



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus ochraceus*
URM604 e *Aspergillus sclerotiorum* URM5792

Recife-PE

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus ochraceus*
URM604 e *Aspergillus sclerotiorum* URM5792

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociência Animal. Área de concentração: Biotecnologia na linha de Produtos Bioativos.

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

Co-orientador: Prof. Dr.
Romero Marcos Pedrosa Brandão
Costa.

Recife-PE

2020

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)

- C268a Cardoso, Kethylen Barbara Barbosa
Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus ochraceus* URM604 e *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 / Kethylen Barbara Barbosa Cardoso. - 2020.
91 f. : il.
- Orientadora: Ana Lucia Figueiredo Porto.
Coorientador: Romero Marcos Pedrosa Brandao Costa.
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife, 2020.
1. Fermentação em estado sólido. 2. fungos filamentosos. 3. protease fibrinolítica. 4. protease fibrinolítica. 5. resíduo agroindustrial. I. Porto, Ana Lucia Figueiredo, orient. II. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandao, coorient. III. Título

KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

Avaliação do potencial biotecnológico de *Aspergillus ochraceus*

URM604 e *Aspergillus sclerotiorum* URM5792

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Biociência Animal da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
pré-requisito para a obtenção do título
de Mestre em Biociência Animal.

Área de concentração:
Biotecnologia na linha de Produtos
Bioativos

APROVADA em 03 de novembro de 2020

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dr^a Raquel Pedrosa Bezerra (Membro Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o Dr^o Thiago Pajeú Nascimento (Membro Titular)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Porto pela sua orientação, paciência e confiança desde meu primeiro contato com a ciência. E por ser exemplo e segurança em todos os momentos. Agradeço ao Prof. Dr. Romero Brandão pela disponibilidade, paciência e por ter me guiado e aconselhado todos esses anos.

Agradeço a todos os professores vinculados ao LABTECBIO pelos ensinamentos, toda assistência proporcionada e por serem inspiração. Assim como a todos os Pós-doutorandos pelo auxílio no dia a dia, em especial a Dr.^a Juanize Batista e ao Dr. Thiago Pajeú.

Aqui também deposito meus agradecimentos a todos do LABTECBIO e a Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biociência Animal. A Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter me acolhido tão bem, e a todos os professores e estudantes da pós-graduação em Biociência Animal da UFRPE que compartilharam esta experiência comigo.

Agradeço a FACEPE e CAPES pela bolsa e pelo financiamento da pesquisa.

RESUMO

Proteases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases sendo capazes de degradar ligações peptídicas. Algumas destas enzimas possuem especificidade por determinado tipo de substrato, como é o caso de proteases collagenolíticas, atuando na hidrólise de diversos tipos de colágeno. Ou ainda proteases com atividade fibrinolítica, responsáveis pela dissolução dos coágulos de fibrina. Desta forma a procura por novas enzimas e processos mais simples e com menos custos de produção e purificação são incessantes. Nesta perspectiva a utilização de substratos de baixo custo e resíduos agroindustriais em processos fermentativos é uma alternativa para diminuir os gastos na produção enquanto aumenta a eficiência desta etapa. O uso de coprodutos e resíduos agroindustriais como substratos associados a técnica de fermentação em estado sólido (FES), favorece ainda o crescimento de fungos filamentosos, excelentes produtores de enzimas em geral, levando em consideração a diversidade biossistemática e a variedade de enzimas possivelmente produzidas por estes microrganismos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico dos fungos *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 e *Aspergillus ochraceus* URM604 através da FES. Além de purificar a enzima alvo por meio de processos cromatográficos e realizar atividades específicas. Na avaliação do potencial biotecnológico de *A. scleroriorum* foi realizada a identificação da atividade proteolítica (122,71 U/mL) e collagenolítica (16,80 U/mL). As amostras passaram por processo de purificação por meio de precipitação cetônica, onde foi verificada atividade proteásica de 358 U/mL e collagenolítica de 48,63 U/mL, Cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex seguida por SuperdexG75 em sistema FPLC, onde foi alcançada recuperação de 92,8% e atividade proteolítica de 602,38U/mL e collagenolítica de 679,44U/mL. Em relação a caracterização parcial, realizada a partir de atividade collagenolítica, foi observado pH ótimo alcalino (8) e temperatura ótima de 45°C. Já em relação a espécie *A. ochraceus* foram avaliadas as atividades proteásica, collagenolítica e fibrinolítica, obtendo-se resultados promissores (815,33 U/mL 47,33 U/mL e 21,78 U/mL, respectivamente). A metodologia para purificação da protease seguiu os

mesmos parâmetros descritos acima para o *A. scleroriorum* e atingiu-se recuperação de 131,35% (436,67 U/mL) nas amostras obtidas a partir da cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex e atividade de 186,66 U/mL com recuperação de 40% nas amostras eluídas da coluna Superdex G-75 em sistema FPLC. Os microrganismos estudados foram considerados eficientes para a produção de protease com potencial biotecnológico através da FES utilizando substratos de baixo custo, assim como resíduos agroindustriais.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, resíduo agroindustrial, protease colagenolítica, protease fibrinolítica, fungos filamentosos.

ABSTRACT

Proteases are enzymes that belong to the group of hydrolases, they are able of degrading peptide bonds. Some of these enzymes have specificity for a particular type of substrate, such as collagenolytic proteases, acting on the hydrolysis of several types of collagen. There are also proteases with fibrinolytic activity, responsible for the dissolution of fibrin clots. Therefore, the search for new proteases and simpler processes with less production costs is ceaseless, ergo, the use of low-cost substrates and agro-industrial residues in fermentation processes is an alternative to reduce production costs while increasing the efficiency of this stage. Using these substrates associated with the solid-state fermentation technique (SSF) also favors the growth of filamentous fungi, excellent producers of enzymes in general, considering their diversity and the variety of possibly produced enzymes. Thus, this study aimed to evaluate the production of proteases by fungi *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 and *Aspergillus ochraceus* URM604 through SSF. Furthermore, the protease went through chromatographic processes, characterization, and specific activities such as collagenolytic and fibrinolytic activity. The evaluation of the biotechnological potential of *A. scleroriorum* was carried out by identifying proteolytic (122.71 U/mL) and collagenolytic (16.80 U/mL) activity. The samples went through a purification process by means of ketone precipitation, where a protein activity of 358 U/mL and a collagenolytic activity of 48.63 U/mL were verified. It was also used DEAE-Sephadex ion exchange chromatography followed by SuperdexG75 in FPLC system, where 92.8% recovery was achieved, with proteolytic activity of 602.38 U/mL and collagenolytic activity of 679.44 U/mL. Regarding partial characterization, performed with collagenolytic activity, an optimum alkaline pH (8) and an optimum temperature of 45°C were observed. The species *A. ochraceus*, was evaluated with the following activities: proteinase, collagenolytic and fibrinolytic activity, obtaining promising results (815,33 U/mL, 47.33 U/mL and 21.78 U/mL, respectively). The methodology for purifying the protease followed the same parameters described above and it was found 131.35% recovery (436.67 U/mL) in the samples obtained from the DEAE-Sephadex ion exchange chromatography. It was also determined proteolytic activity of 186.66 U/mL with 40% recovery in samples eluted from

the Superdex G-75 column in FPLC system. The microorganisms studied were considered efficient to produce protease with biotechnological potential through SSF using low cost substrates, as well as agro-industrial residues.

Keywords: Solid-state fermentation, agroindustrial residue, collagenolytic protease, fibrinolytic protease, filamentous fungi.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FES: Fermentação em estado sólido

FPLC: Cromatografia líquida de proteína rápida

OMS: Organização mundial de saúde

t-PA: Ativador tecidual de plasminogênio

Zn²⁺: íon de Zinco

Mg²⁺: íon de Magnésio

Ca²⁺: íon de Cálcio

ALPF: Área de lise em placa de fibrina

ABIC: Associação brasileira da indústria do café

DEAE: Dietilaminoetil

kDa: QuiloDalton

BDA: Batata dextrose ágar

BCA: Albumina de soro bovino

HCl: Ácido clorídrico

NaCl: Cloreto de Sódio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de atividade fibrinolítica, [A] Coágulo de fibrina formado sem ação de enzima fibrinolítica, [B] Início da quebra do coágulo por enzima fibrinolítica, [C] Coágulo quase completamente desfeito por ação enzimática ao fim da reação 22

Figura 2. Fermentação em Estado sólido (FES) do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 em diferentes substratos. [A] FES com Farelo de trigo; [B] FES com borra de café; [C] FES 1:1 com borra de café e de farelo de trigo. 30

Figura 3. Esquema simplificado de processo cromatográfico em seus vários estágios, a aplicação de solução contendo diferentes proteínas, a aplicação do eluente como fase móvel e coleta do eluido contendo as frações da amostra segmentadas (proteína A, B e C, respectivamente) em função do tempo de retenção destas moléculas (TrA, TrB e TrC). 36

Capítulo 1

Figura 1. Perfil cromatográfico da protease collagenolítica..... 51

Figura 2. pH ótimo da protease collagenolítica 52

Figura 3. Temperatura ótima da protease collagenolítica 52

Capítulo 2

Figura 1. Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações. 64

Figura 2. Efeito simultâneo do tipo e quantidade do substrato na produção de proteases por *A. ochraceus* em planejamento fatorial 2^3 65

Figura 3. Cromatograma obtido a partir de coluna DEAE-Sephadex... 67

Figura 4. Perfil de eluição e pico obtido no sistema Superdex 76 FPLC..... 68

Figura 5. pH ótimo [A] e Temperatura ótima [B] da protease parcialmente purificada em cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Aspergillus</i> utilizadas para produção de protease nos últimos 10 anos.	25
---	----

Capítulo 1

Tabela 1. Atividade proteolítica e colagenolítica	50
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Matrix do planejamento fatorial 2^3	60
---	----

Tabela 2. Resultados da produção de protease por <i>Aspergillus ochraceus</i> utilizando planejamento fatorial 2^3	66
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Operações unitárias do processo de purificação de produtos

Biотecnológicos..... 32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Proteases	17
2.1.1. Proteases com ação collagenolítica.....	19
2.1.2. Proteases com ação fibrinolítica	20
2.2. Fontes de proteases.....	23
2.2.1. <i>Aspergillus spp.</i>	24
2.3. Produção de enzimas por fermentação em estado sólido	26
2.3.1. Substratos utilizados em Fermentação em estado sólido	27
2.4. Purificação de produtos biotecnológicos	30
2.4.1. Purificação de proteases	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4. OBJETIVOS	44
4.1. Objetivos gerais	44
4.2. Objetivos específicos	44
CAPÍTULO 1	45
Produção de collagenase por <i>Aspergillus sclerotiorum</i> URM-5792 usando resíduos de café como meio para fermentação em estado sólido	46
Resumo	46
Introdução	47
Materiais e métodos	48
Resultados e discussão	50
Conclusão	51
Referências bibliográficas	54
CAPÍTULO 2	55

Produção e purificação parcial de protease produzida por <i>Aspergillus ochraceus</i> URM604	56
Resumo	56
Introdução	57
Metodologia	59
Resultados e discussão	63
Conclusão	70
Referências bibliográficas	71
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
ANEXOS	76
Trabalhos publicados	76
Patentes depositadas	87

1. INTRODUÇÃO

Proteases são biocatalisadores naturais que apresentam afinidade e/ou especificidade por proteínas. Estão essencialmente envolvidas em diversos processos industriais, sendo utilizadas em segmentos como indústria têxtil, de papel e celulose, alimentícia, farmacêutica e veterinária, dentre outros. Podem ser obtidas de fontes vegetais, animais e microbianas, este último destaca-se por ser facilmente replicável e produzido em larga escala (SOUZA *et al.*, 2015). Entre os micro-organismos produtores de enzimas, os fungos filamentosos apresentam grandes vantagens, como: alta produtividade, simples manejo, baixo custo de produção, desenvolvimento rápido e distribuição cosmopolita, (NASCIMENTO *et al.*, 2015; FERREIRA *et al.*, 2016), sendo conhecidas diversas espécies encontradas no Brasil, capazes de produzir proteases. Dentre os fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* é notável pela produção de diversas hidrolases (FERREIRA *et al.*, 2016). Ainda assim, o Brasil obtém a maior parte das enzimas utilizadas pela indústria por exportação, deixando evidente a necessidade de estudos viáveis em relação à novas espécies produtoras e melhoria dos meios de produção.

Nesta perspectiva, a fermentação em estado sólido (FES) é uma ferramenta útil na obtenção de produtos metabólicos de microrganismos e apresenta vantagens em relação a outros tipos de fermentação por ocupar menos espaço, obter maior concentração de produtos, menor possibilidade de contaminação, favorecer o crescimento de fungos filamentosos em virtude da colonização do meio e pela formação de hifas (SOCCOL *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2020). Diversos substratos de baixo custo e alto valor nutricional podem ser utilizados na FES, como é o caso do farelo de trigo (BABU, 2018). Esta técnica possibilita também o uso de resíduos agroindustriais, a fim de diminuir os custos na produção e reduzir o acúmulo desses insumos. Dentre estes, destaca-se a borra de café, um substrato rico em proteínas, carboidratos e lipídeos (PANDEY, 2000) favorecendo a produção enzimática e contribuindo para valorização de resíduos frequentemente descartados no meio ambiente.

Considerando a posterior aplicação da biomolécula de interesse, o aprimoramento ligado à redução de custos nos processos de up e downstream é substancialmente importante, especialmente se tratando de proteases com

possibilidade de aplicação na indústria alimentícia ou farmacêutica, setores que exigem completa purificação (WARD, 2019). Desta forma, faz-se necessária investigação sobre novas fontes de proteases, bem como dos processos para sua obtenção e purificação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteases

Proteases são enzimas responsáveis pela catálise de reações hidrolíticas em ligações peptídicas resultando na liberação de peptídeos e aminoácidos, desta forma, são caracterizadas como hidrolases (SHARMA *et al.*, 2017). A presença dessas enzimas é indispensável em todos os organismos vivos, estas exercem papel importante em vários processos metabólicos, atuam na digestão de proteínas, na cascata de coagulação sanguínea, na apoptose celular, dentre outros (GURUMALESH *et al.*, 2019).

As proteases podem ser classificadas em dois grandes grupos dependendo de seu local de atuação. São consideradas endopeptidases aquelas que clivam proteínas a partir do centro, ou seja, as ligações peptídicas distantes dos terminais de seus substratos, sendo encontradas em qualquer tipo catalítico (PHILIPPS-WIEMANN, 2018). Em contrapartida as exopeptidases clivam ligações peptídicas presentes nos terminais, podendo ainda ser classificadas em Aminopeptidase (proteases que atuam no N-terminal da cadeia polipeptídica) e Carboxipeptidases (responsáveis pela clivagem e liberação de aminoácidos ou peptídeos no C-terminal) (GURUMALESH *et al.*, 2019) em geral, enzimas do mesmo tipo catalítico são inibidas pelos mesmos tipos de moléculas.

