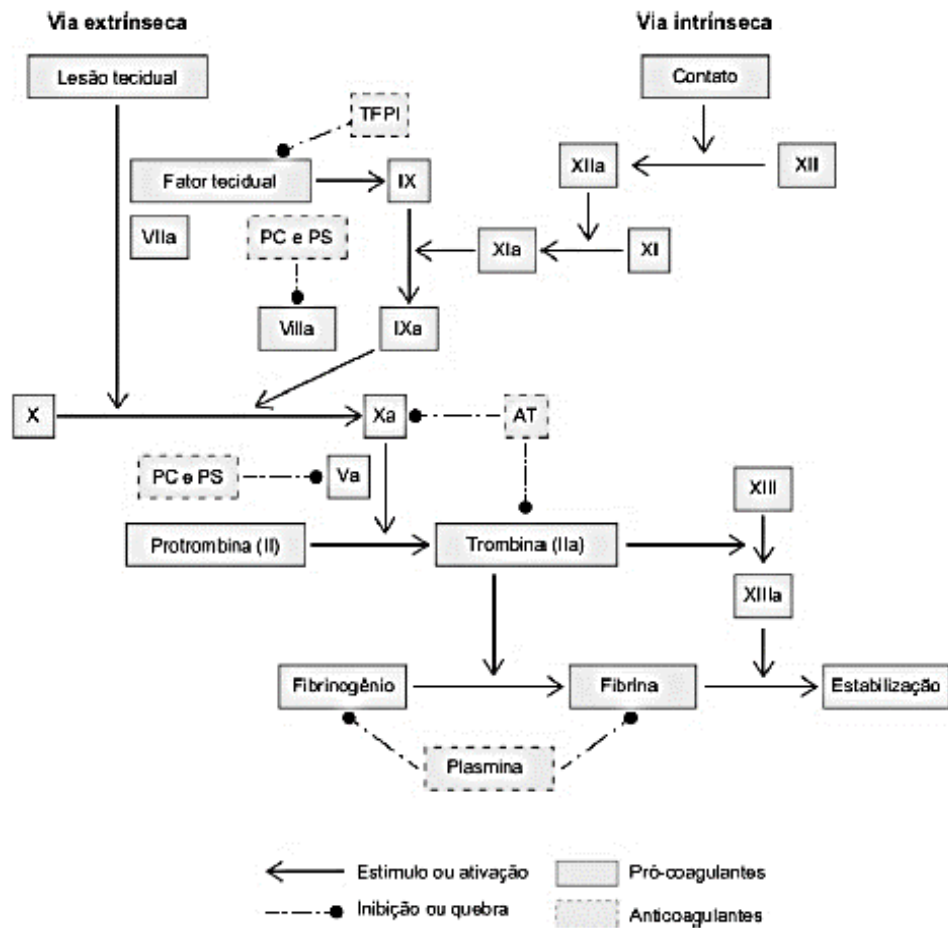
A maioria dos medicamentos utilizados no tratamento da trombose são de alto custo, apresentando valores em média de R\$ 100 no Brasil, sendo esse um dos pontos que faz da trombose um problema de saúde pública. De acordo com a OMS (2018) foi comprovado que a maior incidência das doenças cardiovasculares ocorre em países em desenvolvimento ou não desenvolvidos, isso trás mais destaque aos preços que rodeiam o tratamento da trombose, por a maioria da população desses países serem de baixa renda. Esses medicamentos causam muitos efeitos colaterais sendo o mais grave deles a hemorragia que pode ser controlada a partir da suspensão do uso do medicamento como no caso da heparina, porém as vezes esse quadro não pode ser revertido como, por exemplo, a hemorragia causada pelo fondaparinux que não há como ser revertida por nenhum outro fármaco (LINARD *et al.*, 2016). 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 em doenças tromboembólicas, entre eles estão as proteases fibrinolíticas, enzimas capazes de degradar a fibrina que é um dos principais componentes do trombo (CHANDRAMOHAN *et al.*, 2019).

2.3. PROTEASES FIBRINOLÍTICAS

Hidrolases (EC 3.b.c.d), são enzimas que atuam clivando moléculas através de hidrólise, ou seja, as hidrolases desenvolvem sua ação na presença de uma ou mais moléculas de água. Elas estão presentes em vários eventos biológicos, como por exemplo na produção de glicose, onde durante a glicogênese uma enzima a glicose-6-fosfatase realiza a desfosforilação da glicose-6-fosfato convertendo-a em uma molécula de fosfato e outra de glicose (RODWELL *et al.*, 2021). Na subclasse 3.4 das hidrolases estão presentes enzimas que atuam sobre ligações peptídicas, dentro desse grupo estão as proteases (EC 3.4.-.-) enzimas que são capazes de hidrolisar as ligações peptídicas entre os aminoácidos presentes nas proteínas.

Ao longo da cascata de coagulação enzimas proteolíticas são vistas dando sequência a várias reações enzimáticas (Figura 3). Uma das sequências de ação de proteases plasmáticas durante a coagulação sanguínea se inicia pela ação da protrombina (EC 3.4.21.6), complexo protrombisase formado na presença de cálcio, fator Xa, fator Va e de fosfolipídios, que quando ativado pela proenzima X (através de proteólise limitada) consegue converter a protrombina em trombina por clivagem seletiva das ligações entre os aminoácidos arginina treonina seguida da clivagem entre arginina e isoleucina. A trombina (EC 3.4.21.5), também conhecida como fibrinogenase, é uma endopeptidase do grupo das serino proteases que atua na cascata de coagulação transformando o fibrinogênio em fibrina. A trombina degrada o fibrinogênio em monômero de fibrina e liberando fibrinopeptídeos A e B a partir da clivagem dos resíduos Arg¹⁹-Gly¹⁷ da cadeia α e dos aminoácidos Arg¹⁴- Gly¹⁵ da cadeia β . Além disso, a fibrina possui outras funções dentro da cascata de coagulação como a ativação do Fatores V, VIII, XI e IX, assim como também cliva o Fator XIII que faz com que as ligações entre os monômeros de fibrinas que formam o trombo se tornem cada mais estáveis (SARTIM, 2014).

Figura 3 - Esquema demonstrando a atuação das proteases (protrombina, trombina e plasmina) na cascata de coagulação clássica.



Fonte: Linard *et al.* (2016).

A rede de fibrina formada durante a cascata de coagulação estabiliza o tampão plaquetário, que proporciona o acúmulo de leucócitos e hemácias que dão origem ao trombo, tornando assim a fibrina um dos principais componentes dos coágulos sanguíneos. Algumas proteases possuem a capacidade de degradar a fibrina, uma delas é a plasmina (EC 3.4.21.7) uma protease formada pelo plasminogênio (por proteólise) que age naturalmente dissolvendo o trombo em produtos solúveis através da clivagem das ligações peptídicas entre os aminoácidos da fibrina (ENZYME, 2021).

Como já mencionado, a maioria dos medicamentos atualmente utilizados no tratamento de doenças tromboembólicas atuam sobre os fatores coagulantes (proteína C, proteína S, antitrombina III e inibidor da via do fator tissular), em oposição a trombina ou contra o plasminogênio possuindo pouca ou nenhuma especificidade pela fibrina, proteína que mais colabora com a estabilidade do trombo. Por essa proteína ser um alvo tão significativo, vem crescendo cada vez mais o número de pesquisas acerca das proteases que possuem atividade fibrinolítica que pode atuar como agente fibrinolítico. Proteases fibrinolíticas possuem um amplo leque de fontes de produção e/ou extração e já foram constatadas em animais, plantas e microrganismos.

Na literatura é observado que a maioria das proteases fibrinolíticas de fonte animal são extraídas a partir de substâncias produzidas por animais venenosos ou peçonhentos que são utilizados com o intuito de neutralizar suas presas ou como mecanismo de defesa do animal, já foram estudados o potencial de proteases fibrinolíticas do gênero de serpentes *Bothrops sp.* como, a serino protease BjSP constatada na peçonha de *Bothrops jararaca* e a metaloproteinase barnettlysin-I encontrada em *Bothrops barnetti*, peçonhas de representantes do gênero *Cerastes sp.* também já foram avaliadas quanto suas propriedades fibrinolíticas, sendo constatada entre elas as protease fibrinolítica a metaloproteinase CcMP-II em *Cerastes cerastes* (BOUKHALFA-ABIB & LARABA-DJEBARI 2015; SANCHEZ *et al.*, 2016; CARONE *et al.*, 2018; SACHETTO, A. T. A.; MACKMAN, N, 2019).

Em plantas, as proteases geralmente são detectadas em seus “produtos” como as sementes e o látex, da semente produzida pela leguminosa *Gliricidia sepium* foi-se purificada uma cisteíno protease que teve atividade fibrinolítica constatada. O látex da figueira-comum (*Ficus carica*), árvore produtora do figo, fruto popularmente conhecido e muito consumido em todo o mundo, teve suas propriedades analisadas e com isso pode-se confirmar a presença de uma serino protease, a FPIII, com o potencial de degradar a fibrina. A erva *Euphorbia hirta*, uma planta considerada daninha com propriedades medicinais já comprovadas no tratamento de doenças respiratórias e distúrbios gastrointestinais, já teve as propriedades físico-químicas do seu látex estudadas e com isso foram detectados compostos bioativos como flavonóides, taninos, polifenóis e proteases fibrinolíticas como a hirtidina, uma serina protease de 34 kDa (PATEL *et al.*, 2012; DA SILVA *et al.*, 2020; HAMED *et al.*, 2020).

Quando se trata dos microrganismos, os compostos bioativos são encontrados nos metabólitos secundários, substâncias que são produzidas por fungos ou bactérias durante seu desenvolvimento devido as condições do meio. Inúmeros desses metabólitos já foram isolados para fins comerciais em vários setores industriais, principalmente no setor farmacêutico. As proteases fibrinolíticas não ficam de fora disso, essas já foram produzidas, isoladas, purificadas de fungos, microalgas e bactérias e tiveram seus perfis bioquímicos estudados por diversos cientistas. *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Chlorella sp.*, *Arthrospira sp.*, *Brevibacillus sp.*, *Mucor sp.*, *Aspergillus sp.*, *Neurospora sp.* e *Cordyceps sp.* são alguns dos gêneros de microrganismos que tiveram ou ainda tem suas proteases com atividades fibrinolíticas como algo de estudo (RAJ *et al.*, 2012; MAJUMDAR *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019; OCHNEVA *et al.*, 2019; DE BARROS *et al.*, 2020; KATROLIA *et al.*, 2020; ELLEUCH *et al.*, 2021; MUKHERJEE & RAI, 2021).

A utilização de animais como fontes de proteases fibrinolíticas se torna desvantajosa por ser necessário em alguns casos o sacrifício do animal, necessidade do aval de comitês de éticas para obtenção da enzima ou a alta toxicidade apresentada por alguns dos produtos. Para a extração dessas enzimas em plantas é necessário mão de obra específica para o manejo e também a dependência de fatores ambientais como o clima, umidade, temperatura e sazonalidade temporal o que leva a processos de extração mais longos, trabalhosos e dependentes. os microrganismos demonstram ser fontes mais econômicas e rápidas. A produção de compostos bioativos, como as proteases fibrinolíticas, por microrganismos se dá através de processos fermentativos em que geralmente necessita apenas de um substrato e condições favoráveis ao crescimento do organismo para a produção da biomolécula, o que pode facilmente ser controlado durante a fermentação, fazendo dos microrganismos a fonte mais econômica e rápida de proteases fibrinolíticas (MUSIDLAK *et al.*, 2020).

Quando se trata dos microrganismos, os compostos bioativos são encontrados nos metabólitos secundários, substâncias que são produzidas por fungos ou bactérias durante seu desenvolvimento devido as condições do meio. Inúmeros desses metabólitos já foram isolados para fins comerciais em vários setores industriais, principalmente no setor farmacêutico. As proteases fibrinolíticas não ficam de fora disso, essas já foram produzidas, isoladas, purificadas de fungos, microalgas e bactérias e tiveram seus perfis bioquímicos estudados por diversos

cientistas. Alguns dos gêneros de microrganismos que tiveram ou ainda tem suas proteases com atividades fibrinolíticas como alvo de estudos, estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1- Espécies de microrganismos produtoras de proteases com atividade fibrinolítica.

Microrganismo	Autor
<i>Alcaligenes aquatilis</i>	PRABHU <i>et al.</i> , 2021
<i>Arthrospira platensis</i>	DE BARROS <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus pseudomycooides</i>	CHANDRAMOHAN <i>et al.</i> , 2019
<i>Agrocybe aegerita</i>	LI <i>et al.</i> , 2021
<i>Serratia rubidaea</i>	ANUSREE <i>et al.</i> , 2020
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KUMAR <i>et al.</i> , 2020
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	KHURSADE <i>et al.</i> , 2019
<i>Chlorella vulgaris</i>	E SILVA <i>et al.</i> , 2018
<i>Neurospora sitophila</i>	DENG <i>et al.</i> , 2018
<i>Mucor subtilissimus</i>	DA SILVA <i>et al.</i> , 2019

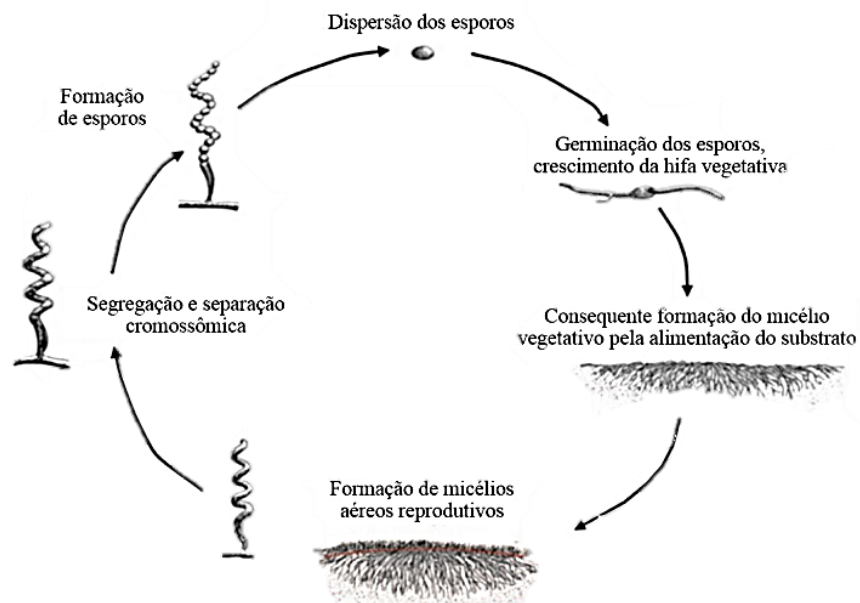
Fonte: Própria (2021).

2.4. *Streptomyces sp.*

Streptomyces sp. designa um gênero de importantes bactérias do solo, gram-positivas pertencentes ao grupo dos Actinomycetes. São actinobactérias aeróbicas estritas e mesófilas, ou seja, utilizam o oxigênio como fonte principal para desenvolvimento do seu metabolismo e obtenção de energia, sobrevivendo em temperaturas que permeiam 25 e 35°C. Essas características incidem na pouca ou nula distribuição desse gênero em ambientes hipóxicos ou anóxicos com climas menos tropicais, mas de distribuição cosmopolita (OLANREWAJU & BABALOLA, 2017).

São classificadas como actinobactérias por sua estrutura possuir forma alongada e filamentosa com a presença pseudohifas bem desenvolvidas que podem formar uma estrutura de substrato de micélio, este podendo ser vegetativo ou aéreo. O ciclo de vida de *Streptomyces sp.* se inicia a partir da germinação de esporos, em ambiente favorável, que irá dar origem a hifas e conseqüentemente a formação de micélios vegetativos. Por sua vez, esses irão originar micélios aéreos que ao se diferenciarem irão formar conídios, que atuará na dispersão de esporos, concluindo o ciclo e início de um novo ciclo reprodutivo (Figura 4) (LIMA *et al.*, 2017).

Figura 4 - Ciclo reprodutivo de *Streptomyces sp.*



Fonte: Adaptado de Lima (2017).

Com função de eliminar compostos orgânicos, são espécies quimiorgânótróficas podendo adquirir elétrons a partir de compostos orgânicos e possuem uma forma de metabolismo mais oxidativa. A partir da capacidade de captar elétrons de compostos orgânicos, o gênero *Streptomyces* também pode produzir diferentes tipos de pigmentos que servem de coloração para o seu micélio. O gênero se destaca pela grande capacidade de produzir

metabólitos secundários importantes e amplamente utilizados por diversos setores industriais. (PROCÓPIO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários produzidos durante a germinação possuem naturalmente como função a inibição de outros microrganismos no meio para que sua sobrevivência seja preservada. Mas sobre esses também foram descobertas diversas aplicações biotecnológicas em vários setores, entre eles o setor farmacêutico. O primeiro biocomposto potencial descoberto no grupo foi um potente antibiótico, a estreptomicina, que levou a uma incessante busca por mais compostos produzidos por *Streptomyces griseus*. Desde então o grupo é considerado o principal microrganismo a ser utilizado na produção antibióticos, chegando atingir cerca 80% dos disponíveis no mercado. Os principais antibióticos produzidos por *Streptomyces* e comercializados até os dias atuais são pertencentes as classes dos antraciclinas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, β -lactâmicos, polienos, peptídeos e macrolídeos. Princípios ativos utilizados contra a multiplicação de bactérias não são os únicos biocompostos a serem produzidos pelo grupo, estes são capazes de produzir biomoléculas capazes de desenvolver diversas atividades biológicas como antifúngica, antiparasitária, antiviral e fibrinolítica (NERYS, 2015; ZOHRA *et al.*, 2021).

Cinquenta espécies diferentes do gênero *Streptomyces* foram utilizadas no trabalho de Silva *et al.* (2016) onde foi realizado um *screening* para analisar a produção de proteases fibrinolíticas, seguido da caracterização bioquímica. Tendo como melhor produtora de proteases fibrinolíticas *Streptomyces sp.* DPUA 1576 (283 mm²), e *Streptomyces sp.* DPUA 1571 como a única que não promoveu degradação na placa de fibrina (0,00 mm²). Um trabalho sobre a produção e caracterização bioquímica de proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi realizado por Batista e colaboradores (2017), a linhagem da actinobactéria em meio MS-2 atingiu um valor máximo de atividade fibrinolítica de 835 U/ml em meio contendo 1,5% de soja, 1g/L de glicose. Sendo demonstrado o grande potencial fibrinolítico de proteases produzidas pelo gênero *Streptomyces*. Uesugi e outros autores (2011) descobriram e avaliaram a protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces omiyaensis*, descobrindo ao final dos estudos que a enzima pertence à família da tripsina com efeito é semelhante ao ativador de plasminogênio tecidual e oito vezes maior do que a plasmina durante o processo de fibrinólise. A potência sobre o efeito da plasmina também foi observado

por Simkhada *et al.* (2011), as proteases produzidas por *Streptomyces sp.* CS684 a atividade fibrinolítica dessa protease foi (121,5 mm²/mg) cerca de 1,38 vezes maior do que o produzido por plasmina (88 2,8 mm²/mg). Tendo esses trabalhos em comum a comprovação do potencial das proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces sp.* como princípios ativos a serem utilizados como fármacos na terapia trombolítica.

O uso de biomoléculas produzidas por microrganismos é promissor, mas a características de serem produzidas em um meio com outras moléculas requer o desenvolvimento de um processo biotecnológico extenso composto por inúmeras etapas consecutivas, que as separem e purifiquem dos demais contaminantes. Uma das técnicas empregada em biomoléculas de origem microbiana é o sistema de duas fases aquosas, uma metodologia composta por líquidos que irão formar um meio heterogêneo, sendo um deles o local de preferência para qual a biomolécula em foco irá migrar (DA SILVA *et al.*, 2018).

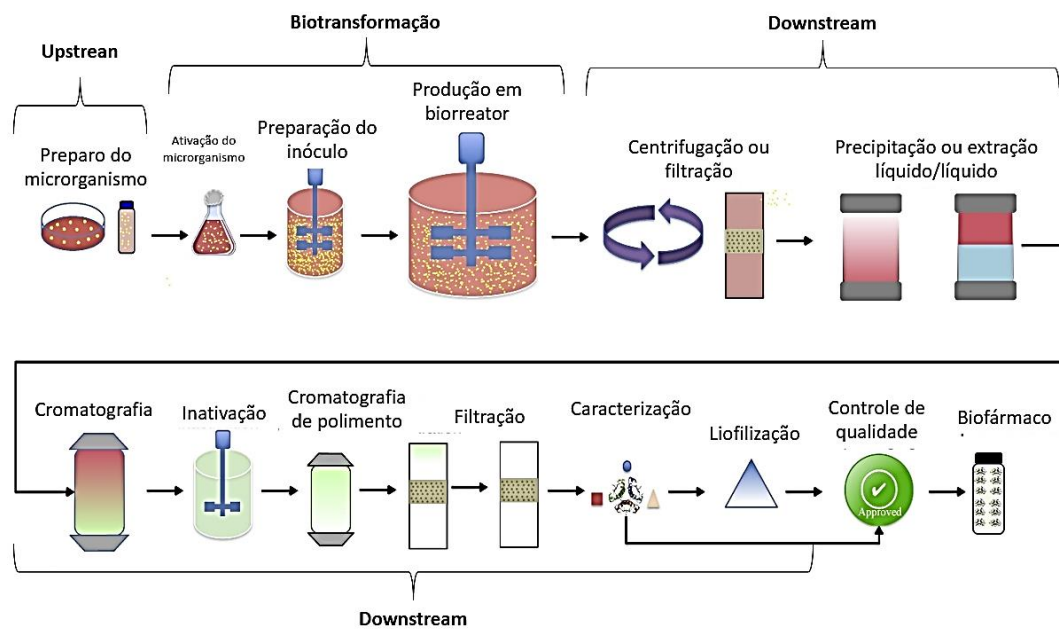
2.5. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

O potencial biotecnológico de uma biomolécula produzida por um microrganismo leva a prática de um bioprocesso, que compreende a execução de diversas etapas focadas, resumidamente, na obtenção e possibilidade de uso da biomolécula. O bioprocesso é dividido em três grandes etapas: *upstream*, fermentação e *downstream* (CRUZ, 2021).

Na primeira etapa (*upstream*) são definidos os parâmetros que irão suprir as necessidades para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos no meio, e aqueles que irão influenciar na produção da biomolécula desejada. São definidos, monitorados e controlados critérios como o pH, a temperatura, o tipo de fermentação, o substrato, agitação, aeração e outros. A fermentação é onde ocorre a biotransformação propriamente dita. Após o inóculo do microrganismo, o substrato se transformará no produto metabólico desejado, que tem suas características qualitativas e quantitativas pré-definidas no *upstream*. A obtenção do extrato bruto desencadeia a necessidade da etapa *downstream* que é subdividida nos processos de purificação, recuperação e caracterização da biomolécula afim de retirar os contaminantes, preservar a atividade biológica e estudar as características bioquímicas para que a mesma possa

ser utilizada, principalmente quando se trata na produção de um biofármaco. O resumo de um bioprocesso de desenvolvimento de um novo fármaco pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 - Etapas do bioprocesso para produção de um biofármaco.