Enzimas proteolíticas podem ainda serem classificadas quanto a sua especificidade, ou mecanismo de ação, definido por características estruturais de seu sítio ativo ou ainda posição de resíduo e/ou ligante metálico. Desta forma são agrupadas em serino, aspártico, cisteíno, glutâmico, treonino ou metaloproteases (YIKE, 2011). As serino proteases compõem um terço das proteases conhecidas atualmente, sendo o grupo mais estudado, alguns exemplos de serino proteases são a tripsina e a quimiotripsina. Suas características garantem a hidrólise de ligações peptídicas por meio de resíduo de serina no sítio ativo (YIKE, 2011). Já as aspártico protease recebem este nome por apresentarem dois resíduos de ácido aspártico, um exemplo destas enzimas é a pepsina. As cisteíno proteases destacam-se por englobarem tanto

endo quanto exopeptidases, são exemplos a papaína, calpaína e caspases (YIKE, 2011). As glutâmico proteases, por sua vez, caracterizam-se por apresentarem resíduo de ácido glutâmico em seu sítio ativo e por comumente estarem ativas em pH ácido (TAKAHASHI, 2013). Já Treonino proteases apresentam maior atividade em pH neutro e são em geral muito similares às serino proteases (LI *et al.*, 2012). Por fim, as Metaloproteases possuem em seu sítio catalítico um íon de zinco, um exemplo de metaloprotease são as collagenases produzidas por *Aspergillus flavus* (MARKARYAN *et al.*, 1994). Outro fator importante em relação à classificação de proteases é em relação ao seu pH ótimo, variando entre ácido, neutro e alcalino (SETHI *et al.*, 2016).

Todas essas características conferem às proteases particularidades que ampliam seu uso na pesquisa básica, aplicada e na indústria, constituindo o grupo considerado mais explorado, uma vez que estas enzimas podem ser utilizadas nas mais diversas condições de temperatura e pH, podem ser potencialmente alteradas para ajuste de estabilidade e especificidade e possuem meia-vida maior que catalisadores químicos (ADRIO; DEMAIN, 2014).

Proteases estão presentes no setor alimentício atuando principalmente na alteração/correção da textura e aparência de alimentos, na indústria do processamento do couro e têxtil em geral, em processos de biorremediação, recuperação de íons metálicos e na área farmacêutica e medicinal onde proteases específicas estão presentes na fabricação de medicamentos, agentes tópicos, kits para diagnóstico entre vários outros (RAO *et al.*, 1998; Martínez-Medina *et al.*, 2019; BAJAJ *et al.*, 2013). Além disso, estas enzimas também podem ser utilizadas na fabricação de detergentes, segundo a Novozymes (2019) este seguimento encontra-se em destaque, representando 33% do comércio de enzimas. Em geral, proteases que são usadas nas indústrias de alimentos, processamento de couro e detergentes são preparadas em grandes quantidades e usadas como preparações brutas, enquanto as que são usadas na medicina são produzidas em pequenas quantidades, mas requerem purificação extensiva antes de serem utilizadas (RAO *et al.*, 1998).

2.1.1. Protease com Atividade Colagenolítica

Colágeno e peptídeos de colágeno são biomateriais de grande interesse industrial. São comumente associados a alimentação, medicamentos, cosméticos e outros produtos vinculados à área da saúde humana e animal. Exemplos de aplicações de peptídeos de colágeno estão associados à imunoterápicos (GAO, 2019), tratamento de hipertensão (MCALINDON et al., 2011), fabricação de hidratantes e cosméticos relacionados à desaceleração do foto-envelhecimento (YAGODA; GUNS, 2014), alimentação parenteral (USAMAH, 2019), tratamento de úlceras (YAMANAKA, 2017), atividade antimicrobiana (GÓMEZ-GUILLÉN, et al., 2011) anticâncer e antioxidante (NASRI, 2019), entre outros. Assim, o interesse por estas biomoléculas e suas possíveis aplicações estimula a pesquisa por enzimas capazes de degradar o colágeno, uma vez que, a produção de peptídeos biologicamente ativos é realizada a partir da hidrólise enzimática.

Colagenases são proteases responsáveis pela manutenção de tecidos e órgãos, atuando especificamente na clivagem de colágeno nativo ou desnaturado (OLIVEIRA, 2017). Proteases colagenolíticas, assim como, colágenases também são capazes de hidrolisar diversos tipos de colágeno, podendo ainda atuar em outras proteínas. Ademais, outras proteases podem atuar na degradação de colágeno hidrolisado, como é o caso da tripsina e da quimiotripsina (WATANABE, 2004).

Além da produção de peptídeos, proteases com ação colagenolítica também são empregadas diretamente na indústria, atuando na cicatrização, facilitando a epitelização pelo processo de debridamento e a degradação de placas fibrosas formadas por enfermidades como a doença de Peyronie (JORDAN, 2008). Essas enzimas são também aproveitadas na bio-restauração de afrescos pela remoção de resíduos orgânicos (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Na indústria alimentícia podem ser utilizadas para o amaciamento de carnes em baixas temperaturas, diminuindo as chances de contaminação microbiana, também é utilizada como amaciante na indústria do couro, facilitando a penetração de corante (BHAGWAT *et al.*, 2016; BHAGWAT; DANDGE, 2018).

Proteases colagenolíticas podem ser obtidas a partir de diversas fontes. Colagenases de origem animal clivam o colágeno em sítios específicos, podem ser extraídas a partir de vários vertebrados, com destaque às vísceras de peixes (OLIVEIRA, 2017). Já em plantas, proteases colagenolíticas são comuns nas espécies *Ficus carica* e *Zingiber officinale* (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Devido a suas características específicas que permitem a degradação do colágeno em mais de um local, aos custos de produção e manutenção, por apresentarem alto rendimento, maior produtividade, e facilidade no controle das condições de produção, há predileção por colagenases provenientes de microrganismos (WANDERLEY *et al.*, 2017; BHAGWAT; DANDGE, 2018),

Atualmente o microrganismo responsável pela maior produção de colagenase a nível industrial é *Clostridium sp.*, entretanto sua natureza patogênica e produção de toxinas pode limitar a aplicação das enzimas (BHAGWAT; DANDGE, 2018). Dentro desta perspectiva, o uso de metodologias de purificação é uma etapa crucial para o emprego destas enzimas na indústria, especialmente no campo da saúde e alimentação (NELSON; COX, 2014). Ainda assim, proteínas colagenolíticas obtidas a partir de microrganismos apresentam mais vantagens em relação às aquelas provenientes de animais ou plantas. Wanderley *et al.*, (2017) analisaram o uso de fungos filamentosos na produção de proteases, destacando-os como excelentes produtores de colagenase, com ênfase nos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*.

2.1.2. Protease Fibrinolítica

A formação de coágulos de fibrina é um processo importante na regulação do sistema hemostático assim como sua dissolução por meio da fibrinólise. No entanto, o desequilíbrio causado por alguns distúrbios pode resultar em falha em dissolver estes coágulos, podendo interromper o fluxo sanguíneo e causar problemas graves para o indivíduo afetado, como trombose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, entre outras doenças ligadas ao sistema cardiovascular. Doenças cardiovasculares afetam milhões de pessoas no mundo, sendo responsáveis por 30% das mortes no mundo (OMS, 2017) e o custo do tratamento destas enfermidades,

especialmente a trombose é bastante elevado. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de agentes fibrinolíticos que possam ser utilizados neste sentido, que sejam funcionais e possuam baixo custo de produção (LIN *et al.*, 2019; ANDRADE *et al.*, 2018).

Dentre os tratamentos recomendados para enfrentamento da trombose, os anticoagulantes são os mais conhecidos. No entanto, além do alto custo de produção, esses medicamentos têm efeitos colaterais perigosos, podendo causar sangramento adverso, desconforto gastrointestinal, lesão hepática, e outros. Uma segunda alternativa é o uso de agentes fibrinolíticos (ou trombolíticos), como é o caso da uroquinase, estreptoquinase e ativador tecidual do plasminogênio (t-PA). Entretanto, estes também apresentam problemas relativos a sangramentos adversos, além de possuírem uma meia vida curta e fontes restritas, dificultando sua obtenção e aplicação (ALI; BAVISETTY, 2020).

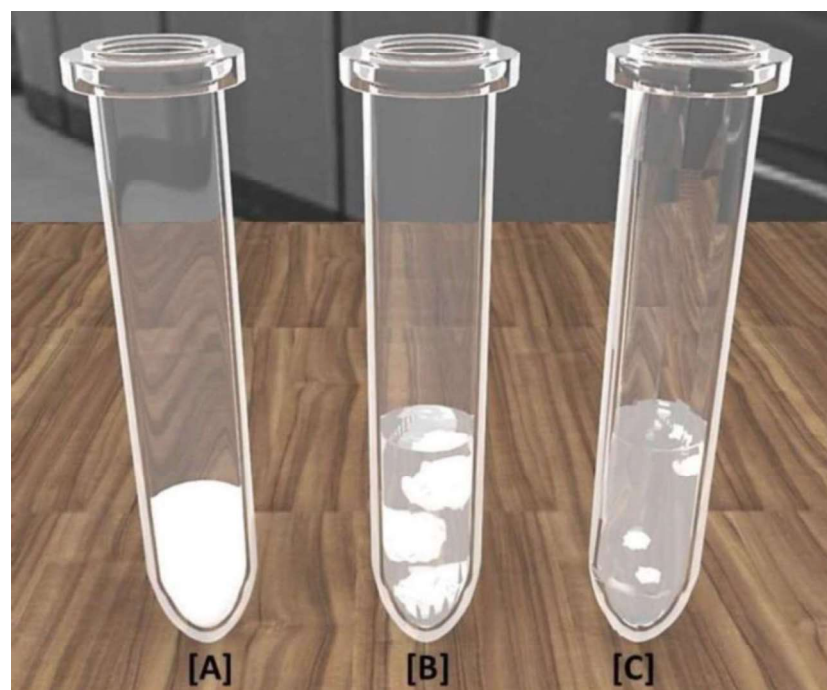
Proteases com ação fibrinolítica destacam-se por apresentarem dissolução bem-sucedida de coágulos e manutenção do fluxo sanguíneo. Estas podem ser obtidas de diferentes fontes, sendo amplamente produzidas por microrganismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos filamentosos e microalgas (RAJU; DIVAKAR, 2013). Além disso, quando obtidas a partir da fermentação de microrganismos, o custo de produção é relativamente mais baixo e beneficia-se de vantagens como sua distribuição cosmopolita e facilidade de produção em larga escala (CHEN *et al.*, 2016).

Enzimas fibrinolíticas podem ser classificadas em serino-protease, metaloprotease e serino metalo protease (ALI; BAVISETTY, 2020; BIN *et al.*, 2009). Sendo as pertencentes ao primeiro grupo capazes de atuar tanto direta, quanto indiretamente na degradação da fibrina, ou seja, por clivagem ou por ativação da plasmina. Já metaloproteases com ação fibrinolítica são raras, mas atuam na presença de íons metálicos bivalentes como Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} . As serino metalo proteases por sua vez combinam propriedades de ambas descritas anteriormente (ALI; BAVISETTY, 2020; BIN *et al.*, 2009).

A presença de proteases com ação fibrinolítica pode ser constatada em laboratório a partir de diferentes metodologias. O teste da Área de Lise em Placa de Fibrina (ALPF) é considerado uma medida direta da atividade fibrinolítica e está diretamente ligado à concentração do fibrinogênio utilizado

(FLUTE, 1964), esta metodologia permite a confirmação da presença de enzimas fibrinolíticas a partir da formação de um halo de degradação. Metodologias mais modernas utilizam espectrofotometria para quantificação das proteases fibrinolíticas. Neste caso a enzima é aplicada em tubo contendo coágulo produzido artificialmente, a reação ocorre por tempo pré determinado, e ao fim pode-se notar a dissolução do coágulo (WANG, 2011), esta reação está ilustrada na figura 1.

Figura 1. Representação de atividade fibrinolítica, [A] Coágulo de fibrina formado sem ação de enzima fibrinolítica, [B] Início da quebra do coágulo por enzima fibrinolítica, [C] Coágulo quase completamente desfeito por ação enzimática ao fim da reação.



Fonte: a autora (2020)

2.2. Fontes de Protease

Proteases são enzimas abundantes na natureza, sendo encontradas em diversos organismos, todavia, microrganismos são notórios quanto a produção para aplicação industrial, devido a facilidade para produção em larga escala, de manipulação genética, e a sua diversidade bioquímica, sendo capazes de produzir proteases com alto rendimento e características que facilitam seu emprego nas mais diversas áreas (RAO *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2016).

Entretanto, dentre os microrganismos produtores de proteases destacam-se os fungos filamentosos por serem capazes de crescer em substratos de baixo custo e de fácil remoção celular quando comparado com bactérias, por exemplo, o que torna o processo mais econômico (SOUZA *et al.*, 2015). Além disto, a produção de protease por fungos filamentosos beneficia-se de sua secreção extracelular, facilitando a extração e purificação uma vez que não há necessidade de lise celular, diminuindo as etapas no processo de obtenção destas biomoléculas (BATISTA *et al.*, 2020). O uso do rompimento celular, além de agregar mais etapas ao processo também o torna mais complexo, uma vez que os fragmentos da lise caracterizam um maior número e diversidade de moléculas contaminantes e aumento da viscosidade do meio. Além de fazer necessário maior número de operações durante a purificação, tornando, conseqüentemente, o custo final mais elevado do que os de produtos extracelulares (PESSOA-Jr *et al.*, 2020). Outras vantagens estão relacionadas ao seu potencial para crescer sob várias condições ambientais, como pH e temperatura e a variedade de substratos que podem ser utilizados como nutrientes (HAQ *et al.*, 2004).

Apesar das vantagens, levando em consideração a diversidade de fungos filamentosos encontrados na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente. Dentre os fungos filamentosos, os pertencentes ao gênero *Aspergillus* encontram-se em evidência, uma vez que apresentam distribuição cosmopolita e são capazes de secretar uma gama de enzimas de interesse biotecnológico (SANTOS *et al.*, 2020), fazendo deste um dos gêneros mais estudados (SANTOS *et al.*, 2018). Outros gêneros em destaque são *Penicillium sp.* e *Mucor sp.*, conhecidos por sua produção de proteases com atividade

colagenolítica e fibrinolítica, respectivamente (WANDERLEY *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

2.2.1. *Aspergillus spp.*

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem ao filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes e ordem Eurotiales. Foram descritos pela primeira vez em 1729, na Itália, pelo biólogo Pietro Micheli, e recebem esse nome por apresentar conidióforo que se assemelham a um aspersório (*aspergillum*), instrumento utilizado pela igreja católica para dispersar água benta (PIMENTA *et al.*, 2020). Entretanto uma descrição completa do gênero só foi realizada em 1965 (RARPER; FENNEL, 1965).

Estes microrganismos são caracterizados por apresentarem micélios aéreos com conidióforos que se estendem de forma vertical em relação a superfície (HUBKA *et al.*, 2013). A coloração das colônias é uma característica importante para distinção das espécies, neste gênero pode-se observar variações sob os tons de verde, amarelo, marrom, branco, preto e cinza (PIMENTA *et al.*, 2020). São fungos de distribuição cosmopolita, normalmente isolados de solo e plantas, fazendo deste um dos gêneros mais estudados e explorados comercialmente (MOJSOV, 2016).

As espécies deste gênero podem ser categorizadas em seções a partir de características morfológicas específicas, estas são: Flavi, Circundati, Nigri, Restricti, Fumigati, Cervini, Clavati, Cremei, Nidulantes, Flavipedes, Versicolores, Usti, Terrei, Candida, Sparsi e Wentii. Entretanto, são mais conhecidas e exploradas espécies pertencentes à Flavi, Circundati e Nigri (VARGA *et al.*, 2004; PIMENTA *et al.*, 2020). Estes microrganismos são frequentemente associados à processos industriais vinculados a produção de enzimas e outros metabólitos secundários biotecnologicamente importantes (MOJSOV, 2016), sobretudo, à produção de proteases. Segundo Santos *et al.* (2020), dentre as espécies de *Aspergillus* utilizadas para produção de proteases nos últimos dez anos, utilizando fermentação em estado sólido como método de cultivo, destacam-se *A. oryzae* e *A. niger* (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de *Aspergillus* utilizadas para produção de protease nos últimos 10 anos.

Espécie de <i>Aspergillus</i>	Referência
<i>Aspergillus oryzae</i>	Vishwanatha <i>et al.</i> (2010); Marui <i>et al.</i> (2012); Murthy <i>et al.</i> (2019) Mamo <i>et al.</i> (2020)
<i>Aspergillus niger</i>	Esparza <i>et al.</i> (2011); Changyou-Shi <i>et al.</i> (2016); Purushothaman <i>et al.</i> (2019)
<i>Aspergillus flavus</i>	Yadav <i>et al.</i> (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	El-Ghonemy & Fadel (2015)
<i>Aspergillus sclerotiorum</i>	Souza <i>et al.</i> (2015)
<i>Aspergillus terreus</i>	Sethi <i>et al.</i> (2016); Abu- Tahon <i>et al.</i> (2020)
<i>Aspergillus tamarii</i>	Silva <i>et al.</i> (2018a); Silva <i>et al.</i> (2018b)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Chimbekujwo <i>et al.</i> (2020)
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Osmolovskiy <i>et al.</i> (2020)

Fonte: Santos et al (2020), modificada.

Levando em consideração a diversidade de espécies de *Aspergillus spp.* e sua natureza multifária em relação à produção de proteases, considera-se que poucos microrganismos são explorados atualmente, abrindo espaço para produções na área. O microrganismo *A. sclerotiorum* já foi relatado como produtor de protease em condições de fermentação em estado sólido com substrato de soja (Silva *et al.*, 2014) e protease com atividade queratinolítica produzida a partir da fermentação submersa em meio contendo pena de aves (Souza *et al.* 2015), entretanto *A. sclerotiorum* ainda não é devidamente explorado nesta perspectiva. O fungo *A. ochraceus*, também aparenta ser promissor para aplicações biotecnológicas estando descrito na literatura como

produtor de hidrolases a partir de fermentação submersa (BISWAS et al., 1987; OSMOLOVSKIY et al., 2016). Osmolovskiy et al. (2020) faz menção a possibilidade de produzir proteases com ação fibrinolítica pela fermentação de *A. ochraceus*, sendo considerado bastante promissor neste sentido.

2.3. Produção de enzimas por Fermentação em Estado Sólido

Um dos principais fatores que devem ser levados em consideração na produção de proteases por microrganismos é o tipo de fermentação adotada. Ao avaliar qual a melhor abordagem deve-se levar em consideração o microrganismo a ser utilizado e a molécula de interesse. Posto isto, a Fermentação em Estado Sólido (FES), tem enorme potencial do ponto de vista ecológico e econômico. Sendo a principal característica desta técnica o crescimento do microrganismo em substratos sólidos com ausência total ou parcial de água livre (SOCCOL et al., 2017; SILVA et al., 2016; SANTOS et al., 2018) fator que facilita o uso de fungos filamentosos.

A FES vem se mostrando uma técnica interessante porque apresenta a produção de diferentes enzimas de interesse biotecnológico de forma mais concentrada, tem uma menor demanda energética para esterilização visto que é necessário menos energia para alcance de 121°C (temperatura geralmente utilizada na esterilização), reduz a possibilidade de contaminação bacteriana por conter baixa ou nenhuma concentração de água livre e simula o ambiente natural de fungos filamentosos, favorecendo o seu crescimento (SOCCOL et al., 2017).

Além disso, a FES apresenta benefícios ambientais, uma vez que pode ser aplicada no aproveitamento de resíduos sólidos agroindustriais e assim reduzir os impactos negativos deste último ao meio ambiente enquanto produz enzimas de alto valor biotecnológico e industrial (SANTOS et al., 2018; SILVA et al., 2016). Recentes avanços a respeito desta metodologia mostram a possibilidade do uso de reatores, ampliando o uso da FES para escalas industriais. Soccol et al. (2017) destaca que biorreatores formulados para FES devem levar em consideração a característica dos materiais usados como substrato, como: composição, tamanho, resistência, porosidade e capacidade de armazenamento de água. Outros fatores a serem preestabelecidos dizem

respeito a morfologia do fungo, que influencia diretamente na aplicação ou não de agitação (ZANPHORLIN *et al.*, 2010; NOVELLI *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2019).

Para que a produção de proteases sob FES seja eficiente, é essencial determinar as condições ótimas de fermentação por meio de variáveis, que podem ser qualitativas ou quantitativas. Dentre as variáveis qualitativas, estão, tipo de substrato, espécie utilizada e presença ou ausência de luz (CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2016; SOCCOL *et al.*, 2017). Já em relação às variáveis quantitativas, estão, a quantidade de substrato, grau de umidade, temperatura, concentração de microrganismos, entre outras (MAMO *et al.*, 2020; ESPARZA *et al.*, 2011; SETHI *et al.*, 2016). Nascimento *et al.* (2015), por exemplo, realizaram um planejamento fatorial 2³ para avaliar as melhores condições de fermentação de *Mucor subtilissimus*, tendo investigado o tipo e quantidade de substrato, umidade e temperatura. Todas essas variações devem ser analisadas uma vez que estabelecidos os parâmetros iniciais de seleção da matéria prima adequada, tratamento da mesma e seleção do microrganismo (PANDEY *et al.*, 2003).

2.3.1. Substratos Utilizados em Fermentação em Estado Sólido

Uma das principais vantagens do uso da Fermentação em Estado Sólido para produção enzimática é a possibilidade de uso de resíduos sólidos agroindustriais, reduzindo custos na produção e o impacto ecológico destes resíduos no meio ambiente. De acordo com relatório realizado pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2019), aproximadamente 14% dos alimentos são perdidos ou desperdiçados somente no processo de produção e distribuição, especialmente cereais e leguminosas. Os resíduos gerados pela fabricação e consumo de produtos agrícolas têm se tornado um problema para a sociedade, causando grande impacto ambiental, social e econômico, caso seja descartado sem um tratamento adequado ou inapropriadamente (SANTOS *et al.*, 2018). Dentre os problemas ambientais resultantes estão a poluição de águas subterrâneas e superficiais, além das prováveis alterações da qualidade do solo e odor (NAYAK; BHUSHAN, 2019).

Em contrapartida, boa parte dos resíduos descartados, tanto pela indústria quanto pelo consumidor, ainda conservam boa parte dos nutrientes de origem, o que tem contribuído para incentivar investigações constantes que reutilizem esses sólidos orgânicos para geração de novos produtos biotecnológicos (SADAH *et al.*, 2018). A produção de biomoléculas ativas é um exemplo, tendo em vista que os resíduos agroindustriais apresentam uma composição rica em macro e micronutrientes, eles podem ser utilizados por microrganismos para obtenção de energia, facilitando seu crescimento (NAYAK; BHUSHAN, 2019; FABISAK *et al.*, 2017), e, subsequentemente, convertendo-os em produtos de grande valor biotecnológico de interesse do mercado comercial de enzimas.

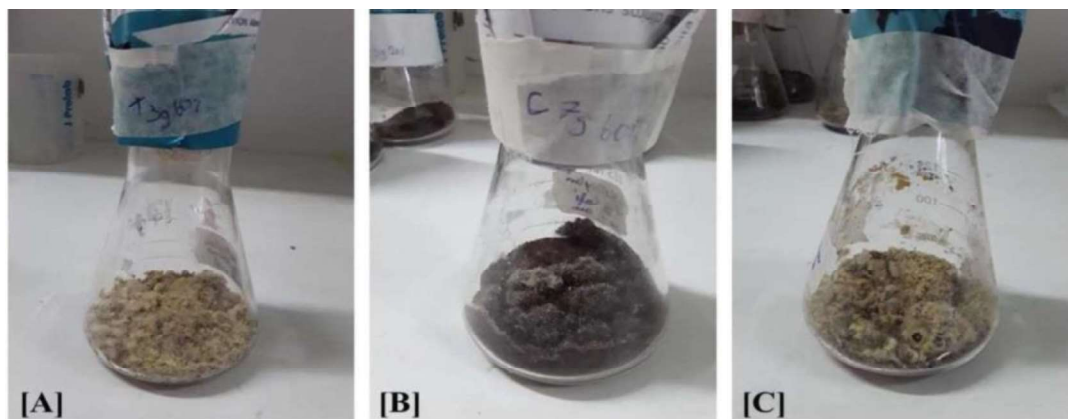
Encontra-se na literatura diversas aplicações para resíduos agroindustriais, como produção de biocombustíveis, recuperação de compostos ativos, enzimas, antioxidantes, produção de biofertilizantes, produção de antibióticos, produção de cogumelos, produção de xantana, produção de portadores de imobilização, entre outros (SANTOS-FILHO *et al.*, 2017; NAYAK; BHUSHAN, 2019; SADAH *et al.*, 2018) corroborando com a idealização de seu valor biotecnológico como produtos-base para a produção de enzimas industrialmente importantes (RAVINDRAN *et al.*, 2018).

Nesta perspectiva, uma alternativa promissora é o uso resíduos da indústria do café. Somente em 2019, o Brasil produziu cerca de 3,0 milhões de toneladas de café, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2019), entretanto ainda são escassas pesquisas na área biotecnológica sobre o aproveitamento destes resíduos para fins de fermentação, apesar de apresentar grande potencial (PANDEY *et al.*, 2000). O café é um dos itens mais comercializados no mundo, e proporcionalmente, há o descarte de seu processamento. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC, 2020) foram produzidas mais de 49 milhões de sacas de café em 2019, de novembro de 2017 a outubro de 2018 foram contabilizadas 21 milhões de sacas destinadas ao consumo interno, representando um aumento de 4,8% em relação aos anos anteriores. O maior problema ocasionado pelos resíduos do café é sua capacidade mutagênica devido seus componentes, um agravo que pode ser repassado ao meio ambiente (FERNANDES *et al.*, 2017).

Tendo em vista a problemática dos resíduos agroindustriais, especialmente do café é urgente que novas investigações que possam utilizá-los de modo consciente e sustentável, tornando-os matéria-prima biotecnológica para processos fermentativos, como a fermentação em estado sólido (FES) (PANDEY *et al.*, 2000). Sobretudo, este substrato é particularmente interessante devido a suas características físico-químicas. De acordo com Zainol *et al.* (2020), o resíduo agroindustrial de café contém quantidades consideráveis de compostos bioativos, sendo possível encontrar 6.22% de carboidratos, 5.15% de proteínas e 1.38% de lipídeos em grãos usados de *Coffea arabica*, e 6.76% de carboidratos, 6.55% de proteínas e 1.67% de lipídeos em *Coffea robusta*, as variações mais consumidas de café. Apesar de promissor, o uso de resíduos agroindustriais, especialmente de café, ainda é limitado quanto a FES de fungos filamentosos, desta forma, este seguimento deve ser estudado.

Levando em consideração a fermentação em estado sólido, o farelo de trigo é um dos substratos mais utilizados. O trigo é um dos alimentos mais cultivados no mundo, sendo considerado componente essencial tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Em contrapartida, este material não chega à mesa do consumidor na forma de semente inteira, sendo necessário passar por diversos processos com geração de coprodutos (SOZER *et al.*, 2017). Contudo, o farelo não é considerado um resíduo agroindustrial pois pode ser utilizado para aumentar a qualidade nutricional de alimentos (SPAGGIARI *et al.*, 2019). Devido a suas características nutricionais também é considerado excelente meio de cultivo para fungos filamentosos, visto que a maioria dos nutrientes e compostos bioativos do trigo estão presentes nas áreas mais externas da semente (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2020; CHIMBEKUJWO *et al.*, 2020), apresentando alta concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas (40%, 15,2% e 5,5%, respectivamente) (BABU, 2018). Desta forma, observa-se que a Fermentação em Estado Sólido pode beneficiar-se de subprodutos agroindustriais, sendo estes rejeitos ou não, a depender de seu valor nutricional. Um exemplo de fermentação em estado sólido utilizando fungo filamentoso pode ser observado na Figura 2, onde foi realizada fermentação do fungo *Aspergillus ochraceus* em diferentes substratos.

Figura 2. Fermentação em Estado sólido (FES) do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 em diferentes substratos. [A] FES com Farelo de trigo; [B] FES com borra de café; [C] FES 1:1 com borra de café e de farelo de trigo.



Fonte: a autora (2020)

2.4. Purificação de produtos biotecnológicos

As aplicações de biomoléculas de interesse industrial, a depender do setor onde será utilizada, depende em grande parte de seu fator de purificação. A técnica de purificação de biomoléculas deve estar fundamentada, principalmente, nas características físico-químicas da mesma, como massa molar, solubilidade, atividade biológica, mobilidade eletroforética, entre outros (NELSON; COX, 2014). Desta forma, destaca-se também a importância da caracterização. Além das características preestabelecidas, outro fator definitivo em relação ao processo de purificação é estabelecer onde a biomolécula será utilizada, ou seja, sua aplicação (GURUMALLESH, 2019).

Em geral, o processo de purificação compreende as etapas de clarificação, concentração (ou purificação de baixa resolução), purificação e tratamentos para aplicação, transporte e armazenamento. Como posto anteriormente, estas técnicas devem ser selecionadas e combinadas de acordo com a biomolécula de interesse (ALI; BAVISETTY, 2020). Um apanhado de técnicas que podem ser utilizadas objetivando a pureza pode ser observado no Quadro 1.