Fonte: Adaptado de Jozala *et al.* (2016).

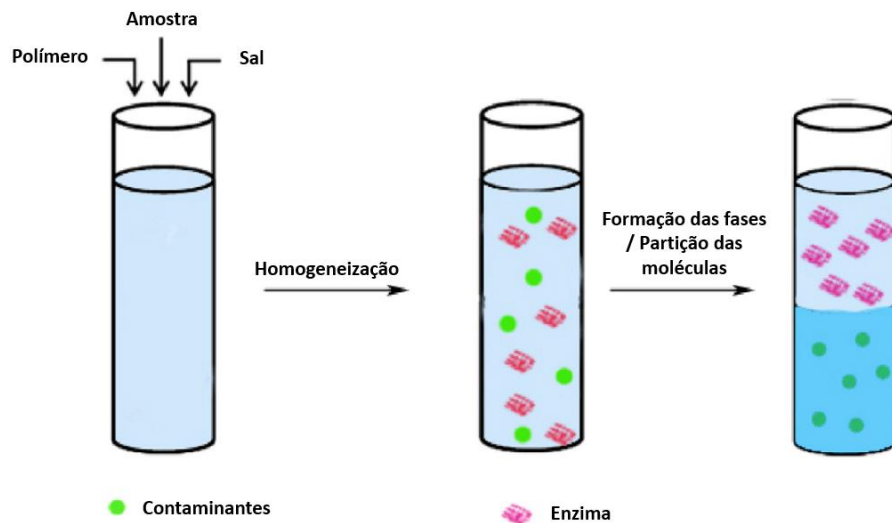
Como pode ser observado na etapa *downstream* há vários processos que podem demandar muito tempo e a necessidade de muitos recursos financeiros, o que pode influenciar negativamente na produção industrial levando a busca por otimização desse processo. A técnica que pode solucionar estes obstáculos é o sistema de duas fases aquosas (S DFA), o sistema é composto basicamente de polímero-sal convencionais, que na produção industrial são substâncias relativamente baratas em comparação aos materiais cromatográficos (BENSCH *et al.*, 2007).

O S DFA é uma técnica de purificação de proteínas muito suave em comparação a utilização de solventes orgânicos, e a desnaturação ou perda de atividade biológica não são normalmente vistas. Isso ocorre devido ao alto teor de água (65-90%) que forma um ambiente delicado para que as biomoléculas se separem e os polímeros estabilizem sua estrutura e atividades biológicas podendo gerar uma baixa tensão interfacial dos sistemas que protegerão

as proteínas. Os próprios polímeros presentes no S DFA podem ter também um efeito estabilizador. Também como vantagens têm alta biocompatibilidade, baixo custo, capacidade de operação contínua e facilidade de expansão (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Consonantemente, os sistemas aquosos bifásicos são formados por polímero-polímero-água ou polímero-sal-água, podendo ser utilizado para separar proteínas de detritos celulares ou para purificar proteínas de outras proteínas. Neste, a maioria das partículas solúveis irão se deslocar para a fase mais polar, enquanto as proteínas se dividirão na fase menos polar e mais hidrofóbica, geralmente no PEG (IQBAL *et al.*, 2016). O esquema de um S DFA composto por um polímero, sal e água pode ser observado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema padrão do sistema de duas fases aquosas composto por polímero, sal e água.



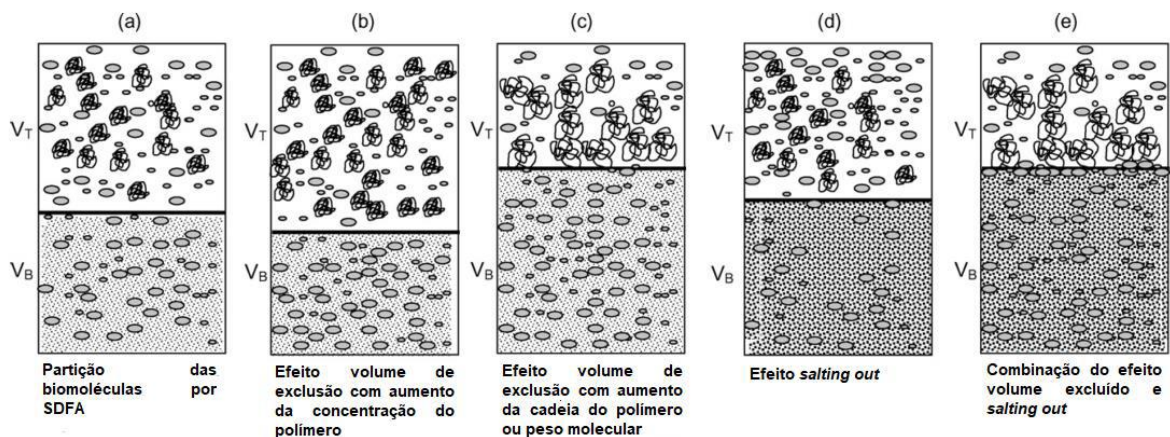
Fonte: Adaptado de Nadar (2017).

O funcionamento do S DFA é caracterizado por três forças: gravitacional, flutuação e fricção que atuam sobre uma queda durante a coalescência. O movimento de uma partícula depende do equilíbrio entre essas forças. A força gravitacional depende da densidade das partículas, as forças de flutuação ou de fricção dependem das propriedades reológicas das fases. A força de atrito sempre impede o movimento de queda. Estas forças, juntamente com a tensão interfacial, determinam o comportamento de coalescência e as características da fase dispersa. No S DFA as densidades das fases são muito semelhantes e as forças da flutuação que

determinam o comportamento das partículas. A proporção das viscosidades do polímero e da fase salina pode ser muito grande (5-50 vezes), sendo a fase de sal muito menos viscosa do que a fase polimérica. Quando a fase inferior é menos homogênea, as partículas coalescentes devem descer através da fase polimérica. Como a fase polimérica tem uma viscosidade mais elevada, o atrito entre as partículas e a fase é elevado, pelo que o tempo de separação é mais longo. Quando a fase inferior é mais homogênea, as partículas da fase superior deslocam-se através da fase inferior, a qual tem uma viscosidade muito mais baixa, favorecendo a coalescência (ASENJO e ANDREWS, 2012).

Mesmo assim, o processo de separação de proteína por SDFA ainda é complexo, acredita-se que as propriedades dos polímeros (tipo do polímero, concentração e peso molecular), pH, a força iônica da fase salina, adição de sal como NaCl para aumentar a resolução hidrofóbica do sistema são os fatores mais importantes que afetam a separação das proteínas. Babu *et al.* (2008), representou esquematicamente (Figura 7) com esses possíveis fatores que podem interferir no SDFA para partição das proteínas. Portanto, coeficiente de partição (K) é definido como a razão da concentração de proteínas ou da atividade enzimática entre as duas fases e poderá proporcionar uma distribuição desigual da proteína estudada (NADAR; PAWAR; RATHOD, 2017).

Figura 7 - Representação esquemática dos possíveis comportamentos da partição das biomoléculas no SDFA.



(a) sistema polímero/sal; (b) efeito do aumento da concentração de polímero; (c) efeito do aumento do comprimento da cadeia ou do peso molecular do PEG; (d) efeito do aumento da concentração de sal; (e) exclusão

de volume combinado e efeito de *salting out*. (⊕) Polímero; (⊖) biomolécula; (⊗) sal; VT: volume da fase “top”; VB: volume da fase “bottom”.

Fonte: Adaptado de Babu *et al.* (2008).

Com objetivo de recuperar e purificar diversos tipos de produtos biológicos o SFA tem sido utilizado em diferentes bioprocessos. Na literatura este método já foi empregado para purificação de colagenase (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017), lectina (NASCIMENTO *et al.*, 2013), protease (NASCIMENTO *et al.*, 2016), tanase (RODRÍGUEZ-DURÁN *et al.*, 2013), ácidos clorogênicos (YANG *et al.*, 2016), íons (JIMENEZ *et al.*, 2016), vírus, organelas, fragmentos de membrana (COELHO *et al.*, 2019), ascorbato oxidase (PORTO *et al.*, 2010) entre outros. Se consolidando como uma técnica excelente na otimização da fase *downstream* e preservação das atividades dos biocompostos.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Produzir e extrair por sistema de duas fases aquosas proteases fibrinolíticas obtidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, e avaliar através de sua caracterização bioquímica seu potencial como agente fibrinolítico.

3.2. ESPECÍFICOS

- Produzir proteases com atividade fibrinolítica a partir de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573;
- Extrair a protease fibrinolítica por sistema de duas fases aquosas;
- Purificar as proteases por método cromatográfico gel filtração;
- Determinar o perfil eletroforético da protease fibrinolítica, utilizando SDS-PAGE;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima purificada.

4. METODOLOGIA

4.1. MICRORGANISMO

Para a produção de proteases capazes de degradar a fibrina foi utilizada a linhagem de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, actinobactéria isolada de líquens presentes na região Amazônica e cedida gentilmente pelo Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA).

4.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA

A actinobactéria foi pré-inoculada em meio ISP-2 (Pridham *et al.*, 1957) com glicerol a 10% sob temperatura de 20°C. Para determinação do substrato ideal para a produção de proteases fibrinolíticas, *Streptomyces parvulus* foi inoculada em MS-2 (Porto *et al.*, 1996) modificado, sendo utilizados diferentes substratos agroindustriais com de farinhas da casca do maracujá, casca da laranja e farinha de soja. Variando suas concentrações entre 0,5; 1,5; 2,5 e 3,0%. A fermentação submersa prosseguiu durante 48h à 28°C em shaker orbital (150 rpm).

4.3. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Para extração da enzima fibrinolítica presente no extrato bruto, foi realizado um sistema de duas fases aquosas composto por polietilenoglicol (PEG) e sais fosfato de sódio e potássio, seguindo um planejamento fatorial 2^4 com a massa molar do PEG (M_{PEG}), pH e as concentrações do polímero (C_{PEG}) e do sal (C_{PHO}) (Tabela 2).

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^4 para a extração de proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, através do sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato.

Variável	Nível		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)

^a M _{PEG} (g/mol)	1500	4000	8000
^b C _{PEG} (% w/w)	12,5	15,0	17,5
^c C _{PHO} (% w/w)	10,0	12,5	15,0
pH	6,0	7,0	8,0

^a Massa Molar do PEG; ^b Concentração do PEG; ^c Concentração de sais de fosfato.
Fonte: Própria (2021).

De início, em tubos graduados de 15ml (previamente calibrados) foram adicionados os componentes do sistema (PEG, sal e água), logo em seguida cada tubo foi agitado durante 1 minuto e foi deixado em repouso durante 24 horas. Após esse tempo no SDFA foram adicionadas 2g do extrato bruto e a amostra foi agitada em vórtex por um minuto. Após 1h as duas fases do sistema foram separadas e submetidas a determinação de proteína total, atividade fibrinolítica e atividade específica, cujo resultados foram utilizados para determinação das variáveis respostas do SDFA coeficiente de partição (K), índice de recuperação (Y) e fator de purificação (Y), onde:

- O coeficiente de partição (K) foi definido como a razão da atividade fibrinolítica na fase superior (AFs) sobre a atividade fibrinolítica na fase inferior (AFi) (Equação 1).

$$K = \frac{AFs}{AFi}$$

Eq. (1)

- A razão entre a atividade específica da fase inferior (AEi) e a atividade específica do extrato bruto (AEe) definiram o fator de purificação (FP) proporcionado pelo SDFA, como pode ser observado na Equação 2. A atividade específica (AE) por sua vez, foi definida como a razão da atividade proteásica (U/ml) pela concentração de proteína (mg/ml).

$$FP = \frac{AEi}{AEe}$$

Eq. (2)

- O cálculo do rendimento da atividade (Y) pode ser visto na Equação 3 onde, AFi e Vi são, respectivamente, a atividade fibrinolítica na fase inferior e o volume da fase inferior; e AFe é a atividade fibrinolítica no extrato bruto e Ve o volume do extrato bruto presente no SDFA, respectivamente.

$$Y = \frac{AFi \times Vi}{AFe \times Ve} \times 100$$

Eq. (3)

4.4. CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

A protease fibrinolítica extraída pelo SDFA foi purificada por apenas uma etapa cromatográfica em Akta Avant 25 System (Pharmacia LKB Biotecnologia, Uppsala, Suécia), utilizando coluna Superdex - G200 10/300 GL, sendo as frações, coletadas automaticamente, 0,5 ml por minuto. A estimativa do peso molecular foi alcançada usando a curva de calibração da coluna e marcadores de peso ($1,0 \text{ mg/ml}^{-1}$): albumina sérica bovina, anidrase carbônica, albumina de ovo de galinha e um inibidor de tripsina. A curva padrão foi traçada usando o software UNICORN-6.0 seguindo a equação $y = -0,2053x + 4,7654$ ($R^2 = 0,9946$).