A etapa de clarificação caracteriza-se pelo isolamento da molécula de interesse do material de origem e preparação para os processos de purificação

propriamente ditos, como exemplo, a centrifugação que realiza o particionamento de moléculas por tamanho e densidade. Já a etapa de rompimento celular, indicada para obtenção de biomoléculas presentes no interior de células, pode ser realizada a partir de processos mecânicos, químicos ou enzimáticos, também são utilizados como preparação para os processos de purificação (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A etapa de concentração atua principalmente no isolamento das moléculas a partir de solubilidade e massa molecular, por isso, pode ser considerado uma etapa de purificação de baixa resolução, enzimas utilizadas na indústria do couro, por exemplo, não necessitam de maiores graus de purificação para serem comercializadas (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A purificação em alta resolução ocorre principalmente com o uso de colunas cromatográficas, estas podem particionar as moléculas a partir de diversas características como massa molecular, densidade, carga elétrica, entre outros, conferindo alto grau de pureza a estas moléculas. Enzimas que podem ser aplicadas na indústria farmacêutica, por exemplo, precisam atingir alto grau de pureza para serem comercializadas. Por fim, os tratamentos finais permitem o acondicionamento da biomolécula purificada (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

Quadro 1. Operações unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos

Etapas do Processo	Operações Unitárias	Princípio
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Filtração tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização	Cisalhamento
	Ultrassom	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico
	Extração em sistemas de suas fases líquidas	Solubilidade

Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade (biológica ou química)	Sítios específicos da superfície de uma proteína (Adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos da superfície de uma proteína (Adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
	Membranas adsortivas	Massa molar ou sítios específicos da superfície de uma proteína
Tratamentos finais	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Liofilização	Características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

Fonte: KILIKIAN; PESSOA JR. (2020) p. 25-26.

2.4.1. Purificação de proteases

Uma vez definida a molécula de interesse, o método de purificação pode ser aplicado. Enzimas proteolíticas, especialmente aquelas obtidas a partir de fermentação em estado sólido de fungos filamentosos, necessitam passar por processos de purificação em ordem de que sejam devidamente aplicadas. Ward (2019) destaca a importância de certificar-se da purificação das proteases produzidas por fungos filamentosos para aplicação no setor alimentício e farmacêutico.

Enzimas proteolíticas devem ser purificadas por técnicas determinadas a partir de suas características físico-químicas como carga elétrica, massa molar, solubilidade e hidrofobicidade. De acordo com a literatura vigente, normalmente são empregadas as seguintes técnicas como principal forma de purificação de proteases, ou uma combinação das mesmas: Precipitação (salina ou por solvente orgânico); técnicas cromatográficas baseadas no tamanho, massa molar ou carga elétrica da protease e sistema de duas fases aquosas (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A fim de reduzir a quantidade de processos, e consequentemente os custos de produção, algumas técnicas vêm sendo integradas para aplicação simultânea, como por exemplo, a junção da etapa de clarificação com a extração líquido-líquido em processo de extração contínua realizado em biorreator (STREDANSK *et al.*, 1993).

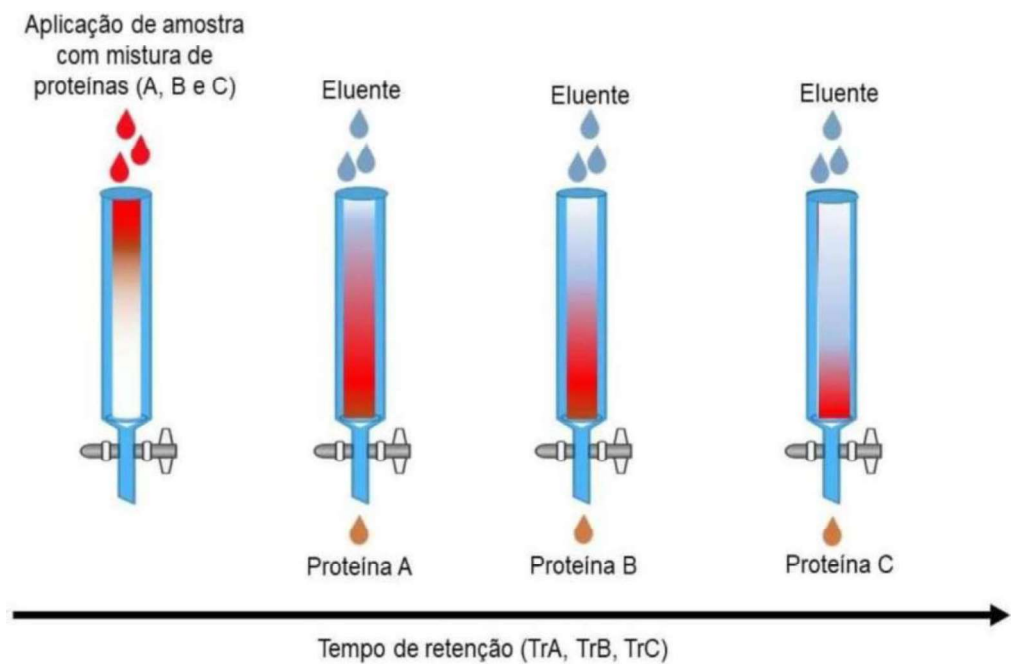
A precipitação de proteínas em geral é um dos métodos mais tradicionais no processo de concentração e purificação, no entanto não é dos mais eficientes, sendo assim, aplicada no início do processo como forma de preparação para as etapas seguintes (ZUÑIGA, 2003). Esta técnica vale-se do aumento ou diminuição da força iônica a partir da variação na concentração de sais ou solventes orgânicos. A utilização de sais promove um efeito conhecido como salting-out, caracterizado pela neutralização das cargas elétricas superficiais pela adição de sais, reduzindo a solubilidade da proteína e realizando a precipitação. A precipitação destas biomoléculas também pode ocorrer pela adição de solventes orgânicos, estes, por sua vez, atuam diminuindo a constante

dielétrica do meio, que resulta na agregação das moléculas proteicas por interação eletrostática de superfícies carregadas com sinal oposto (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

Entre os métodos de purificação propriamente ditos, a cromatografia aparece em destaque, esta, tem a capacidade de isolar a molécula de interesse, sendo estes sais até moléculas mais complexas, sendo amplamente utilizado para purificação de proteínas (GUGGISBERG *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2012). O processo cromatográfico pode ocorrer levando em consideração várias características da proteína em questão, um resumo de como funciona o processo cromatográfico pode ser observado na figura 3, em geral é realizada a aplicação da amostra com a molécula de interesse e contaminantes, ou diferentes moléculas de interesse. Estas moléculas são eluídas em diferentes momentos a depender de sua adsorção na matriz.

A cromatografia de exclusão molecular, por exemplo, também conhecida como gel-filtração, como sugere o nome, baseia-se na massa molecular das proteínas, onde as moléculas menores que os poros da matriz (resina) cromatográfica são eluídas mais lentamente em relação as maiores, resultando assim na fragmentação da amostra em eluições com moléculas de diferentes tamanhos (DUONG-LY GABELLI, 2014). Já a cromatografia de troca iônica baseia-se na carga elétrica na superfície da molécula e sua interação com a matriz, destaca-se em relação à outras devido a sua facilidade de aplicação em larga escala, elevada resolução e capacidade de adsorção (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020) As resinas utilizadas neste modelo cromatográfico podem ser trocadoras de ânions (possuem carga positiva), como o dietilaminoetil (DEAE)-celulose e resinas trocadoras de cátions (possuem carga negativa), como o carboxi-metil (CM)-celulose. No geral, para escolha da matriz que vai compor a coluna, devem ser considerados os seguintes critérios: estabilidade mecânica e química, capacidade de adsorção, tamanho e forma do poro, superfície e densidade da matriz e tamanho da partícula de interesse (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020). A cromatografia de interação hidrofóbica por sua vez, é normalmente utilizada como complementar por ser menos seletiva e funciona levando em consideração a adsorção por hidrofobicidade (MUCA *et al.*, 2020). Pode-se observar, de forma generalizada, um processo cromatográfico na figura 3.

Figura 3. Esquema simplificado de processo cromatográfico em seus vários estágios, a aplicação de solução contendo diferentes proteínas, a aplicação do eluente como fase móvel e coleta do eluido contendo as frações da amostra segmentadas (proteína A, B e C, respectivamente) em função do tempo de retenção destas moléculas (Tr_A , Tr_B e Tr_C).



Fonte: KILIKIAN; PESSOA JR. (2020), adaptado.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIO, J. L. DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes Biomolecules. V.4, nº 1, p. 117-139. 2014.
- AGUIAR, W. J.; EL-DEIR, S. G. (Orgs.). Resíduos Sólidos: Gestão em Indústrias e Novas Tecnologias. 2ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 300-308. 2017.
- ALI, A. M. M.; BAVISETTY, S. C. B. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review. International Journal of Biological Macromolecules. 2020.
- ANDRADE, M. V. S. Evaluation of the bleeding intensity of patients anticoagulated with warfarin or dabigatran undergoing dental procedures, Arq. Bras. Cardiol. v. 111, n.3, p.394-399. 2018.
- BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 2, n. 3, p. 204 209, 2013.
- BATISTA, J. M. S. et al. Purification and biochemical characterization of an extracellular fructosyltransferase - rich extract produced by *Aspergillus tamarii* Kita UCP1279. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 26, 2020.
- BHAGWAT, P. K. et al. Collagen and collagenolytic proteases: A review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, V. 15. p. 43 55. 2018.
- BHAGWAT, P. K. et al. Purification, properties and application of a collagenolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. SUK. RSC. 2016.
- BIN, W. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097. Of Indust. Microbiology & Biotechnology, v. 36, p. 451-459, 2009.
- CHEN, Y et al. Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. Journal of Functional Foods, v. 25, p.149-159. 2016.

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

ESPARZA, A. H. Y. et al. Optimization of process conditions for the production of a prolylendopeptidase by *Aspergillus niger* ATCC 11414 in solid state fermentation. Food Sci. Biotechnol. v. 20, n.5, p. 1323-1330. 2011.

FABISAK, M. M.; LUCENA, T. V.; BRITO, E. P. L.; FIRMO, A. L. B. Influência do pH na Geração de Biogás e Metano Proveniente da Biodigestão Anaeróbia de Resíduos Alimentares. 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. State of Food Agriculture. Disponível em: <<http://www.fao.org/state-of-food-agriculture/en/>>. Acesso em 11 set. 2020.

FERNANDES, A. S. et al. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 141, p. 30-36. 2017.

FERREIRA, C. M. O. et al. Collagenase produced from *Aspergillus sp.* (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. Biomedical Chromatography. 2016.

DUONG-LY, K. C., & GABELLI, S. B. Gel Filtration Chromatography (Size Exclusion Chromatography) of Proteins. Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C, 105-114. 2014.

Flute P T. Haemorrhage and Fibrinolysis. Proc R Soc Med. V.57, p.603-6. 1964.

GAO, S. et al. Immunomodulatory effects of collagen hydrolysates from yak (*Bos grunniens*) bone on cyclophosphamide -induced immunosuppression in BALB/c mice. Journal of Functional Foods. V. 60. 2019.

GERMANO, S. et al. Characterization and Stability of Proteases from *Penicillium sp.* Produced by Solid-State Fermentation. Enzyme and Microbial Technology, v.32, p.246-251. 2003.

GONÇALVES, H. B. et al. Characterization of a thermostable extracellular tannase produced under submerged fermentation by *Aspergillus ochraceus*.

Electronic Journal of Biotechnology, v. 15, p. 1-12, 2012.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. International Journal of Biological Macromolecules. V.128. p. 254-257. 2019.

HAQ, I. *et al.* Protease biosynthesis by mutant strain of *Penicillium griseoroseum* and cheese formation. Pakistan J. Biol. Sci. V.7, p.1473-1476. 2004.

HUBKA, V. *et al.* Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to Aspergillus. Mycologia, v. 105, n. 4, p. 912-937. 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola. Disponível em

<<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72415>>. Acesso em 09 de set. 2020.

JHAMPLE, S. B. *et al.* Statistical media optimization for enhanced production of fibrinolytic enzyme from newly isolated *Proteus penneri* SP-20. Biocat Agri Biotechnol v. 4, p. 370-379. 2015.

JORDAN, G. H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: a perspective, single-center, non-placebo-controlled study. J Sex Med. V. 5. p. 180-187.

LI, Y. *et al.* The Threonine Protease Activity of Testes-Specific Protease 50 (TSP50) Is Essential for Its Function in Cell Proliferation. PLOS ONE, v. 7, n. 5, p. 1-14, 2012.

LIMA, L. A. *et al.* Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stophillus* de solo amazônico. Acta Amazonica. v. 44, n. 4. 2014.

LINS, S. *et al.* Dabigatran must be used carefully: literature review and recommendations for management of adverse events, Drug design, development and therapy v.13. 1527. 2019.

LÓPEZ-GÓMEZ, J. P. *et al.* Solid-state fermentation of food industry wastes. Food Industry Wastes, p. 135-161. 2020.

MAMO, J. et al. Optimization of media composition and growth conditions for production of milk-clotting protease (MCP) from *Aspergillus oryzae* DRDFS13 under solid-state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology, 2020.

MARKARYAN, A. et al. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. Infect. Immun., v. 62, n. 6, p. 2149-2157, 1994.

MARTÍNEZ-MEDINA, G. A. et al. Fungal Proteases and Production of Bioactive Peptides for the Food Industry. Enzymes in Food Biotechnology. Elsevier, p. 221-246. 2019.

MUCA, R. et al. Effects of negative and positive cooperative adsorption of proteins on hydrophobic interaction chromatography media. Journal of Chromatography A, v.1625. 2020.

NASCIMENTO, T. P. et al. Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. Advances in Enzyme Research, vol. 03, no. 03, p. 81-91, 2015.

NASRI, M. Bioactive Peptides from Fish Collagen Byproducts. Byproducts from Agriculture and Fisheries, p. 309-333. 2019.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. p. 89-95. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NOVELLI, P. K. et al. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. Food Chemistry v. 198, p. 119-124. 2016.

NOVOZYMES. Sales by industry. The novozymes report 2019. P. 7. 2019.

OLIVEIRA, V. M. et al. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. Pubvet. V. 11, Nº 3. p. 243-255, 2017.

ORLANDELLI, R. C. et al., Produção da Enzima Protease por Fungos Endofíticos Isolados da Planta Medicinal *Piper hispidum* Sw. I EPCC Encontro Internacional de Produção Científica CESUMAR. Maringá -Brasil, 2011.

OSMOLOVSKIY, A. A. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. Moscow University Biological Sciences Bulletin v. 71, p. 62-66. 2016.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, v.6, p.153-162. 2000.

PANDEY, A., Solid-state fermentation, Biochem. Eng. J. v. 13, p.81-84. 2003.

PESSOA-JR, A. et al. Rompimento celular. In. KILIKIAN, B. V.; PESSOA-JR, A. (Coord.). Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial. 2ª ed. São Paulo: BLUCHER, p.67-103, 2020.

PHILIPPS-WIEMANN, P. et al. Proteases — general aspects. Enzymes in Human and Animal Nutrition. Elsevier- Academic Press. p. 257-266. 2018.

PIMENTA, R. S. et al. *Aspergillus*. Beneficial Microbes in Agro-Ecology, 611 – 624. 2020.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol Mol Biol Rev. V. 62, nº3, p. 599-635. 1998.

RAPER, K.B., FENNELL, D.I., The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore. 1965.

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S.S.; WILLIAMS, G.A.; JAISWAL, A.K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. Bioengineering, v. 93, p. 1-20. 2018.

RODARTE, M.P. et al. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*, v. 33, n. 3, 457-464, 2011.

SADAH, P.K. et al. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, p. 1-15. 2018.

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

SANTOS, P. S. et al. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.

SANTOS-FILHO, D. A. et al. Utilização de Resíduos Sólidos Orgânicos (RSO) e Rúmen Bovino Para Produção de Metano. In: BEZERRA, R. P. L.; AGUIAR, W. J.; EL-DEIR, S. G. (Orgs.). *Resíduos Sólidos: Gestão em Indústrias e Novas Tecnologias*. 2ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 283-290. 2017.

SETHI B.K. et al. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, v.10, n. 4. 2016.

SHARMA, K. M. et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. v.15, p. 115-126. 2017.

SILVA, O. S. et al. Novel Protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: Production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. *Advances in Enzyme Research*, v. 4, n. 4, p. 125-143. 2016.

SOCCOL, C. R. et al. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 1, p. 52-71, 2017.

SOUZA, P. M. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Braz. J. Microbiol.* vol.46 no.2 São Paulo Apr./June, 2015.

SOZER, N. et al. Cereal side-streams as alternative protein sources. *Cereal Foods World*. 2017.

SPAGGIARI, M. et al. Solid state lactic acid fermentation: A strategy to improve wheat bran functionality. *LWT*, 108668. 2019.

TAKAHASHI K Structure and function studies on enzymes with a catalytic carboxyl group(s): from ribonuclease T1 to carboxyl peptidases. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. v. 89, n.6, p.201-25. 2013.

USAMAH, A. et al. Sun-082 effects of oral collagen peptides on nutritional status of peritoneal dialysis patients. *Kidney International Reports*. v. 4, n. 7. S188-S189. 2019.

VARGA, J. et al. Molecular Diversity of Agriculturally Important *Aspergillus* Species. *European Journal of Plant Pathology*, v. 110,5/6, p. 627-640, 2004.

WANDERLEY, M. C. A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 48, n.1. 2017.

WANG, S., WU, Y., LIANG, T. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, v. 28, p.2, 2011.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 63, n. 5. p. 520-526.

YAGODA, M. R. et al. A Nutritional Supplement Formulated with Peptides, Lipids, Collagen and Hyaluronic Acid Optimizes Key Aspects of Physical Appearance in Nails, Hair and Skin. *Nutrition & Food Sciences*. v.5. 2014.

YAMANAKA, H. et al. A multicenter, randomized, controlled study of the use of nutritional supplements containing collagen peptides to facilitate the healing of pressure ulcers. *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism*. v. 8. p. 51-59. 2017.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. *Mycopathologia*. v. 171, n. 5. p. 299-323. 2011.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial biotecnológico dos fungos *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 e *Aspergillus ochraceus* URM604 a partir da análise da produção de proteases colagenolítica e fibrinolítica por Fermentação em Estado Sólido em resíduos agroindustriais e coprodutos agrícolas como substrato.

4.2. Objetivos específicos

- Produzir proteases por fermentação em estado sólido a partir do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 utilizando resíduo de café e farelo de trigo como substratos;
- Analisar a produção de proteases através da FES utilizando um planejamento fatorial 2^3 utilizando as variáveis (umidade, quantidade de substrato e tipo de substrato) do fungo *A. ochraceus* URM604;
- Avaliar as atividades proteásica, fibrinolítica e colagenolítica oriundas do planejamento fatorial referente a fermentação do fungo *A. ochraceus*;
- Produzir proteases por fermentação em estado sólido do fungo *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 utilizando resíduo de café como substrato e avaliar as atividades proteásica e colagenolítica
- Realizar purificação parcial das proteases produzidas por *A. sclerotiorum* URM5792 e *A. ochraceus* URM604 por meio de técnicas cromatográficas.

CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO DE COLAGENASE POR *Aspergillus sclerotiorum* URM-5792 USANDO RESÍDUOS DE CAFÉ COMO MEIO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Anna Gabrielly Duarte Neves, Juanize
Matias da Silva Batista, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e Ana Lúcia
Figueiredo Porto

**Publicado em Current Topics in Biotechnology
0972-821X**

PRODUÇÃO DE COLAGENASE POR *Aspergillus sclerotiorum* URM-5792 USANDO RESÍDUOS DE CAFÉ COMO MEIO PARA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Anna Gabrielly Duarte Neves,
Juanize Matias da Silva Batista, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e
Ana Lúcia Figueiredo Porto

RESUMO

As collagenases são extremamente importantes na indústria biotecnológica, uma vez que possuem um amplo espectro de aplicações, e embora várias enzimas purificadas de fontes animais e vegetais têm sido estudadas, os microrganismos têm tornado-se uma de suas principais fontes, particularmente fungos filamentosos. Este estudo visa a produção de collagenase por *Aspergillus sclerotiorum* URM5792, utilizando a técnica de fermentação em estado sólido com resíduos de café como substrato. Os resultados obtidos demonstram produção de protease (602.38 U/mL) e collagenase (679,44 U/mL), com pH ótimo alcalino (8) e uma temperatura ótima de 45°C. Portanto, conclui-se que este microrganismo tem valor biotecnológico considerável quando se trata da produção de proteases com atividade collagenolítica. Estes preliminares os resultados são de grande valia, visando a sua aplicação.

PALAVRAS-CHAVE: Produção de enzimas, FES, utilização de resíduo, fungos filamentosos, collagenase, protease.

INTRODUÇÃO

As collagenases são enzimas capazes de clivar a tripla hélice das moléculas de colágeno, tendo assim uma grande variedade de aplicações, como em os alimentos, farmacêuticos, cosméticos e têxteis indústria. Portanto, a busca por novas fontes de collagenase aumentou nos últimos anos. Estudos mostram a necessidade de intensificar as pesquisas sobre produção de collagenase [1, 2].

Proteases collagenolíticas obtidas de fontes microbianas, especialmente fungos filamentosos, ganharam atenção na área de biotecnologia dada a diversidade bioquímica de microorganismos e fácil manipulação e purificação do bioproduto [3]. O gênero *Aspergillus* apresenta uma variedade de espécies em seu grupo taxonômico e apresenta alto impacto econômico e social, uma vez possuem distribuição cosmopolita [4]. É também um dos mais amplamente utilizados gêneros biotecnológicos [5] conhecidos por secretar uma gama de enzimas e proteínas extracelulares que podem ser usadas em muitos processos industriais [6]. Além disso, fungos filamentosos podem ser cultivados em uma grande variedade de meios, uma vez que são capazes de crescer em condições severas, permitindo sua facilidade de uso em fermentação em estado sólido (FES).

A fermentação em estado sólido é baseada na ausência ou quase ausência de água livre, permitindo o uso de resíduos agroindustriais sólidos. A fermentação em estado sólido é um método vantajoso em relação à fermentação submersa por possuir alta produtividade e reprodutibilidade e utilizar menores quantidades de água, o que promove uma maior concentração do extrato e diminuir a probabilidade de contaminação bacteriana. Além de ser um processo estacionário, não acarretando custos adicionais de energia [7, 8].

Uma variedade de substratos pode ser usada na FES; estudos mostram o uso de farelo de trigo [9], mandioca [10], soja [8], entre outros. O café é um dos produtos agrícolas mais comercializados no mundo. Conhecido por ser rico em proteínas, carboidratos e lipídios, pode ser usado como fonte de energia para microorganismos [11]. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar a produção de collagenase por *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 usando resíduo de café como meio de fermentação em estado sólido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A cepa do fungo filamentoso *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 usado neste estudo foi isolado do solo Caatinga, PE-Brasil e foi fornecido pelo Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil.

Manutenção dos microrganismos e esporulação.

O microrganismo foi reativado em caldo glicosado (1% de extrato de carne, 0,3% de peptona, 2% glicose) e mantido em incubadora BOD (demanda bioquímica de oxigênio) a 30 °C por 7 dias até esporulação. O meio utilizado para a manutenção do microrganismo foi agar batata dextrose previamente autoclavado em 121°C por 20 minutos.

Fermentação em estado sólido

Resíduos de café (fornecidos pela Delta Expresso Cafeteria contendo resíduos de *Coffea arabica* e grãos de *Coffea robusta*) foi o substrato utilizado para testar a produção de colagenase por meio de fermentação em estado sólido (FES). A solução de esporos de *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 (10^7) foi inoculado em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo 5g de resíduo de café como substrato (previamente seco a 100 °C até a desidratação completa e autoclavado, a 121°C por 20min), com umidade 40% e incubado em BOD a 30°C durante 7 dias.

Extração de enzima

A extração da enzima foi realizada após 7 dias de fermentação, usando 7 mL/g de tampão Tris-HCL pH 8 (0,1M), posteriormente o conteúdo foi filtrado em uma bomba a vácuo para obtenção do líquido metabólico.

Determinação de proteínas e atividade colagenolítica

A concentração de proteína foi determinada de acordo com ao método de Smith *et al.* [12]. Albumina de soro bovino foi usada como proteína padrão. A atividade colagenolítica foi determinada de acordo com ao método descrito por Chavira *et al.* [13]. Resumidamente, uma alíquota (50 µL) da amostra foi adicionado a 5,0 mg de Azocoll solubilizado em 950 µL de tampão Tris-HCl pH 8,0 (0,1 M). A reação ocorreu a 35°C durante 1 h sob agitação. A absorbância do sobrenadante foi medida em 520nm usando um espectrofotômetro Ultrospec 7000 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A atividade específica foi determinada por meio de atividade/proporção de proteína e expressa em U/mg.

Purificação de proteases

O líquido metabólico foi aplicado em uma Coluna de troca iônica DEAE-Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl, pH 8,0 (0,1 M). As amostras foram eluídas usando NaCl 0,3 M diluído no mesmo tampão. Frações contendo proteínas foram agrupadas após a análise, e todo o processo foi monitorado a 280 nm usando um espectrofotômetro.

A amostra com o maior atividade enzimática foi purificada através de sistema FPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) usando resina SuperdexG75, obtendo um pico com atividade colagenolítica. As amostras obtidas foram posteriormente submetidas a testes de atividade enzimática.

Efeito da temperatura e pH na colagenase atividade

O efeito da temperatura e do pH foi investigado usando o método de avaliação da atividade colagenolítica proposto por Chavira *et al.* [13] variando a temperatura e pH. A faixa de temperatura usada para incubar a enzima purificada e o substrato foi de 35°C a 65°C. A faixa de pH usada para solubilizar a mistura de Azocoll e o purificado a enzima foi de 4,0 a 9,0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As culturas de *Aspergillus sclerotiorum* foram capazes de ocupar completamente o substrato em 7 dias, nas seguintes condições: 5 g de substrato, 30°C e 40% de umidade, demonstrando rápida colonização e degradação do substrato. Por ser um fungo filamentoso, é capaz de suportar altas densidades de biomassa e baixa umidade. A rápida colonização do substrato também pode ser devido à riqueza de nutrientes presente nos resíduos do café mostrando que este é um substrato valioso na fermentação de fungos filamentosos [11].

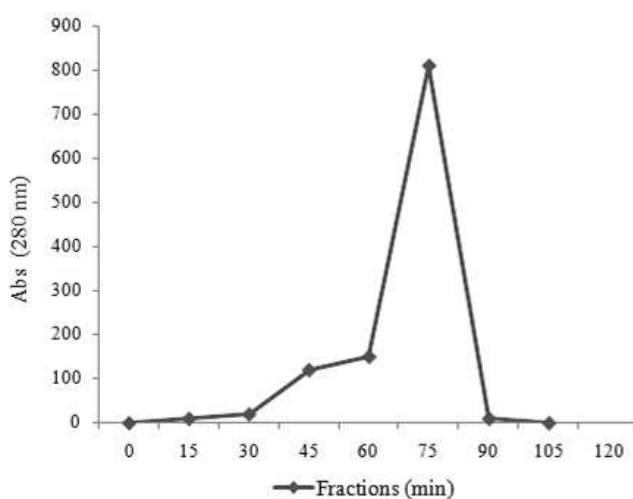
O processo de purificação por meio de troca iônica provou ser um processo determinante na obtenção de collagenases, como pode ser visto na Tabela 1, aumentando aproximadamente 65% da atividade proteolítica e collagenolítica em relação com o extrato bruto. Este aumento é esperado, uma vez que esses processos visam remover contaminantes que não são de interesse biotecnológico e potenciais inibidores, e concordam com outros estudos publicados, como por Novelli [14], que purificou proteases secretadas por *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium roquefortii* em farelo de trigo e soja, atingindo até 40 U/mL de atividade de protease. Portanto, como um primeira etapa do processo de purificação, a precipitação provou ser eficiente.

Tabela 1. Atividade proteolítica e collagenolítica

Amostra	Atividade Proteolítica (U/mL)	Fator de purificação protease	Atividade collagenolítica (U/mL)	Fator de Purificação collagenase
Bruto	122,71	1,0	16,80	1,0
DEAE-Sephadex	358,68	2,92	48,63	2,89
FPLC	602,38	4,90	679,44	40,44

As amostras também foram submetidas a sistema FPLC através do equipamento Akta Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O perfil de purificação da collagenase obtida por *Aspergillus esclerotiorum* pode ser vista na Figura 1. A collagenase parece obter pureza após este processo, e estima-se que tenha um peso molecular de 43,8 kDa, obtido após a retenção tempo de 33,68 min. Em relação à atividade enzimática das amostras purificadas, um desempenho significativo foi observada tanto no proteolítico quanto atividades collagenolíticas, apresentando aumento em até 92,8% em relação a amostra não purificada.