4.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Com a protease purificada, foi realizada eletroforese seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970) onde resumidamente foram utilizados 12% gel de poliacrilamida e o marcador de massa molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (500 μL) contendo as seguintes massas molares 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 e 10 kDa. A coloração bandas de proteína foram coradas com prata.

4.6. DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL

A determinação de proteínas totais das amostras foi realizada seguindo a metodologia descrita por Smith *et al.* (1985) utilizando BSA (albumina bovina sérica) como substância padrão para a curva de calibração. Em placas para microtitulação de 96 poços foram colocados 25 µl do extrato purificado mais 200 µl do reagente BSA, a placa então permaneceu em estufa de secagem e esterilização durante 20 minutos sob a temperatura de 37°C. Após esse tempo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (595 nm).

4.7. ATIVIDADE PROTEÁSICA

A atividade proteásica foi determinada de acordo com a técnica proposta por Ginther (1979) utilizando azocaseína a 1% (p/v) como substrato. Em tubos foram acrescentados 250 µl de azocaseína e 150 µl da amostra purificada, ficando esses em local escuro durante uma hora. Corrido o esse tempo, a reação foi interrompida com o acréscimo de 1ml de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v), seguida de centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes das amostras foram coletados (800 µl) e a cada tudo foram adicionados 200 µl de solução NaOH 1,8 mol/L. Uma unidade de enzima proteolítica foi definida como a quantidade de enzima para produzir um aumento na absorbância de 0,1 em 1 hora a 420 nm.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE FIBRINOLÍTICA

Para determinar a atividade fibrinolítica da enzima em estudo, foram realizadas duas metodologias distintas: método espectrofotométrico (quantitativo) e placa de fibrina (qualitativo).

O método espectrofotométrico foi realizado segundo a metodologia descrita por Wang *et al.*, 2011, que resumidamente: foi preparada uma solução composta por 0,72% de fibrinogênio, 245 mM de tampão de fosfato de sódio (pH 7,0) e 150 mM de tampão Tris-HCl-

NaCl, em 500 µL da solução foram adicionados 100 µL de trombina a 37°C durante 10min; após esse tempo, 1 µL da amostra em estudo foi adicionada ao tubo, ficando esse sob 37°C durante 1h. Uma unidade de degradação de fibrina (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de causar um aumento de 0,01 por minuto na absorbância 275 nm.

Seguindo o método placa de fibrina por Astrup e Mullertz (1952), com pequenas modificações: uma placa de fibrina-agarose foi feita com 1% de agarose, 0,1% de fibrinogênio humano e 8 U/ml⁻¹ de trombina humana, e 20 µL do extrato bruto foi adicionado a placa 1h após sua preparação. A placa foi incubada a 37 ° C por 18 h, o diâmetro do círculo lítico foi medido após esse tempo. Foi observado uma região transparente e clara na qual a fibrina é hidrolisada e seu diâmetro é diretamente proporcional à intensidade da atividade fibrinolítica. A área degradada foi avaliada como a área do círculo (mm²).

4.9. EFEITO DA TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DA ENZIMA E TEMPERATURA ÓTIMA

A temperatura ótima foi determinada após incubar 150 µL de enzima purificada da fase superior rica em PEG com 250 µL de água destilada em diferentes temperaturas (10, 20, 30, 37, 40, 50, 60 e 70 °C) durante uma hora. Para determinar a estabilidade à temperatura, alíquotas foram retiradas no início passado, 10 segundos (tempo zero), e após 30, 60, 120 e 180 minutos, e a atividade proteásica foi realizada com cada amostra.

Para determinação da temperatura ótima para a protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, foi realizada a atividade proteásica anteriormente mencionada modificada. Ao invés da microplaca ficar em local escuro durante uma hora, os tubos contendo as amostras ficaram em banho maria sob diferentes temperaturas (10, 20, 30, 37, 40, 50, 60 e 70 °C) durante uma hora. Posteriormente, a metodologia da atividade proteásica foi seguida normalmente como mencionado anteriormente.

4.10. EFEITO DO pH NA ESTABILIDADE DA ENZIMA E pH ÓTIMO

Para determinar o pH ótimo, o substrato (azocaseína) foi preparado em diferentes pH (pH 3,0 a 11,0), a atividade proteásica foi realizada normalmente e mensurada após uma hora. Já para a estabilidade ao pH, a enzima foi misturada com diferentes tampões: acetato de sódio (pH 3,0 a 5,0), fosfato de citrato (pH 5,0 a 7,0), Tris – HCl (pH 7,0 a 9) e glicina – NaOH (pH 9,0 a 11,0) e incubado a 37 ° C durante 60 min. Para determinar a estabilidade ao pH, alíquotas foram retiradas no início e após 30, 60, 120 e 180 minutos.

4.11. INFLUÊNCIA DE ÍONS, INIBIDORES E SURFACTANTES

A protease fibrinolítica produzida por *S. parvulus* DPUA 1573 foi sujeita a influência de íons (zinco, sódio, magnésio, ferro, cobre, cálcio e manganês), inibidores (fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA, β- Mercaptoetanol, ácido iodoacético) na concentração de 5,0 mM; e aos surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 na concentração de 1,0 mM. A atividade proteásica foi determinada de acordo com Ginther (1979).

4.12. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os efeitos foram avaliados por uma análise de variância com nível de significância de 95% para estimativas dos efeitos principais e de segunda ordem para valor linear absoluto dos fatores em relação às variáveis de resposta estudadas. A análise estatística do delineamento experimental foi realizada por meio do software Statistical 8.0. Para a análise dos dados, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes, com o objetivo de comparar as médias do efeito dos inibidores na atividade enzimática da protease. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos a $p \leq 0,05$ e foi utilizado o software Excel 2007.

5. RESULTADOS

5.1. SELEÇÃO DO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS

O *screening* de produção das proteases fibrinolíticas por *S. parvulus* DPUA 1573 estão expostos na Tabela 3. A fermentação contendo como substrato a farinha da casca do maracujá na concentração de 2,5% apresentou a maior atividade fibrinolítica entre as demais, tanto no método espectrofotométrico (15.46 U/ml) como no método da placa de fibrina (317.31 mm²).

Tabela 3 - Produção de enzimas fibrinolíticas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 utilizando diferentes substratos agroindustriais em fermentação submersa.

Substratos	Concentração (%)	AP (U/ml) ^a	AF (U/ml) ^b	AF (mm ²) ^c	Medidas
Farinha da casca de laranja	2,5	20,83 ± 8,25	11,46 ± 0,08	317,31	20,01 ± 0,02
Farinha da casca de laranja	0,5	11,97 ± 0,52	10,75 ± 0,09	254,47	18,0 ± 0,01
Farinha da casca de maracujá	2,5	33,93 ± 0,19	15,46 ± 0,15	317,31	20,01 ± 0,01
Farinha da casca de maracujá	0,5	33,70 ± 2,59	11,49 ± 0,53	314,16	20,0 ± 0,021
Farelo de soja	1,5	3,72 ± 0,19	3,48 ± 0,15	0	0
Farelo de soja	3,0	6,23 ± 0,19	8,71 ± 0,32	0	0

^a Atividade proteásica (U/ml); ^b Atividade fibrinolítica descrita por Wang *et al.* (2011); ^c Atividade fibrinolítica descrita por Astrup & Mullertz (1952).

Fonte: Própria (2021).

5.2. SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

Na Tabela 4 estão apresentados a matriz do delineamento experimental 2⁴ e os resultados obtidos na extração por SDFA da protease fibrinolítica produzida por *S. parvulus* DUPA 1573 em fermentação submersa utilizando 2,5% de farinha da casca do maracujá como substrato.

Tabela 4 - Partição das proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 através do sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato.

Ensaio	M _{PEG} (gmol ⁻¹) ^a	C _{PEG} (w/w) ^b	pH	C _{PHO} (w/w) ^c	AP _p ^d	AP _s ^e	K ^f	Y _p (%) ^g	Y _s (%) ^h	FP _p ⁱ	FP _s ^j	BM (%) ^k
1	1500	12.5	6	10	6.03	3.57	1.69	37.34	26.28	1.11	3.79	81.23
2	8000	12.5	6	10	7.40	3.67	2.02	41.44	31.34	1.31	4.08	78.65
3	1500	17.5	6	10	7.83	1.70	4.61	54.25	10.52	1.50	2.06	82.57
4	8000	17.5	6	10	6.67	1.80	3.70	44.21	13.26	1.66	3.25	61.36
5	1500	12.5	8	10	-	-	-	-	-	-	-	-
6	8000	12.5	8	10	8.83	2.37	3.73	52.07	17.44	1.64	1.89	81.9
7	1500	17.5	8	10	-	-	-	-	-	-	-	-
8	8000	17.5	8	10	7.20	1.70	4.24	46.68	12.02	2.33	1.49	56.21
9	1500	12.5	6	15	9.30	1.07	8.72	49.34	7.54	1.33	9.28	75.55
10	8000	12.5	6	15	8.33	1.80	4.63	36.84	15.92	1.49	10.1 4	52.56
11	1500	17.5	6	15	7.53	1.00	7.53	51.07	5.89	1.70	0	59.78
12	8000	17.5	6	15	7.23	1.20	6.03	34.11	10.26	1.72	0	36.49
13	1500	12.5	8	15	11.17	1.20	9.31	42.78	9.37	1.72	1.31	64.07
14	8000	12.5	8	15	9.57	1.53	6.24	42.29	14.46	1.86	1.93	60.51
15	1500	17.5	8	15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	8000	17.5	8	15	10.27	1.40	7.33	57.49	10.73	2.10	1.58	68.48
17 *	4000	15	7	12.5	9.03	1.70	5.31	50.58	13.03	1.68	3.32	67.98