Figura 1. Perfil cromatográfico da protease collagenolítica



O efeito da temperatura sobre a atividade do enzima pode ser visto na Figura 2, a collagenase produzida por *A. sclerotiorum* mostra mais eficiência a 45°C, mostrando que a enzima tende a se degradar quando a temperatura aumenta. Este trabalho concorda com outros estudos, como os de Novelli [14] em que a temperatura ótima de proteases produzido por fermentação em estado sólido por *A. niger* e *A. brasiliensis* foi de 50°C. Hamdy [15], que apresentou temperatura ótima de 40°C para collagenases produzidas por *Rhizoctonia solani*. Suphatharaprateep *et al.* [16] que também mostrou atividade ótima a 45°C e estabilidade em temperaturas abaixo de 40°C. A fim de confirmar quais condições de pH são apropriadas para a melhor ação desta

enzima, testes de atividade collagenolítica foram realizados com variações de pH em uma escala de pH 5 a pH 10, como pode ser observado na Figura 3. Embora as variações são pequenas, a enzima pode funcionar bem em pH neutro e básico, demonstrando que a enzima produzida por *A. sclerotiorum* é mais ativa em pH alcalino. Wanderley *et al.* [17] utilizaram cepas de *Penicillium sp.* para produzir collagenases alcalinas que apresentem pH ótimo (9,0); Sakurai [18] mostra que a melhor faixa de pH para collagenases produzidas por *Streptomyces parvulus* é 8-10, com máxima atividade em pH 9,0, concordando com o presente estudo. Assim, pode-se dizer que esta collagenase também pertence ao grupo das proteases alcalinas

Figura 2. Temperatura ótima da protease collagenolítica

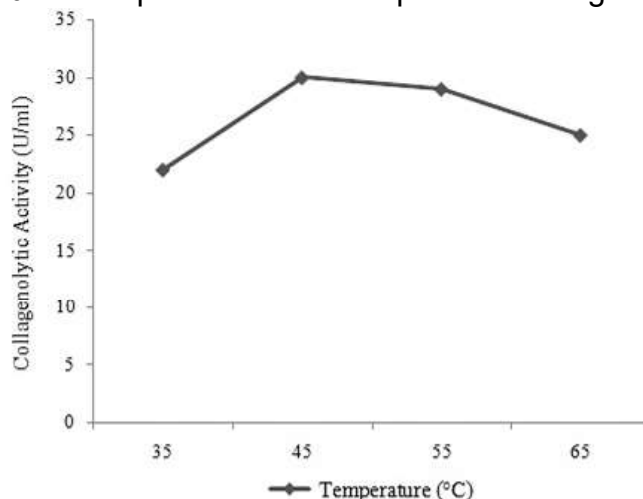
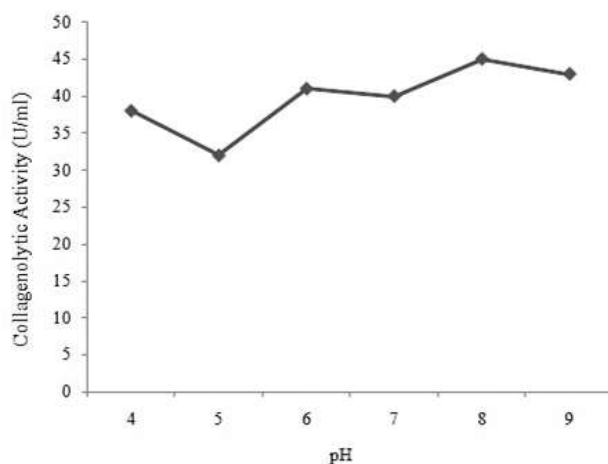


Figura 3. pH ótimo da protease collagenolítica



.CONCLUSÃO

Este estudo mostra que o microrganismo *Aspergillus sclerotiorum* é capaz de produzir proteases e collagenases usando resíduos de café como substrato nas condições observadas. Ademais, a protease purificada em sistema FPLC foi capaz de exibir atividade colagenolítica de 679.44 UmL, demonstrando ser uma espécie bastante promissora para este fim. Estima-se que a enzima obtida apresenta um peso molecular de 43,8 kDa. Os testes também indicam que o enzima mostra maior atividade em pH alcalino (8), e a 45°C. Portanto, conclui-se que este microorganismo tem potencial biotecnológico e pode ser usado como uma ferramenta na área da biomedicina e tecnologia alimentar.

RECONHECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro de o Coordenação de Aperfeiçoamento de Brasileiro Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Não temos conflito de interesses a declarar.

REFERENCIAS

1. Israel-Roming, F., Luta, G., Balan, D., Gherghina, E., Cornea, C. P. and Matei, F. 2015, *Agric. Agric. Sci. Procedia*. Elsevier, 6, 579-84.
2. Wanderley, M. C. A., Neto, J. M. W. D., Filho, J. L. L., Lima, C. A., Teixeira, J. A. C. and Porto, A. L. F. 2017, *Br. J. Microbiol. Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 48, 13-24.
3. Souza, P. M., Bittencourt, M. L. A., Caprara, C. C., Freitas, M. A. R. P. C., Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira-Filho, E. X. Pessoa Jr, A. and Magalhães, P. O. 2015, *Br. J Microbiol.*, 46, 337-46.
4. Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbbraken, J., Hong, S-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. and Frisvad, J. C. 2014, *Stud. Mycol.*, 78, 141-73.
5. Miller, J. D. and McMullin, D. R. 2014, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 9953-66.
6. Bianco, L. and Perrotta, G. 2015, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 5803-29.
7. Rodríguez, P., Cerda, A., Font, X., Sánchez, A. and Artola, A. 2019, *Waste Manag.*, 93, 63-71.
8. Zhao, Y., Sun-Waterhouse, D., Zhao, M., Zhao, Q., Qiu, C. and Su, G. 2018, *LWT – Food Sci. Technol. Academic Press*, 97, 496-502.
9. Shi, C., He, J., Yu, J., Yu, B., Huang, Z., Mao, X., Zheng, P. and Chen, D. 2015, *J. Anim. Sci. Biotechnol. BioMed. Central*, 6, 13.
10. Prado, D. Z., Okino-Delgado, C. H., Zanutto-Elgui, M. R., Silva, R. B. G., Pereira, M. S., Jahn, L., Ludwig-Müller, J., Silva, M. R., Velini, E. D. and Fleuri, L. F. 2019, *Biocatal. Agric. Biotechnol. Elsevier Ltd*, 19, 101165.
11. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. 1985, *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
12. Chavira Jr, R., Burnett, T. J. and Hageman, J. H. 1984. *Analytical biochemistry*, 136(2), 446-450.
13. Pandey, A. S., Carlos, R. N., Poonam, N. C., Brand, D. B., Radjiskumar, M. B. and Sevastianos, R. 2000, *Biochem. Eng. J.*, 6, 153-62.
14. Novelli, P. K., Barros, M. M. and Fleuri, L. F. 2016, *Food Chem. Elsevier Ltd*, 198, 119-24.
15. Hamdy, H. S. 2008, *Indian J. Biotechnol.*, 7, 333-40.
16. Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B. and Jongjareonrak, A. 2011, *N. Biotechnol. Elsevier B.V.*, 28, 649-55.
17. Wanderley, M., Neto, J. M. W. D., Lima, C. D. A., Silvério, S. I. C., Teixeira, J. A. and Porto, A. L. 2016, *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 4(4), 1-10.
18. Sakurai, Y., Inoue, H., Nishii, W., Takahashi, T., Iino, Y., Yamamoto, M. and Takahashi, K. 2009, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73, 21-8.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UMA PROTEASE PRODUZIDA POR *Aspergillus ochraceus* URM604

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Juanize Matias da Silva Batista, Thiago Pajeú Nascimento, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

A ser submetido à Brazilian Journal of Microbiology

1678-4405

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASE PRODUZIDA POR *Aspergillus ochraceus* URM604

Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Juanize Matias da Silva Batista, Thiago Pajeú Nascimento, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Resumo

Proteases são enzimas com grande diversidade bioquímica e são utilizadas em diversas industriais compondo um dos grupos de enzimas mais comercializados. Dentre os fungos conhecidos por produzir proteases, destaca-se o gênero *Aspergillus*, com espécies capazes de produzir proteases com as mais distintas características. O objetivo deste trabalho foi produzir proteases a partir de fermentação em estado sólido de *Aspergillus ochraceus* e realizar a purificação parcial por métodos cromatográficos. Para isto foi realizado planejamento fatorial 2^3 onde foram avaliados o tipo e quantidade do substrato e a umidade das fermentações. Posteriormente foi realizada purificação por cromatografia DEAE-Sephadex e Superdex-G75 em sistema FPLC. Assim como caracterização parcial avaliando o pH e temperatura ótimos da ação da protease. Foi observada que a melhor atividade proteásica nas amostras obtidas pela fermentação utilizando farelo de trigo como substrato (3g e 60% de umidade), apresentando atividade proteásica, colagenolítica e fibrinolítica respectivamente de 815,44 U/mL, 47,33 U/mL e 21,78 U/mL. Após realizar purificação foi obtida atividade de 186,66 U/mL e taxa de recuperação de 40%. Também foi observada maior atividade proteolítica em ensaios realizado em pH alcalino (8 e 9) e temperatura de 50°C. Assim, conclui-se que *A. ochraceus* possui potencial para produção de proteases com atividade fibrinolítica e colagenolítica.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido, Resíduo de café, Farelo de trigo, Protease fibrinolítica, Colagenase.

Introdução

As proteases encontram-se entre os três maiores grupos de enzimas comercializadas [1] muito devido a sua diversidade bioquímica e importância biológica, estando envolvidas numa grande variedade de processos fisiológicos e bioquímicos [2; 3;4]. Desta forma proteases são amplamente utilizadas em indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxtil, entre outras [5]. Estas enzimas podem atuar sobre substratos específicos, reduzindo o número de produtos indesejáveis após a reação [2]. Proteases com capacidade de degradar o colágeno, por exemplo, podem ser utilizadas na indústria do couro, alimentícia e farmacêutica [6]. Além disso, peptídeos de colágeno, liberados durante a reação enzima-substrato, ainda podem ser empregados no tratamento de hipertensão, fabricação de hidratantes, suplementos, como agente antimicrobiano, entre outros [7;8]. Outro destaque são proteases que apresentam atividade fibrinolítica, uma vez que promovem a dissolução de coágulos sem alteração do fluxo sanguíneo, prerrogativa não encontrada em agentes similares, podendo ser utilizadas para tratamento terapêutico da trombose [6;7]. Assim, estas enzimas acabam sendo objetos de grande interesse na pesquisa básica, desde a prospecção de novas proteases a otimização de bioprocessos para sua produção.

A ocorrência de proteases é relatada em quase todos os organismos, como procariontes, plantas, fungos e animais [2;3], sendo as de origem microbiana a principal fonte para o mercado comercial [2], por apresentarem características que facilitam seu uso em aplicações industriais. Entre algumas das vantagens das enzimas microbianas em relação às de origem vegetal e animal, estão: menores custos de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, manipulação genética, ausência de efeitos provocados pela sazonalidade e rápido desenvolvimento da cultura [9; 10]. Dentre os microrganismos, sobressaem-se ainda os fungos filamentosos pela facilidade na extração de enzimas extracelulares e possibilidade do uso de substratos de baixo custo para sua obtenção. Apesar das vantagens, levando em consideração a diversidade

de fungos filamentosos encontrados na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente, com destaque ao gênero *Aspergillus* [11].

O uso de Fermentação em Estado Sólido (FES) para produção de proteases vem se mostrando como uma técnica interessante devido à valorização de biomassa pouco explorada [12]. A FES é definida como o crescimento microbiano num substrato sólido com ausência total ou quase total de água livre e tem como vantagens uma menor demanda energética para esterilização, produção de diferentes enzimas de interesse comercial (geralmente, com alta eficiência catalítica e maior resistência à inibição), simula o ambiente natural de fungos filamentosos, favorecendo o seu crescimento, além das vantagens ambientais, uma vez que pode ser aplicada para um melhor gerenciamento dos resíduos sólidos agroindustriais [12; 13; 14].

Considerando as questões postuladas acima, é evidente a perspectiva do aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de protease por fermentação fúngica, uma vez que estes subprodutos apresentam uma composição rica em macro e micronutrientes [15; 16]. O uso destes resíduos ainda possibilita a resolução de problemáticas ambientais quanto ao emprego destes materiais, tendo em vista que podem gerar danos ambientais, sociais e econômicos, caso seja descartado sem tratamento adequado [17; 18; 3]. A geração de agro resíduos no Brasil representa uma enorme quantidade de material inicialmente subutilizado que pode servir como matéria-prima [19; 20]. Um exemplo são os resíduos obtidos a partir da indústria cafeeira [21], responsável pela produção de mais de 49 milhões de sacas de café em 2019 [22].

Para Schmidell [23], algumas características desejadas para que um material possa ser usado como meio de cultura em uma fermentação incluem ser barato, não promover alterações na molécula-alvo e ter composição fixa. Diante desta perspectiva, outros substratos utilizados para FES são coprodutos de produção agroindustrial. Um exemplo bastante comum é o farelo de trigo, pouco utilizado como material de consumo devido

suas características não palatáveis [24]. Todavia, é um material particularmente acessível e rico em nutrientes viabilizando-o como matéria-prima promissora em bioprocessos fermentativos [5; 14], desta forma é um dos resíduos mais descritos na literatura para fermentação de microrganismos [17].

Tendo em vista a importância da produção de proteases, a otimização de parâmetros de produção e purificação e a questão do aproveitamento de materiais de baixo custo financeiro e alto valor bioquímico na fermentação em estado sólido, este trabalho objetivou realizar a produção e purificação parcial de protease obtida a partir da fermentação em estado sólido de *Aspergillus ochraceus* URM604.

Materiais e métodos

Microrganismo

O fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 foi isolado da Zona da Mata Pernambucana, e encontra-se depositado na Micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. O meio utilizado para a manutenção do microrganismo foi o Ágar Batata Dextrose (BDA) previamente autoclavado a 121°C por 20min.

Fermentação em Estado Sólido (FES)

Para a produção das proteases foi realizado um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 1) para análise das melhores condições de produção, onde foram avaliados os seguintes parâmetros: tipo de substrato (café, trigo, e café + trigo em uma mistura de 1:1), à concentração de substrato (3g, 5g e 7g) e umidade (20%, 40% e 60%). A princípio foi realizado tratamento dos substratos utilizados, onde o resíduo de café foi seco em estufa a 100°C até completa desidratação e o farelo de trigo passou por peneira granulométrica

(0,6 a 2,0mm). Então, ambos os substratos foram autoclavados a 121°C por 20min, em frascos de erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente foram depositados nestes frascos os esporos do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 na concentração 10^7 esporos/mL, ressuspensos em solução de com caldo glicosado (1% Glicose 0,2% extrato de carne e 3% peptona) e tween 80 (p/v). A fermentação ocorreu por 7 dias em estufa a 30°C, de acordo com Osmolovsky [25].