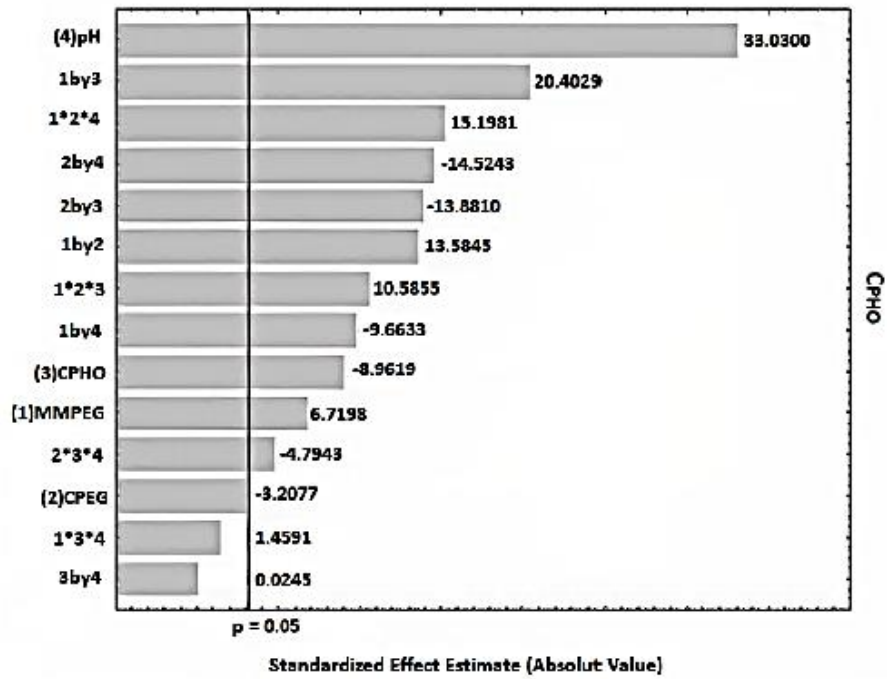
18 *	4000	15	7	12.5	9.03	1.70	5.31	50.58	13.03	1.65	4.40	67.11
19 *	4000	15	7	12.5	8.53	1.73	4.92	47.78	13.54	1.59	3.39	68.13
20 *	4000	15	7	12.5	8.53	1.73	4.92	47.78	13.54	1.56	4.48	67.23

^a Massa molar do PEG; ^b Concentração do PEG; ^c Concentração do fosfato ^d Atividade proteásica na fase rica em PEG; ^e Atividade proteásica na fase rica em sal; ^f Coeficiente de partição; ^g Rendimento na fase rica em PEG; ^h Rendimento na fase rica em fosfato; ⁱ Fator de purificação na fase rica em PEG; ^j Fator de purificação na fase rica em sal; ^k balanço de massa; * Ponto central.

Fonte: Própria (2021).

Os ensaios 5, 7 e 15 não formaram as duas fases distintas. Já nos demais ensaios houve a formação das duas fases e os coeficientes de partição no sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato foram maiores que 1 ($K > 1$). A influência da interação das variáveis: massa molar do PEG e concentração do sal foi uma das mais significativas nesse resultado, como pode ser observado na Figura 8. Na fase de maior concentração das proteases fibrinolíticas (PEG), o índice de recuperação da atividade enzimática atingiu cerca de 57.49% e o maior fator de purificação foi de 2,33. Como pode ser observado na Figura 9, o melhor ensaio selecionado de acordo com a combinação do maior índice de atividade específica, fator de purificação (FP) e rendimento na atividade foi o ensaio 16 (M_{PEG} 8000, C_{PEG} 12%, C_{PHO} 15% e pH 8).

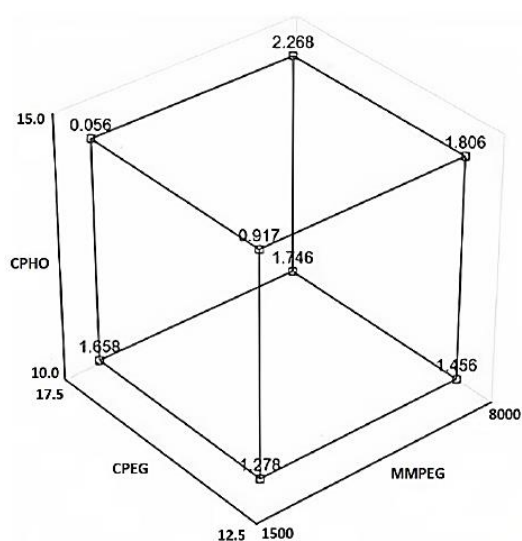
Figura 8 - Gráfico de Pareto apresentando a influência das variáveis no coeficiente de partição (K).



(1) MMPEG (Massa molar do PEG); (2) CPEG (concentração do PEG); (3) C_{PHO} (concentração do fosfato).

Fonte: Própria (2021).

Figura 9 - Gráfico cubo apresentando os efeitos da massa molar e concentração de PEG (MPEG; CPEG%) e concentração do fosfato de sódio (C_{PHO}) sobre o fator de purificação (FP) na fase PEG do SDFA.

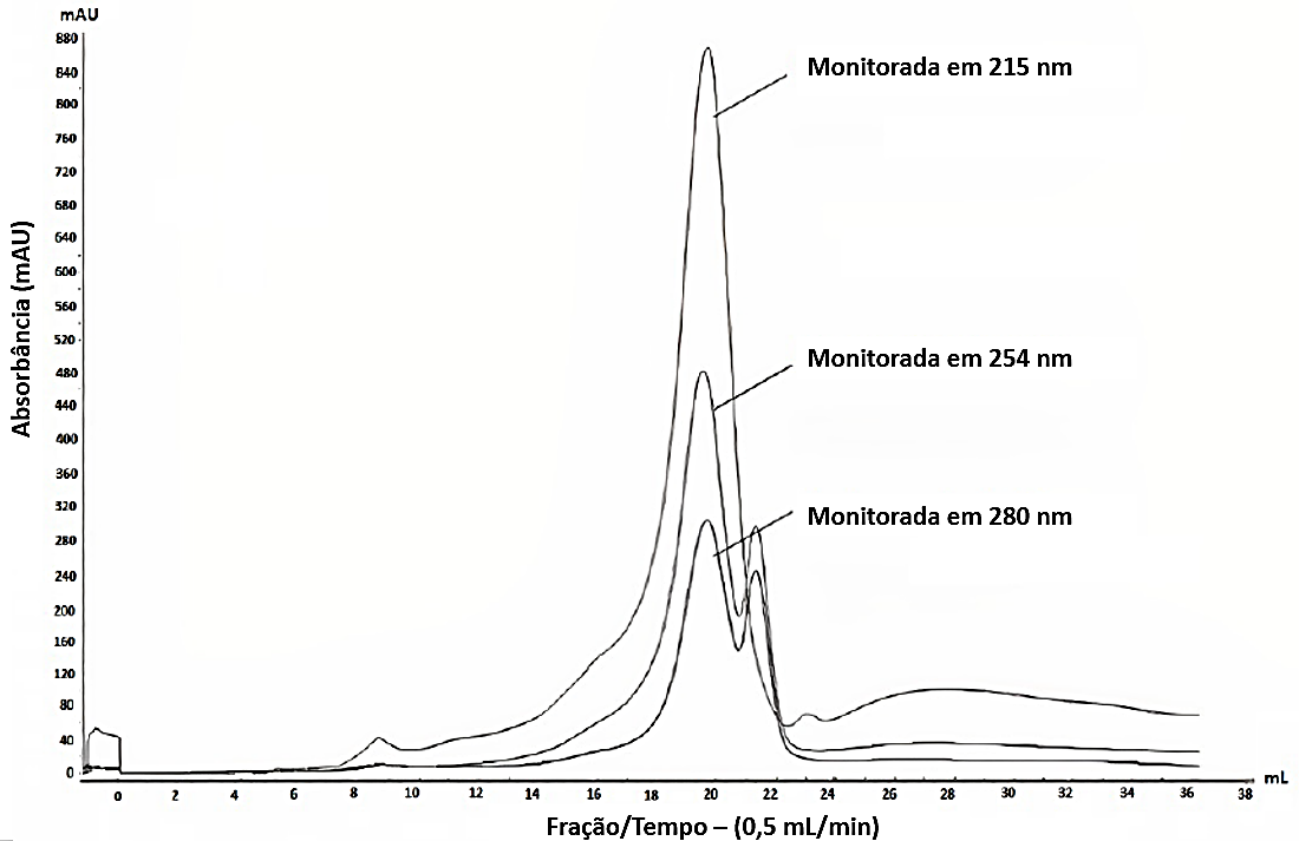


Fonte: Própria (2021).

5.3. PURIFICAÇÃO DA ENZIMA

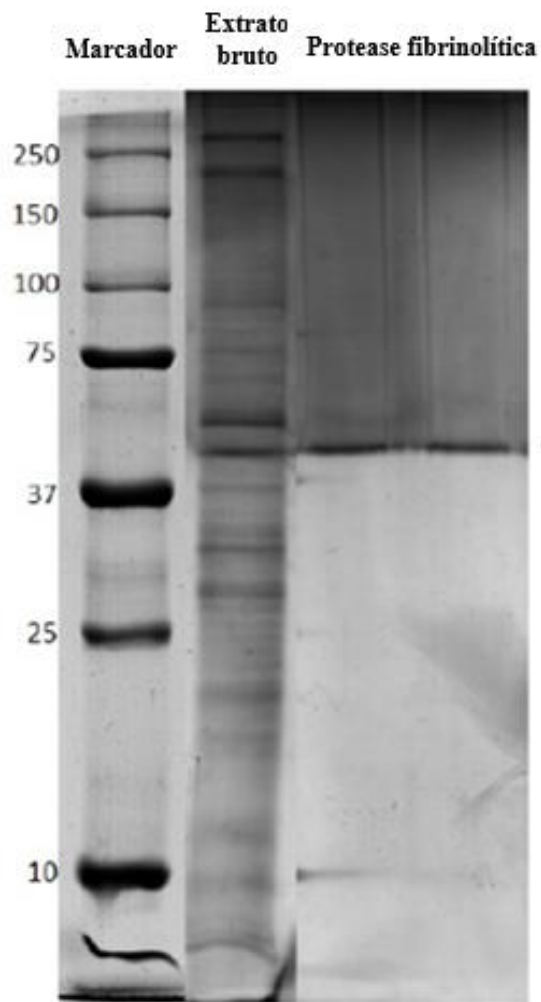
Durante a gel filtração cromatográfica a protease foi monitorada nas diferentes condições de absorvância 215, 254 e 280 nm. Como pode ser visto na Figura 10, o pico de absorvância apareceu na faixa de 16 a 22 ml. O peso molecular da enzima foi estimado em aproximadamente 42,65 kDa (Figura 11).

Figura 10 - Cromatograma das proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e extraídas por SDFA PEG-Fosfato.



Fonte: Própria (2021).

Figura 11 - Determinação da massa molecular da protease fibrinolítica por SDS-PAGE (12%) com marcador de massa molecular da proteína (Precision Plus Protein Dual Color Standards).



Fonte: Própria (2021).

5.4. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

O efeito de íons, surfactantes e inibidores sobre a atividade da enzima está descrito na Tabela 5. Em resumo, houve um aumento da atividade da enzima na presença de Fe^{2+} e um decréscimo na presença de β -Mercaptoethanol, PMSF, e ácido iodoacético.

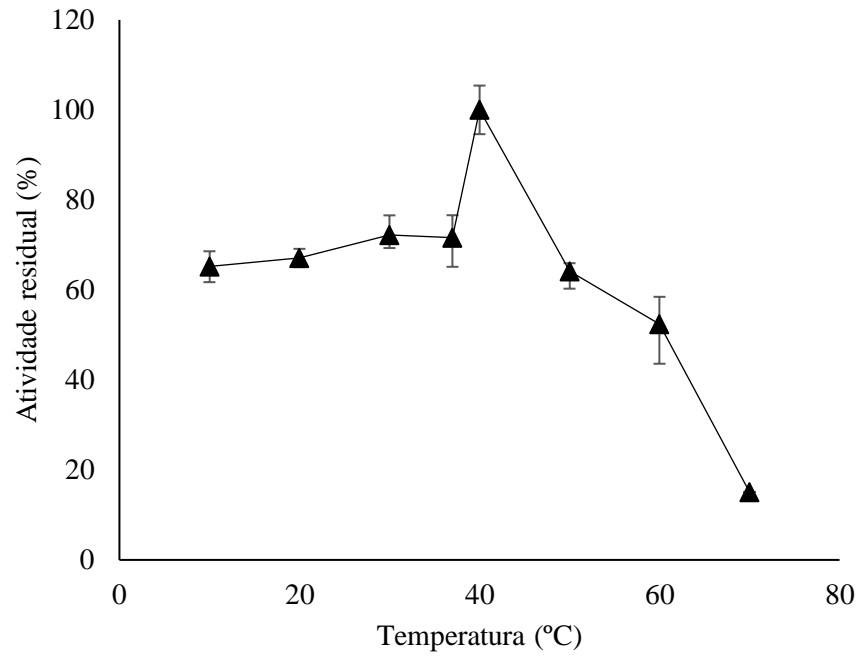
Tabela 5 - Efeito de íons, surfactantes e inibidores sobre a atividade proteásica da enzima.

Substância	Residual activity (%)
Controle	100,00
Cálcio	96,91 \pm 4,36
Zinco	76,23 \pm 18,76
Ferro	155,86 \pm 6,54
Cobre	96,91 \pm 5,23
Magnésio	118,18 \pm 0,00
Sódio	106,82 \pm 16,07
Potássio	104,55 \pm 0,00
Tween 20	76,23 \pm 11,78
Tween 80	108,02 \pm 0,87
Triton X100	75,62 \pm 12,65
SDS	79,63 \pm 1,74
EDTA	104,55 \pm 12,85
PMSF	25,00 \pm 16,07
2-mercaptoethanol	9,09 \pm 6,42
Ácido iodoacético	29,55 \pm 3,21

Fonte: Própria (2021).

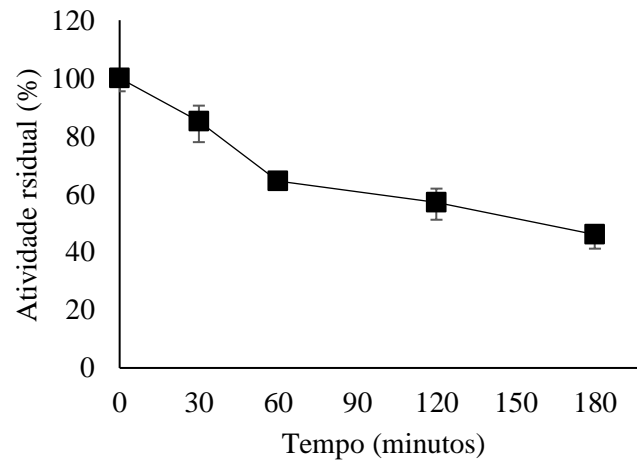
Sobre o efeito da temperatura na estabilidade da enzima e temperatura ótima, como visto na Figura 12, a temperatura ótima para a atividade enzimática foi 40°C. A atividade da enzima foi estável entre 30 °C e 60 °C. Já na temperatura ótima, a enzima foi estável por 30 minutos (Figura 13), apresentando uma atividade residual de 85%.

Figura 12 - Efeito da temperatura na atividade proteolítica da enzima.



Fonte: Própria (2021).

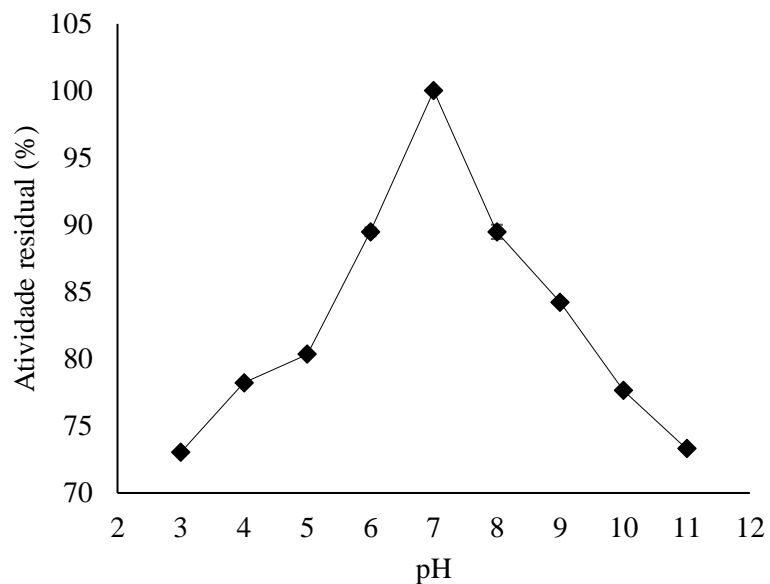
Figura 13 - Estabilidade da atividade da protease a 40°C.



Fonte: Própria (2021).

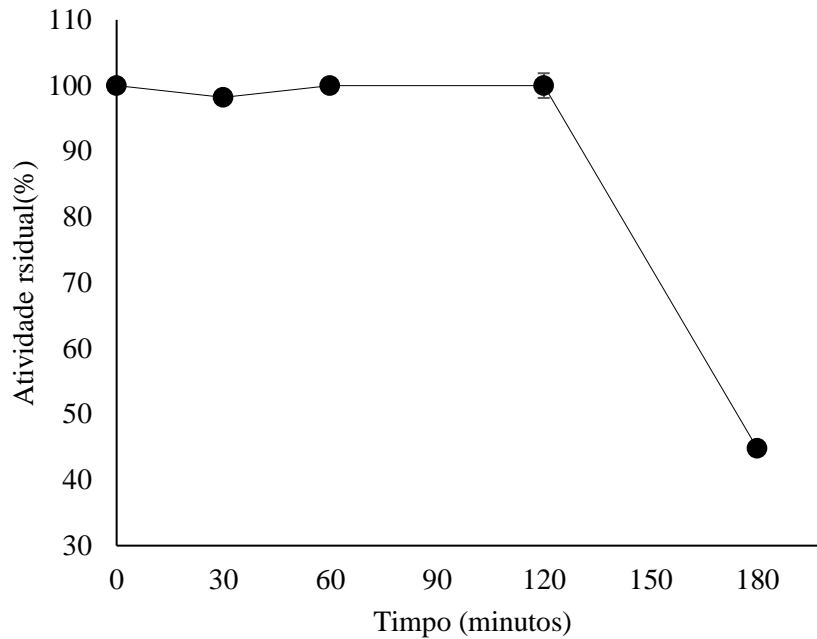
Os valores obtidos para a atividade proteolítica da enzima produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 submetida a diferentes pH (3.0 a 11.0) é mostrado na Figura 14. O pH ótimo da enzima foi 7.0, se mantendo estável por 120 minutos neste pH (Figura 15). A protease também se manteve estável na faixa de pH 7,0 a 8,5.

Figura 14 - Efeito do pH na atividade proteásica da enzima.



Fonte: Própria (2021).

Figura 15 - Estabilidade da atividade proteásica da enzima em pH 7,0.



Fonte: Própria (2021).

6. DISCUSSÃO

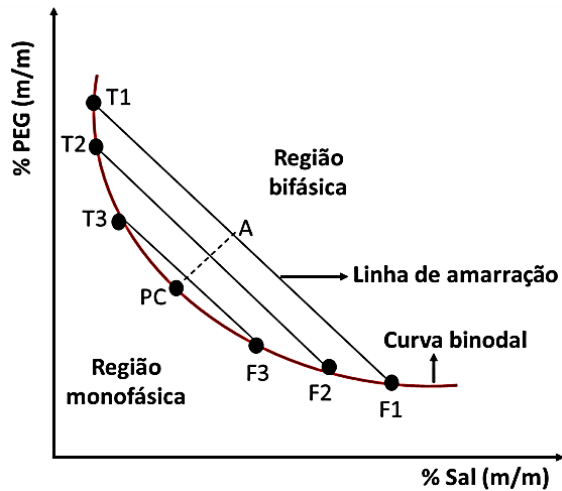
Para fins industriais os microrganismos são as fontes de enzimas mais cobiçadas por apresentarem um enorme custo benefício em termos de quantitativos e qualitativos de produção, sendo um dos principais componentes disso o substrato do meio de cultura utilizado na fermentação do microrganismo. Os meios de cultura são chaves principais no crescimento e desenvolvimento *in vitro* dos microrganismos, eles devem atender as exigências mínimas do ambiente *in vivo* característica de cada linhagem. Os fatores nutricionais do meio envolvem a fontes de água, energia, carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, elementos traços como o zinco e fatores de crescimento, como por exemplo as vitaminas. Além disso, há a influência neste de fatores ambientais, como a temperatura, o pH, osmolaridade e o metabolismo do próprio microrganismo (Nascimento *et al.*, 2020).

Nos tempos atuais vem crescendo cada vez mais o uso de resíduos como fonte de nutrientes microbiológicos, a pratica não só proporciona a diminuição do impacto ambiental causado pelas matérias descartadas resultantes das atividades humanas, como também se torna

uma técnica econômica por esses substratos serem adquiridos por valores baixos ou até mesmo gratuitamente. A produção agropecuária é uma das que mais se destacam em todo o mundo, não só pelo aumento de investimentos e produção, como também em relação a geração de resíduos, que de acordo com a Organização das Nações Unidas Para a Alimentação e a Agricultura (FAO) podem atingir, mundialmente, cerca de 1,3 bilhão de toneladas por ano, gerados principalmente pelas indústrias de alimentos. Isso encaminha a biotecnologia cada vez mais a prática *eco-friendly* durante os processos fermentativos, priorizando o uso de resíduos como substratos de meios de cultura (NASCIMENTO *et al.*, 2020). Silva *et al.*, 2015 em seu estudo realizado sobre a produção de proteases fibrinolíticas por *Streptomyces sp.* DPUA 1576 fez uso de farinha de soja como substrato para a produção dessas enzimas, os autores demonstraram que esse foi o melhor substrato para a produção de enzimas fibrinolíticas por *Streptomyces sp.* DPUA 1576, alcançando um pico de atividade fibrinolítica de 706,5 mm² na concentração de 1,7% de farinha de soja. Outro resíduo agroindustrial, o bagaço da cana-de-açúcar, foi o substrato escolhido por Prabhu *et al.*, 2021 para a produção de proteases fibrinolíticas, o meio otimizou a produção que chegou a atingir cerca de 3832 U/ml⁻¹ de proteases fibrinolíticas por *Alcaligenes aquatilis* PJS_1.

Durante a extração de proteases fibrinolíticas pelo sistema de duas fases aquosas PEG-Fosfato não houve a divisão de fases nos ensaios 5, 7 e 15, o que pode ser explicado pela curva binodal do SDFa (Figura 16), a qual determina a separação das fases. Ou seja, a combinação das variáveis contidas nesses ensaios ficou abaixo da linha binodal, deixando assim, um meio monofásico, já nos demais ensaios esses resultados ficaram superiores a curva binodal proporcionando, nesse caso, um meio bifásico. O mesmo foi visto por Silva *et al.* (2020) com a aplicação do SDFa PEG-Fosfato em sementes de *Gliricidia sepium* para a extração de proteases fibrinolíticas e por Nascimento *et al.* (2020) na pré-purificação proteases fibrinolíticas produzidas por *Aspergillus tamaris* Kita UCP 1279.

Figura 16 – Diagrama de fases para um sistema de duas fases aquosas PEG-SAL.



Curva binodal (linha vermelha); região bifásica (acima da curva); região monofásica (na curva ou abaixo dela); T1-F1, T2-F2 e T3-F3 linhas de amarração (*tie line*) que representam a composição completa de três diferentes sistemas polímero e sal.

Fonte: Pedro (2020).