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial 2^3

VARIÁVEIS	NÍVEIS		
	Menor (-1)	Central (0)	Maior (+1)
Concentração do substrato (g)	3	5	7
Umidade (%)	20	40	60
Tipo do substrato	Café	Café+trigo	Trigo

Extração da Enzima e Obtenção do precipitado cetônico

A extração da enzima foi realizada utilizando Tampão TRIS-HCl pH 8 0,1M com NaCl a 0,15M (7 ml/g de substrato). A filtração para obtenção do líquido metabólico foi realizada em bomba a vácuo, utilizando papel filtro Whatman nº1. Para obtenção do precipitado cetônico, uma alíquota do extrato bruto (10mL) foi precipitado com acetona (70%) e solubilizado em 1mL do mesmo tampão.

Dosagem Proteica

A determinação das proteínas totais foi realizada utilizando o método BCA (Ácido bicinchonínico) de acordo com Smith [26]. A atividade foi realizada em microplaca, onde foram misturados 25 µL da amostra e 200 µL da solução de BCA, e incubados a 37°C por 30 minutos. A absorbância foi então medida a 562 nm em um leitor de microplaca. Albumina sérica foi

usada como controle como determinado pelo fabricante (Pierce, Rockford, IL, EUA).

Atividades Enzimáticas

O método para determinação da atividade da protease foi descrito por Ginther [27] modificado. A mistura de reação conteve 25 μ L do substrato (azocaseína 1% p/v) e 15 μ L da amostra. Esta mistura foi incubada por 1 hora em estufa à 30°C sendo a reação interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% p/v. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm. Dos sobrenadantes, foram pipetados 0,8 mL e transferidos para eppendorfs contendo 0,2 mL de hidróxido de sódio 1,8N. A leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro. E o cálculo realizado considerando 1 unidade de atividade enzimática (U) como a variação da absorbância de 0,1 em uma hora.

A atividade collagenolítica foi determinada de acordo com o método de Chavira *et al.* [28], modificado. Uma suspensão de Azocoll a 5 mg/mL preparada no mesmo tampão de extração (0.1M Tris HCl, pH 8,0) para um volume final de 0,950 mL. Uma alíquota da amostra (50 μ L) foi inoculada nessa suspensão e a reação processada a 35°C, durante 1 hora sob agitação orbital. Em seguida, a reação foi centrifugada a 5.000 rpm por 5min, e a absorbância monitorada em 520nm espectrofotômetro.

A atividade fibrinolítica foi determinada de acordo com Wang *et al.* [29]. Para formação do coágulo foi utilizado 0,4 mL de fibrinogênio 0,72% com 0,1mL de tampão fosfato 245mM (pH7) e incubado a 37°C por 5min. Em seguida, foi adicionado 0,1mL de solução de trombina 20 U/mL, a solução foi incubada a 37°C por 10 min. Posteriormente foi adicionado

0,1mL de amostra contendo a enzima de interesse e a incubação continuou a 37°C. A solução sofreu agitação para homogeneização a cada 20 min até completar 1 hora. Por fim, foi adicionado 0,7mL de ácido tricloroacético 0,2M para parar a reação. Foi realizada então centrifugação a 15.000xg por 10 min. 1mL do sobrenadante foi recolhido e a absorbância lida a 275nm. A atividade foi medida levando em consideração que 1 unidade (UF) de atividade enzimática é definida como aumento de 0,01 por minuto na absorbância a 275 nm da solução de reação.

Purificação da enzima através de métodos cromatográficos

A purificação da protease foi realizada utilizando cromatografia de troca iônica em DEAE-sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. A amostra foi eluída em concentrações crescentes de solução salina de NaCl (0,3M, 0,6M e 1M) diluída no mesmo tampão de equilíbrio. As amostras foram coletadas em frações de 1ml, em fluxo de 1ml/min e lidas em espectrofotômetro a 280nm. Em seguida, a amostra com maior atividade proteásica foi concentrada por liofilização e aplicada em sistema FPLC através do equipamento Akta Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) onde foi utilizada coluna cromatográfica em gel filtração, Superdex-G75 previamente equilibrado com o tampão Tris-HCL 0,1M, pH8, e eluída com solução salina utilizando o mesmo tampão e NaCl a 0,15M em fluxo de 0,15mL/min.

Efeito do pH e Temperatura na Atividade Enzimática

O efeito do pH na atividade da protease foi avaliado pela mistura da solução enzimática com o substrato específico, preparados em soluções tampões 0,05 M com diferentes valores de pH: citrato de sódio (pH 5; 6; 7); Tris-HCl (pH 7; 8 e 9) e determinações da atividade proteásica seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

O efeito da temperatura foi determinado utilizando uma mistura de reação contendo o substrato específico e a solução enzimática, incubadas em diferentes temperaturas (20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C) por 60 min, para posterior determinação da atividade enzimática seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente.

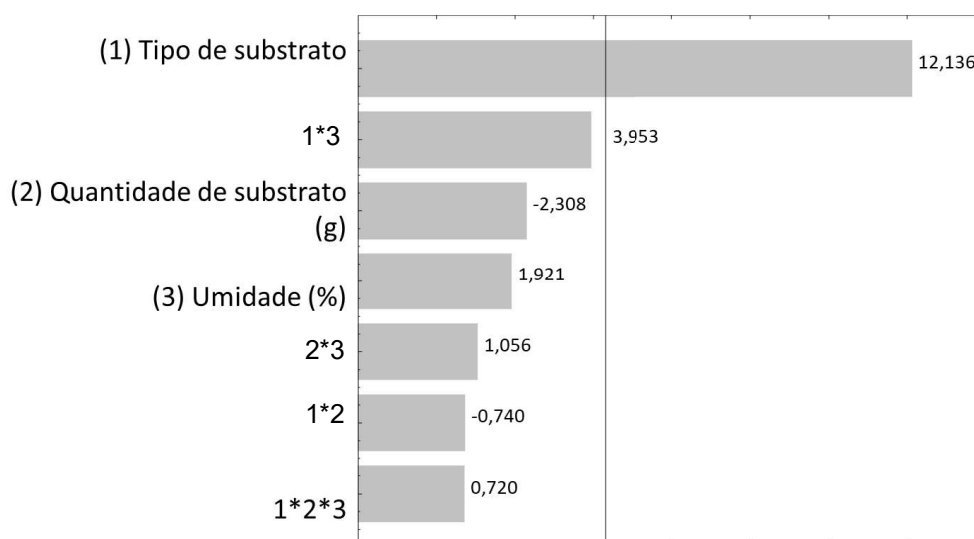
Resultados e Discussão

Fatores como umidade, tipo e concentração do substrato foram estudados para análise do efeito sobre a produção de protease. Todas as culturas de *Aspergillus ochraceus* URM604 foram capazes de crescer nas condições avaliadas. O substrato de farelo de trigo é frequentemente relatado na literatura para produção de enzimas, Nascimento *et al.* [5] apresenta farelo de trigo como melhor substrato na produção de proteases com ação fibrinolítica a partir da fermentação em estado sólido com fungos filamentosos. Naik *et al.* [15] também destaca o farelo de trigo ao compará-lo com resíduos agroindustriais na produção de enzimas por *Aspergillus sp.* O uso de resíduos de café é pouco mencionado na literatura embora apresente grande potencial [30], ainda assim foram utilizados em estudos para produção de celulasas e xilanases por bactérias (*Pseudoxanthomonas taiwanensis* e *Sphingobacterium composti*) e leveduras (*Cyberlindnera jardinii* e *Barnettozyma californica*), demonstrando serem excelentes meios para o cultivo de microrganismos [31].

Dentre as variáveis observadas neste trabalho, somente o tipo de substrato apresentou significância, como pode ser observado no gráfico de Pareto disponível na Figura 1. A quantidade de substrato e a umidade, bem como a interação entre as variáveis não afetou os resultados em relação a produção de proteases. Soccol *et al.* [13] destaca a importância do substrato escolhido para a fermentação, uma vez que a fonte nutritiva pode afetar diretamente o crescimento do microrganismo. Diante disto, considerando a composição dos substratos utilizados é natural que ocorra diferenças na produção de protease. De acordo com Zainol *et al.* [32], o resíduo

agroindustrial de café contém quantidades consideráveis de compostos bioativos. Em resíduos obtidos a partir do uso comercial de grãos do tipo Arábica (*Coffea arabica*) é possível encontrar 6.22% de carboidratos, 5.15% de proteínas e 1.38% de lipídeos. Estes valores são menores do que encontrados em outras espécies, mas conferem características organolépticas que tornam este tipo de café mais difundido comercialmente. Já o farelo de trigo, com características pouco palatáveis, também apresenta alta concentração de carboidratos, lipídeos e proteínas (40%, 15,2% e 5,5%, respectivamente) [33]. Outro fator determinante é em relação ao tamanho das partículas do substrato, segundo Pandey, *et al.* [21] substratos com partículas muito pequenas tendem a aglomerar, dificultando o crescimento microbiano. Desta forma, o substrato de farelo de trigo permite maior aeração e superfície para desenvolvimento do fungo [34].

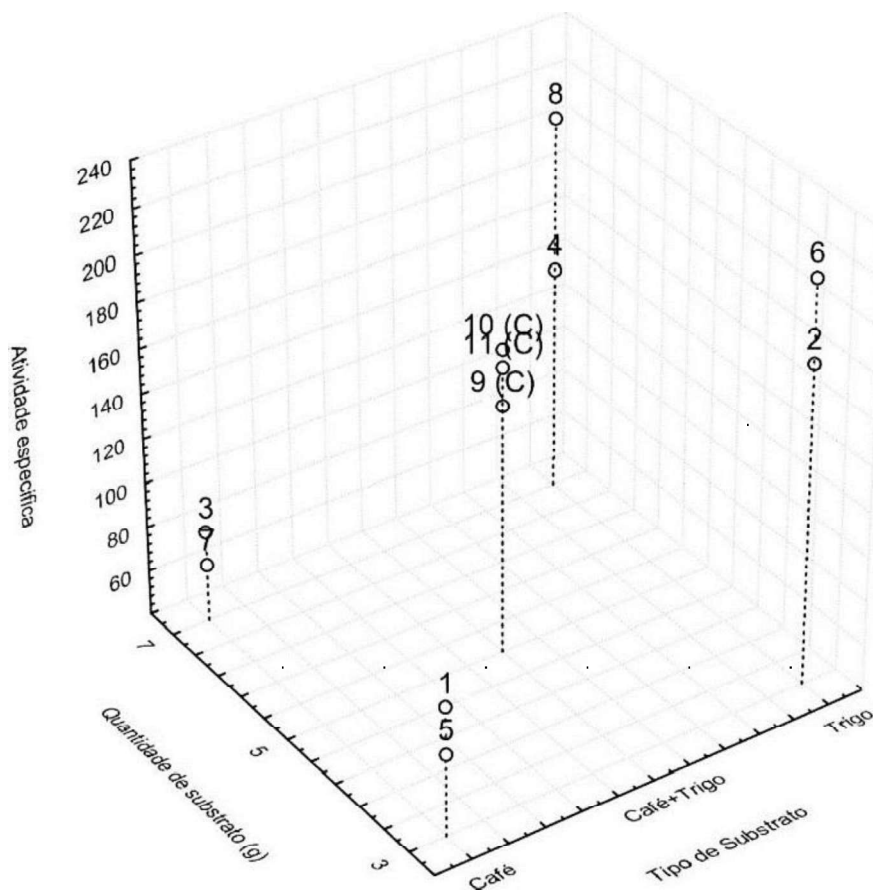
Figura 1. Gráfico de Pareto relacionando as variáveis e suas interações.



Diante disto, pode ser observada maior atividade proteolítica quando utilizado o substrato de farelo de trigo (Figura 2). Nascimento *et al.* [5] também destaca o farelo de trigo como excelente substrato para fermentação em estado sólido utilizando fungos filamentosos a fim de obter proteases fibrinolíticas. Este substrato é rico em nutrientes e suas partículas maiores proporcionam mais

superfície para o crescimento do fungo.

Figura 2. Efeito simultâneo do tipo e quantidade do substrato na produção de proteases por *A. ochraceus* em planejamento fatorial 2^3



Assim, foi possível obter maior atividade específica (218,27 U/mg) utilizando farelo de trigo (3g à 60% de umidade) quando comparado à borra de café (76,44 U/mg) nas mesmas condições de fermentação, apresentando ser o melhor substrato para obtenção destas enzimas. Também foram realizados testes com ambos os substratos na concentração de 1:1, nas condições centrais de 5g de substrato e 40% de umidade, ainda assim, os resultados obtidos quando utilizado somente o farelo de trigo se mostraram superiores (Tabela 2). Os resultados do estudo corroboram com a literatura, demonstrando o potencial do gênero *Aspergillus* como produtor de protease, além de enfatizar o farelo de trigo como substrato notório para uso em fermentações em estado sólido [35].

Tabela 2. Resultados da produção de protease por *Aspergillus ochraceus* utilizando planejamento fatorial 2³

Substrato	Quantidade (g)	Umidade (%)	Ativ. proteásica (U/mL)	Prot. Total (mg/mL)	Ativ. Proteásica Específica (U/mg)
CAFÉ	3	20	651,33	66,95	97,28
CAFÉ	3	60	680,67	89,05	76,44
CAFÉ	7	20	807,33	100,27	80,52
CAFÉ	7	60	705,00	107,50	65,58
TRIGO	3	20	815,33	44,75	182,19
TRIGO	3	60	688,67	31,55	218,27
TRIGO	7	20	589,00	42,16	139,71
TRIGO	7	60	726,33	35,08	207,07
C+T*	5	40	927,33	48,30	191,99
C+T*	5	40	907,33	24,25	167,29
C+T*	5	40	916,33	50,45	181,69

*C+T = 50% de Borra de Café + 50% de Farelo de Trigo

Atividades específicas foram conduzidas para avaliar o potencial do microrganismo estudado na produção de enzimas com atividade fibrinolítica, assim como de collagenases, tendo em vista que um mesmo microrganismo pode produzir diferentes biomoléculas. As avaliações foram realizadas com o extrato bruto obtido por fermentação em estado sólido com 3g de farelo de trigo a 60% de umidade e os resultados são promissores. Em relação a atividade collagenolítica foi possível observar 47,33 U/mL, já a atividade fibrinolítica foi expressa em 21,78 U/mL. Osmolovskiy *et al.* [36] ao realizar um estudo avaliativo do potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas fibrinolíticas obteve 17.6 U/mL fermentando do fungo *A. ochraceus* em meio líquido com pH 8. O tipo de fermentação utilizada interfere diretamente na concentração das proteínas obtidas, a quantidade de água

livre presente na fermentação submersa pode diluir as proteases produzidas. Por sua vez, Nascimento *et al.* [5] avalia a produção de enzima fibrinolítica por *Mucor subtilissimus* UCP1262 a partir de fermentação em estado sólido, obtendo resultado de até 57.1 U/mL. Estes dados reforçam a importância da fermentação em estado sólido na concentração das enzimas produzidas.