Um coeficiente de partição maior que 1 ($K > 1$) demonstra que as proteases fibrinolíticas particionaram para a fase rica em PEG, o resultado da partição da enzima foi igual ao encontrado por Silva *et al.*, 2013 ao realizar a extração de proteases fibrinolíticas produzidas por *Streptomyces sp.* DPUA1576 através do SFDA PEG-Fosfato semelhante ao aqui exposto. Entre as variáveis estudadas (pH, concentração do PEG, massa molar do PEG e concentração do sal), a que mais influenciou na partição das enzimas para a fase superior do SFDA foi o pH. Pode-se afirmar que quanto maior o pH maior a influência na partição para a fase PEG. A interação das variáveis: massa molar do PEG e concentração do sal também foi uma das mais significativas, sendo uma interação diretamente proporcional, ato justificado pela combinação dos efeitos volume excluído devido à alta massa molar do PEG e o efeito *salting out* que se trata da força iônica da fase salina. Ao analisar as estatísticas das variáveis resposta fator de purificação e índice de recuperação, foi observado que a interação das variáveis massa molar do PEG e concentração de sal também foram significativas, sugerindo uma interação proporcional dessas variáveis.

A cromatografia de gel filtração permite a separação de moléculas de acordo com a diferença entre seus tamanhos, como assim também proporciona a preservação da atividade

biológica molécula. O peso molecular da protease fibrinolítica produzida por *S. parvulus* DPUA 1573 foi visto pelo perfil cromatográfico como 42,65kDa. A eletroforese demonstrou uma banda com 40kDa, e isso demonstra o sucesso dos métodos de partição e purificação da enzima em estudo. Sendo esses resultados semelhantes aos encontrados pelos autores Matsubara *et al.* (2000) e Banerjee *et al.* (2013) na purificação de proteases fibrinolíticas produzidas por *Codium sp.* de pesos moleculares 30 e 50 kDa, respectivamente. Resultado também aproximado das proteases fibrinolíticas de *Streptomyces sp.* CS684 (35kDa), estudadas por Simkhada *et al.* (2010).

Uma das classificações atribuídas ao grupo das proteases é realizada de acordo com as substâncias presentes no local onde ocorre a reação enzimática. Levando essa característica em consideração, o banco de dados exclusivo sobre proteases MEROPS, classifica as proteases entre as famílias: aspártico (A), cisteína (C), glutâmico (G), metalo (M), asparagina (N), misto (P), serina (S), treonina (T) e desconhecido (U) (MEROPS, 2019; MURI, 2014). O grupo das serino proteases (EC 3.24.21) se caracterizam por hidrolisar as ligações peptídicas das proteínas através da ação da serina e possuem íons no seu mecanismo catalítico. Como visto, Fe^{+2} foi o íon metálico que mais potencializou a atividade fibrinolítica da enzima (55,86%), já o decréscimo da atividade fibrinolítica foi mais influenciado por Zn^{+2} (23,77%) e pelo inibidor PMSF (75%), caracterizando essa enzima como uma possível serino protease. Enzimas essas que estão totalmente presentes no sistema hemostático por serem a totalidade do sistema fibrinolítico. Sobre a influência de íons e inibidores na atividade fibrinolítica de proteases, Li *et al.* (2021) observou o mesmo em relação ao inibidor supracitado, porém algo diferente quando se trata do Fe^{2+} , que no seu estudo sobre serino proteases do cogumelo *Agrocybe aegerita* foi um dos protagonistas no decaimento da atividade. Em suas análises sobre proteases produzidas pelo fungo *Neurospora sitophila*, Deng *et al.* (2018) também observou a inibição da serino protease por Zn^{+2} . Resultados semelhantes foram vistos por Moon *et al.* (2014), Nascimento *et al.* (2017) e Elhoul *et al.* (2015) em seus estudos com foco em serino proteases produzidas por *Lyophyllum shimeji*, *Mucor subtilissimus* UCP 1262 e *Streptomyces koyangensis* TN650. O que também ressalta a pesquisa o trabalho de Sun *et al.* (2016), que descreve a maioria das enzimas produzidas por microrganismos como serino proteases.

Segundo Wang *et al.* (2011) enzimas geralmente possuem suas atividades inativadas na presença de surfactantes. O correspondente pode ser visto na Tabela 5, onde a maioria dos surfactantes utilizados no estudo, tiveram influência negativa sobre a atividade da protease fibrinolítica de *S. parvulus* DPUA 1573. Porém, ainda segundo o autor isso pode acontecer em consequência a alteração na conformidade da enzima e devido a presença de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, que também em seu estudo observou a redução na atividade da serino protease “BSN1” produzida por *Bacillus subtilis* TKU007.

Apresentar estabilidade da atividade na faixa de pH 7,0 – 8,5, e atividade ótima em pH 7,0, faz da protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces parvulus* DPUA 1513 um empolgante candidato a princípio ativo a ser utilizado na terapia trombolítica, já que os parâmetros de pH mencionados giram em torno do pH fisiológico humano (7,5). Além disso, de acordo com seu pH ótimo a enzima pode ser classificada como uma protease neutra. Sendo esses resultados compatíveis com os de Yang *et al.* (2019) com proteases obtidas de *Bacillus amyloliquefaciens*, Hu *et al.* (2019) com as de *Bacillus subtilis* DC27 e Deng *et al.* (2018) com *Neurospora sitophila*. Os achados sobre o desenvolvimento da protease fibrinolítica sobre as temperaturas de 10, 20, 30, 37, 40, 50, 60e 70°C foram semelhantes aos encontrados por Batista *et al.* (2017) em estudos com *Streptomyces parvulus* DPUA 1573.

7. CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados apresentados, essa pesquisa expôs que o substrato coringa para a produção de proteases fibrinolíticas pela actinobactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 é a farinha da casca de maracujá na concentração de 2,5. A extração de protease por SDFa teve sucesso compatível de acordo com o já exposto na literatura, demonstrando também que o sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato garante maior seletividade na separação da molécula e um baixo custo durante a extração de proteases de *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. Pelos parâmetros de pH e temperatura ótima, a enzima se mostrou em uma opção viável para o desenvolvimento de um possível medicamento com ação fibrinolítica já que ambos se assemelham com as condições fisiológicas do sangue.

8. REFERÊNCIAS

AHMED, A. S.; GUPTA, S.; ANSARI, A. H.; Tenecteplase infusion: The saviour in partially successful thrombolysis of prosthetic heart valve thrombosis. **IHJ Cardiovascular Case Reports (CVCR)**. v.5, p.112-115, 2021

AL-ABOUDI, A. *et al.* Fungal biotransformation of diuretic and antihypertensive drug spironolactone with *Gibberella fujikuroi*, *Curvularia lunata*, *Fusarium lini*, and *Aspergillus alliaceus*. **Steroids**, v. 128, p. 15-22, 2017.

ALBUQUERQUE W. M. C. *et al.* Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium sp.* UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Protein expression and purification**, v. 133, p. 8-14, 2017.

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

ANUSREE, M. *et al.* Optimization of process parameters for the enhanced production of fibrinolytic enzyme by a newly isolated marine bacterium. **Bioresource Technology Reports**, v. 11, p. 100436, 2020.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, n. September 2011, p. 1–10, 2012

ASSIS, R. C. *et al.* **Microchemical Journal**. Extraction of arsenic (III) in aqueous two-phase systems: A new methodology for determination and speciation analysis of inorganic arsenic, v.147, p. 429-436.

ASTRUP, T.; MÜLLERTZ, S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 40, n. 2, p. 346-351, 1952.

BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid–liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 1, p. 83-89, 2008.

BANERJEE, S.; PRASANNA, R.; BAGCHI, S. N. Purification and characterization of a fibrino(geno)lytic protease from cultured natural isolate of a cyanobacterium, *Anabaena fertilissima*. **Journal of applied phycology**, v. 25, n. 4, p. 1111-1122, 2013.

BARUZZI, A. C. A.; STEFANINI, E.; MANZO, G. Fibrinolíticos: Indicações e tratamentos das complicações hemorrágicas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**. v.28, 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, p. 123-129, 2017.

BENSCH, M.; SELBACH, B.; HUBBUCH, J. High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 7, p. 2011–2021, 2007.

BHARGAVA, V. *et al.* Streptokinase irrigation through a percutaneous catheter helps decrease the need for necrosectomy and reduces mortality in necrotizing pancreatitis as part of a step-up approach. **Surgery**. v.170, p.1532-1537, 2021.

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**, p. 3-27, 2017.

BOUKHALFA-ABIB, H.; LARABA-DJEBARI, F. Ccmp-ii, a new hemorrhagic metalloproteinase from *Cerastes* snake venom: Purification, biochemical characterization and amino acid sequence analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 167, p. 65-73, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Trombose**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/t/trombose>. Acesso em 03 jul. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde: **Gestação de Alto Risco**. Manual Técnico. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/gestacao_alto_risco.pdf. Acesso em: 09 ago. 2021.

BRENES, L. C. Antiplaquetarios. **Revista Costarricense de Cardiología**, v. 14, n. 1-2, p. 21-25, 2012.

BROOS, Ka. *et al.* Platelets at work in primary hemostasis. **Blood reviews**, v. 25, n. 4, p. 155-167, 2011.

BROUWERS, K. *et al.* Management of free flap salvage using thrombolytic drugs: A systematic Review. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. v.73 p. 1806-1814, 2020.

CARONE, S. E. *et al.* BjsP, a novel serine protease from *Bothrops jararaca* snake venom that degrades fibrinogen without forming fibrin clots. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 357, p. 50-61, 2018.

CASTAMAN, G. How I treat von Willebrand disease. **Thrombosis Research**, 2020

CHANDRAMOHAN, M. *et al.* Production, characterization and optimization of fibrinolytic protease from *Bacillus pseudomycoloides strain MA02* isolated from poultry slaughter house soils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101371, 2019.

CHIKA, S.; IWASHITA, K.; SHIRAKI, K. Salt-containing aqueous two-phase system shows predictable partition of proteins with surface amino acids residues. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 1182 – 1186, 2019.

COELHO, D. F. *et al.* Bromelain purification through unconventional aqueous two-phase system (PEG/Ammonium sulfate). **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 36, n. 2, p. 185–92, 2013, volume 490, 30 June 2019, Pages 77-85.

CONCEIÇÃO, J. C. S. *et al.* *Aspergillus brasiliensis*-mediated biotransformation of methyl p-coumarate via phenyloxiran moiety: A predictive model for environmental bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 158, p. 105167, 2021.

CRUZ, A. V. A. Processos de “downstream” aplicados na conversão de materiais lignocelulósicos. 2021. 65 f. Monografiaa (Engenharia Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

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.

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.* 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, 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.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O. D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

DE 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.

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.

E SILVA, P. E. C. *et al.* *In vitro* thrombolytic activity of a purified fibrinolytic enzyme from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chromatography B**, v. 1092, p. 524-529, 2018.

ELHOUL, M. B. *et al.* A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 871-882, 2015.

ELLEUCH, J. *et al.* Extracellular neutral protease from *Arthrospira platensis*: Production, optimization and partial characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1491-1498, 2021.

ENZYME. **Enzyme entry: EC 3.4.21.7**. Disponível em: <https://enzyme.expasy.org/EC/3.4.21.7>. Acesso em 11 ago. 2021.

FAO. **Desperdício de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade**. Disponível em: <http://www.fao.org.br/daccatb.asp>. Acesso em: 20 de Julho de 2021.

FERREIRA, C. N. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p. 416-421, 2010.

FU, C. *et al.* Creating efficient novel aqueous two-phase systems: salting-out effect and high solubility of salt. **Fluid Phase Equilibria**, v. 490, p. 77-85, 2019..

GIL, M. R. Overview of the coagulation system. *In: Transfusion Medicine and Hemostasis*. Elsevier, 2019. p. 559-564.

GROVER, S. P.; MACKMAN, N. Tissue factor: an essential mediator of hemostasis and trigger of thrombosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 38, n. 4, p. 709-725, 2018.

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, S. *et al.* Improved production of fructooligosaccharides (FOS) using a mutant strain of *Aspergillus oryzae* S719 overexpressing β -fructofuranosidase (FTase) genes. **LWT**, v. 146, p. 111346, 2021.
- 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. 1-10, 2019.
- IQBAL, M. *et al.* Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological procedures online**, v. 18, n. 1, p. 18, 2016.
- IRE, F. S.; CHIMA, I. J.; EZEBUIRO, V. Enhanced xylanase production from UV-mutated *Aspergillus niger* grown on corn cob and sawdust. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101869, 2021.
- ISHIDA, T. *et al.* Development of a risk stratification scoring system for deep vein thrombosis of psychiatric admission. **Journal of Psychosomatic Research**. v.147, 2021.
- JIMENEZ, Y. P.; GALLEGUILLOS, H. R.; CLAROS, M. Liquid-liquid partition of perchlorate ion in the aqueous two-phase system formed by NaNO₃ + Poly(ethylene glycol)+H₂O. **Fluid Phase Equilibria**. v. 421, p. 93-103. 2016.
- JIN, M. C. *et al.* Hemorrhage risk of direct oral anticoagulants in real-world venous thromboembolism patients. **Thrombosis Research**, v. 204, p. 126-133, 2021.
- JIN, X. *et al.* Thermostable β -xylosidase from *Aspergillus fumigatus*: Purification, characterization and potential application in lignocellulose bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 155, p. 1425-1431, 2020.
- JOLY, B. S.; SIGURET, V.; VEYRADIER, A. Understanding athophysiology of hemostasis disorders in critically ill patients with COVID-19. **Intensive care medicine**, v. 46, n. 8, p. 1603-1606, 2020.
- JOZALA, A. F. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 51-63, 2016.
- 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.
- KATROLIA, P.*et al.* Gene cloning, expression and homology modeling of first fibrinolytic enzyme from mushroom (*Cordyceps militaris*). **International journal of biological macromolecules**, v. 146, p. 897-906, 2020.

KATTULA, S.; BYRNES, J. R.; WOLBERG, A. S. Fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 37, n. 3, p. e13-e21, 2017.

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, Chahinez *et al.* Risk of Venous Thromboembolism in Rheumatoid Arthritis. **Joint Bone Spine**, p. 105122, 2020.

KHAN, B. M.; CHEONG, K.; LIU, Y. ATPS: “Aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 19, p. 3165-3178, 2019.

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. 7, p. 1567-1575, 2019.

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.

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.

LATGÉ, J. P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, p. e00140-18, 2019.

LERMAN, M. *et al.* Post transplant renal vein thrombosis, with successful thrombectomy and review of literature. **International Journal of Surgery Case Reports**. v.61 p.291-293, 2019.

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.

LIMA, F. R. **Avaliação de isolados clínicos e ambientais de *Aspergillus spp.*: caracterização morfológica e molecular de espécies, perfil de suscetibilidade e busca por mutações relacionadas à resistência aos antifúngicos azólicos.** 2019. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

LIMA, S. M. A. **Bioprospecção de compostos produzidos por *Streptomyces spp.* Isolados da região amazônica com potencial biotecnológico.** 2017. 125 f. Doutorado (Biotecnologia) – RENORBIO, a Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

LINARDI, A. & SILVA, T. A. R. Fármacos que afetam as funções renal e cardiovascular. *In: LINARDI et al. Farmacologia Essencial*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. cap. 8, p. 269- 271.

LIPPI, G.; FAVALORO, E.J. Laboratory hemostasis: from biology to the bench. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, n. 7, p. 1035-1045, 2018.

LUCILIUS, C. **Trombose: uma doença silenciosa alertada em dia mundial**. Disponível em: <https://hc.unicamp.br/trombose-uma-doenca-silenciosa-alertada-em-dia-mundial/>. Acesso em 08 ago. 2021.

MACFARLANE, R. G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, n. 4931, p. 498-499, 1964.

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.

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.

MATSUBARA, K. *et al.* Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 1, p. 137-143, 2000.

MEROPS. **Families of Proteolytic Enzymes**. Disponível em: https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P. Acesso em 17 set. 2021.

MONROE, D. M.; HOFFMAN, M. Theories of blood coagulation: basic concepts and recent updates. **Hemostasis and Thrombosis**, p. 1, 2014.

MOON, Sung. 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.

MUKHERJEE, A. K.; RAI, S. K. A statistical approach for the enhanced production of alkaline protease showing fibrinolytic activity from a newly isolated Gram-negative *Bacillus sp.* strain AS-S20-I. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 182-189, 2011.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptideomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

MUSIDLAK, O. Plant latex proteins and their functions. *In: NAWROT, R. Advances in Botanical Research.: Látex, laticíferos e seus componentes moleculares De funções a possíveis aplicativos*. Vol. 93. Amsterdã: Elsevier, 2020. Cap. 3, pag. 55-97.

NADAR, S. S.; PAWAR, R. G.; RATHOD, V. K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017.

NAJARZADEH, Z. *et al* Heparin promotes fibrillation of most phenol soluble modulin virulence peptides from *S. aureus*. **Journal of Biological Chemistry**. 2021.

NASCIMENTO, C.O. *et al*. Aqueous two-phase systems: new strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds. **Separation and Purification Technology**, v. 116, p. 154-161, 2013.

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: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 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.

NASCIMENTO, V. *et al*. **Resíduos agroindustriais: uma alternativa promissora e sustentável na produção de enzimas por microrganismos**. In: I Congresso Internacional da Agroindústria. 2020. Disponível em: <https://ciagro.institutoidv.org/anais.php>. Acesso em 31 out. 2021.

NERYS, L. L. A. **Avaliação das atividades antimicrobiana e anticâncer de Metabólitos produzidos por *Streptomyces sp.*** 2015. 69f. Mestrado (Microbiologia e Citotoxicidade) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

NEUENSCHWANDER, P. F. Coagulation Cascade: Overview. **Module in Biomedical Sciences**. 2021.

OCHNEVA, A. *et al*. Usage of vermiculite as promising carrier for solid-state fermentation for fibrinolytic enzymes production by *Aspergillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 305, p. S52, 2019.

OLANREWaju, O. S.; BABALOLA, O. O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1179-1188, 2019.

OLIVEIRA, A. P. *et al*. Importância das actinobactérias em processos ecológicos, industriais e econômicos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, 2014.

PALOMEQUE, A. *et al*. Mediastinitis focal com trombose arterial pulmonar associada tras EBUS-TBNA. **Archivos de Bronconeumología**. v.57 p.73-74, 2020.

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.

PEDRO, M. S. **Efeito de padrões de escoamento sobre o particionamento de biomoléculas (proteína e ampicilina) em sistemas aquosos bifásicos (SABs) empregando microsistemas**. 2020. 83 f. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

PORCEDDU, E. *et al.* Sex-related characteristics of cerebral vein thrombosis: a secondary analysis of a multicenter international cohort study. **Thrombosis Research**. v.196 p.371-374, 2020.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1996.

PORTO, T. S. *et al.* Extraction of ascorbate oxidase from *Cucurbita maxima* by continuous process in perforated rotating disc contactor using aqueous two-phase systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1057–64, 2010.

PRABHU, N. *et al.* Utilization of sugarcane bagasse for enhancement production of fibrinolytic enzyme using statistical approach. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 5, p. 100269, 2021.

PRIDHAM, T. G. *et al.* A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. **Antibiot Manual** 1: 947-953, 1957.

PROCÓPIO, R. E. L. *et al.* Antibióticos produzidos por *Streptomyces*. **Revista Brasileira de Doenças Infecciosas**, v. 16, n. 5, pág. 466-471, 2012.

RAJ, A. *et al.* Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1845-S1851, 2012.

RAO, S. N. C. K.; HARSHA, G.; PRAVEEN, N.; Comparative study of fibrinolytics used for the treatment of acute myocardial infarction in a tertiary care hospital - an observational study. **Indian Heart Journal**. v.71, p. S66, 2019.

REGAN, L. Thrombophilia: An exaggerated prothrombotic response to pregnancy underlies many cases of recurrent pregnancy loss. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 70, p. D15-D16, 2000.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. V *et al.* Partition in aqueous two-phase system: its application in downstream processing of tannase from *Aspergillus niger*. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 101, p. 392–7, 1 jan. 2013.

SACHETTO, A. T. A.; MACKMAN, N. Modulation of the mammalian coagulation system by venoms and other proteins from snakes, arthropods, nematodes and insects. **Thrombosis research**, v. 178, p. 145-154, 2019.

SANCHEZ, E. F. *et al.* A novel fibrinolytic metalloproteinase, barnettlysin-I from *Bothrops barnetti* (Barnetts pitviper) snake venom with anti-platelet properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, n. 3, p. 542-556, 2016.

SARTIM, M. C. **Isolamento, caracterização bioquímica e funcional in vitro e in vivo de uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops moojeni* envolvida no processo de ativação de fatores da cascata de coagulação.** 2014. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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.

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.

SILVA, G. M. M. *et al.* Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces sp.* DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 339, p. 52-57, 2013.

SILVA, G. M. M. *et al.* Fibrinolytic protease production by new *Streptomyces sp.*: DPUA 1576 from Amazon lichens. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 16-19, 2015.

SILVA, R. D. R. S. R.; MELO, E. M. M. M. A atual teoria da coagulação baseada em superfícies celulares. **Saúde & ciência em ação**, v. 2, n. 1, p. 79-92, 2016.

SIMKHADA, J. R. *et al.* A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces sp.* CS684. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 88-93, 2010.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

STEWART, L. K.; KLINE, J. A. R.; Fibrinolytics for the treatment of pulmonary embolism. **Translational Research**. v.225, p.82-94, 2020.

STRAUSS, T.; SIDLIK-MUSKATEL, R.; KENET, G. Developmental hemostasis: primary hemostasis and evaluation of platelet function in neonates. *In: Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. WB Saunders, 2011. p. 301-304.

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.

THAI, C.; OBEN, C.; WAGENER, G. Coagulation, hemostasis, and transfusion during liver transplantation. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 34, n. 1, p. 79-87, 2020.

UESUGI, Y. *et al.* Highly potent fibrinolytic serine protease from *Streptomyces*. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 7-12, 2011.

URANO, T.; CASTELLINO, F. J.; SUZUKI, Y. Regulation of plasminogen activation on cell surfaces and fibrin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 16, n. 8, p. 1487-1497, 2018.

VALERIANI, E. *et al.* Anticoagulant therapy for splanchnic vein thrombosis: a systematic review and meta-analysis. **75 Blood**. v.137 p.1233-1240, 2021.

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.

WARD, S. E.; O'SULLIVAN, J. M.; O'DONNELL, J. S. The relationship between ABO blood group, von Willebrand factor, and primary hemostasis. **Blood**, v. 136, n. 25, p. 2864-2874, 2020.

WEISEL, J. W.; LITVINOV, R. I. Red blood cells: the forgotten player in hemostasis and thrombosis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 17, n. 2, p. 271-282, 2019.

YANG, H. *et al.* Genome sequencing, purification, and biochemical characterization of a strongly fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* Jxnuwx-1 isolated from Chinese traditional Douchi. **The Journal of general and applied microbiology**, 2019.

YANG, Z. *et al.* An effective method for the extraction and purification of chlorogenic acid from ramie (*Boehmeria nivea* L.) leaves using acidic ionic liquids. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 78-86, 2016.

ZHANG, C.; QI, S.; MENG, J.; CHEN, X.; Seletive and efficient extraction of heparin by arginine-functionalized flowered mesoporous silica nanoparticles with high capacity. **Separation and Purification Technology**. v.276, 2021.

ZOHRA, D. F. *et al.* Isolation and characterization of novel *Streptomyces* strain from Algeria and its in-vitro antimicrobial properties against microbial pathogens. **Journal of Infection and Public Health**, 2021.