O perfil cromatográfico completo obtido a partir da cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex pode ser observado na Figura 3, apesar de apresentar determinada constância na absorbância a 280nm, só foi observado atividade proteásica nas frações eluídas a 0,3M. Toda via, este processo de purificação mostram-se eficiente, uma vez que foi atingida uma recuperação de 131,35% (436,67 U/mL) nas frações eluídas com 0,3M de NaCl. e Tampão pH 9 a 0,1M. O aumento significativo na atividade pode ser indicativo da presença de inibidores nas amostras não purificadas. As amostras com atividades obtidas nesta etapa, foram concentradas em liofilizador e submetidas a coluna Superdex G-75, obtendo-se um único pico com atividade de 186,66 U/mL com recuperação de 40% (Figura 4).

Figura 3. Cromatograma obtido a partir de coluna DEAE-Sephadex

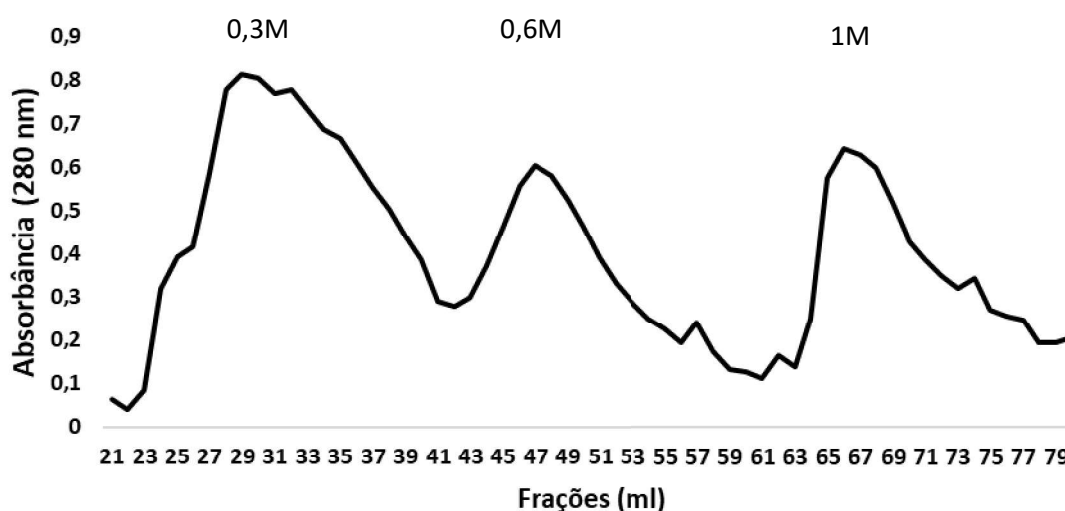
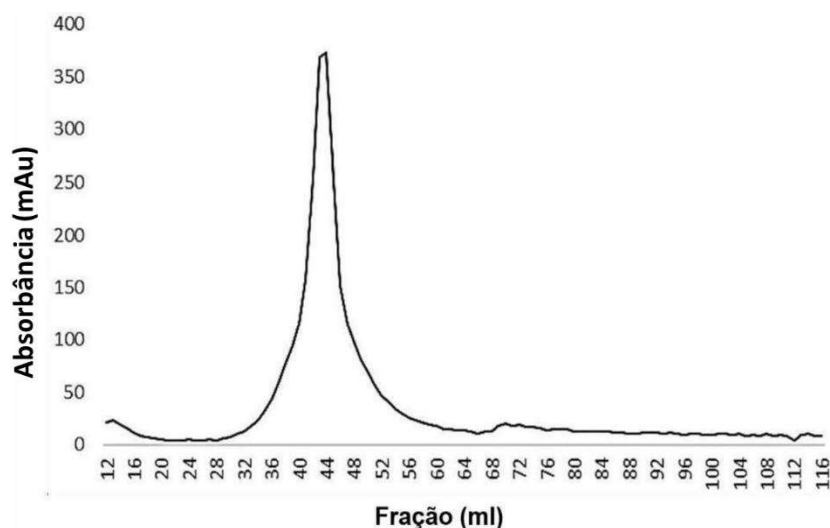
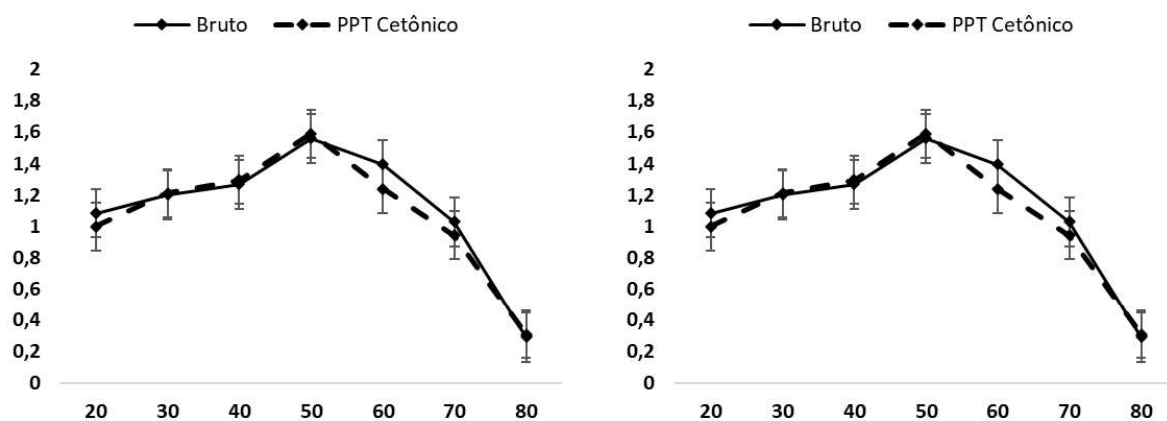


Figura 4. Perfil de eluição e pico obtido no sistema Superdex 75 FPLC.



Também foi realizada caracterização parcial da protease em questão por meio da avaliação da influência da temperatura e pH em sua atividade, uma vez que são fatores determinantes para seu uso industrial. Para isto foi avaliado o pH ótimo e temperatura ótima das proteases produzidas por *A. ochraceus* URM604 (Figura 5), como pode ser observado, os melhores resultados foram obtidos em atividades com pH alcalino (pH 8 e 9) e temperatura de 50°C. Em relação ao pH ótimo, Amaral *et al.* [37] defendem que proteases com propriedades alcalinas podem ser usadas na fabricação de couro, detergentes e indústria farmacêutica. Em trabalho realizado com *A. oryzae* e *A. flavipes*, atividade proteásica manteve-se alta até 50°C [35] havendo uma queda substancial da atividade em temperaturas mais altas, similarmente ao presente trabalho. Souza *et al.* [36] também apresentou protease com atividade proteolítica ótima a 50°C utilizando o fungo *A. foetidus*. O declínio nas atividades observadas neste trabalho e nos acima citados possivelmente ocorre pela desnaturação da enzima frente a altas temperaturas.

Figura 5. pH ótimo [A] e Temperatura ótima [B] da protease parcialmente purificada em cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex



Conclusão

O uso de resíduos agroindustriais, como a borra de café, para fermentação em estado sólido é eficaz, entretanto, dentre as variáveis avaliadas a melhor condição para produção de proteases por *Aspergillus ochraceus* URM604, o tipo de substrato foi o único significativo, apresentando maior atividade no uso de farelo de trigo. Os resultados obtidos no presente trabalho também demonstram o potencial do microrganismo como produtor de collagenases e enzimas fibrinolíticas, fazendo-se necessário maiores estudos acerca do assunto. Além disto, a protease obtida por *Aspergillus ochraceus* URM604 foi purificada por técnicas cromatográficas e apresenta potencial biotecnológico para uso na indústria de detergentes, amaciamento de couro e na indústria farmacêutica. Desta forma, os resultados obtidos, embora preliminares, destacam o uso de *A. ochraceus* URM604 para produção de proteases por meio da fermentação em estado sólido.

Referências Bibliográficas

- [1] TRIPATHI, P.; TOMAR, R.; JAGANNADHAM, M.V. Purification and biochemical characterization of a novel protease streblin. *Food Chemistry*, 125, 1005-1012, 2011.
- [2] GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*. V.128. p. 254-257. 2019
- [3] SILVA, J. C. *et al.* Uso de Resíduos Orgânicos de Anchova (*Pomatomus saltatrix*) e Robalo flecha (*Centropomus undecimalis*) Para Recuperação e Proteases Alcalinas. In. AGUIAR; A. C. SILVA, K. A. EL-DEIR, S. G. (Orgs.). *Resíduos Sólidos: Impactos Ambientais e Inovações Tecnológicas*. 1ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 117-126, 2019.
- [4] OLIVEIRA, V. M.; SILVA, J. C.; SILVA, Q. J.; PORTO, A. L. F. Purificação Parcial de Biomoléculas Extraídas dos Resíduos Sólidos do Pescado Beneficiado Em Petrolândia-PE. In. AGUIAR; A. C. SILVA, K. A. EL-DEIR, S. G. (Orgs.). *Resíduos Sólidos: Impactos Ambientais e Inovações Tecnológicas*. 1ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 127-139. 2019.
- [5] NASCIMENTO, T. P. *et al.* Production and Characterization of New Fibrinolytic Protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in Solid-State Fermentation. *Advances in Enzyme Research*, vol. 03, no. 03, p. 81-91. 2015.
- [6] BHAGWAT, P. K. *et al.* Collagen and collagenolytic proteases: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, V. 15. p. 43-55. 2018.
- [7] YAGODA, M. R. *et al.* A Nutritional Supplement Formulated with Peptides, Lipids, Collagen and Hyaluronic Acid Optimizes Key Aspects of Physical Appearance in Nails, Hair and Skin. *Nutrition & Food Sciences*. v.5. 2014.
- [8] USAMAH, A. *et al.* Sun-082 effects of oral collagen peptides on nutritional status of peritoneal dialysis patients. *Kidney International Reports*. v. 4, n. 7. S188-S189. 2019.
- [9] ALI, A. M. M.; BAVISETTY, S. C. B. Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020.
- [10] SWANT, R.; NAGENDRAN, R. Protease: An enzyme with multiple industrial applications. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 3, n. 6, p. 568-579. 2014.
- [11] BIANCO, L., PERROTTA, G. Methodologies and perspectives of proteomics applied to filamentous fungi: From sample preparation to secretome analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 5803-5829, 2015.
- [12] LIZARDI-JIMÉNEZ, M. A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state

- fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 Biotech, v. 7, n. 1, 2017, p. 1-9.
- [13] SOCCOL, C. R.; COSTA, E. S. F.; LETTI, L. A. J.; KARP, S. G.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. de S. Recent developments and innovations in solid state fermentation. Biotechnology Research and Innovation, v. 1, p. 52–71. 2017.
 - [14] SADAH, P.K.; DHUAN, S.; DHUAN, J.S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresources and Bioprocessing, v. 5, p. 1-15. 2018.
 - [15] NAIK, B.; GOYAL, S. K.; TRIPATHI, A. D.; KUMAR, V. Screening of agro-industrial waste and physical factors for the optimum production of pullulanase in solid-state fermentation from endophytic *Aspergillus* sp. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v.22, Article 101423. 2019.
 - [16] FABISAK, M. M.; LUCENA, T. V.; BRITO, E. P. L.; FIRMO, A. L. B. Influência do pH na Geração de Biogás e Metano Proveniente da Biodigestão Anaeróbia de Resíduos Alimentares. In: BEZERRA, R. P. L.; AGUIAR, W. J.; EL-DEIR, S. G. (Orgs.). Resíduos Sólidos: Gestão em Indústrias e Novas Tecnologias. 2ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 300-308. 2017.
 - [17] SANTOS, P. S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; RICARDO BRAGA-JR, A. C. R.; ASSIS, F. G. V.; LEAL, P. L. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: Uma revisão sistemática. The Journal of Engineering and Exact Sciences, v. 4, n. 2, p. 0181–0188. 2018.
 - [18] GAMA, I.D.M.; MENEZES, R.A.M.; SILVA, T.A. Geração de resíduos sólidos em pisciculturas. In: NUNES, I.L.S.; PESSOA, L.A.; GIOVANETTIEL-DEIR, S. (Org.). Resíduos sólidos: o desafio da gestão. 1ed. Recife: EDUFRPE, p. 689-698. 2019.
 - [19] LUZ, E. L. P.; MEDEIROS, M. C. Economia Circular Aplicada À Agroindústria Canavieira. In. NUNES, I. L. S.; PESSOA, L. A.; EL-DEIR, S. G. (Orgs.). Resíduos Sólidos: Os Desafios da Gestão. 1ª ed. Recife: EDUFRPE, p. 240-250. 2019.
 - [20] RIBEIRO, M.C.P.; NADAL, C.P.; ROCHA JUNIOR, W.F.; FRAGOSO, R.M.S.; LINDINO, C.A. Institutional and Legal Framework of the Brazilian Energy Market: Biomass as a Sustainable Alternative for Brazilian Agribusiness. Sustainability, v. 12, p. 1-10. 2020.
 - [21] PANDEY *et al.* Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. Biochemical Engineering Journal, [s. l.], v. 6, p. 153-162, 2000.
 - [22] ABIC - Associação Brasileira da Indústria de Café. Estatísticas. Disponível em: <<https://www.abic.com.br/estatisticas/>>. Acesso em: 20 out. 2020.
 - [23] SCHMIDELL, W. Micro-organismos e meio de cultura para utilização industrial. In. SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUAROMA, U.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. Vol. 2. São Paulo: EDGARD BLUCHER, p. 5-18. 2001.

- [24] SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. *Food Science and Technology*, v. 27, n. 4, p. 805-811. 2007.
- [25] OSMOLOVSKIY, A. A. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* v. 71, p. 62-66. 2016.
- [26] SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v.150, n.1, p. 76-85. 1985
- [27] GINTHER, C.L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.15, p.522-526. 1979.
- [28] CHAVIRA, R. J.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying proteinases with Azocoll. *Annalytical Biochemistry*, 136: 4446-4450. 1984.
- [29] WANG S. L., Yeh, P.Y. Production of a surfactant-and solvent stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by *Bacillus subtilis* TKU007. *Process Biochem* 41:1545-1552. 2006
- [30] NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(8), 1209-1219. 2017.
- [31] CERDA, A.; MEJÍAS, L.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Cellulase and xylanase production at pilot scale by solid-state fermentation from coffee husk using specialized consortia: The consistency of the process and the microbial communities involved. *Bioresource Technology*, v. 243, p.1059-1068. 2017.
- [32] ZAINOL, K.; AHMAD, F.; ZIN, Z. M.; MAMAT, H. Antioxidative properties and proximate analysis of spent coffee ground (SCG) extracted using ultrasonic-methanol assisted technique as a potential functional food ingredient. 4 (3) : 636 – 644, 2020.
- [33] BABU, C.R.; KETANAPALLI, H.; BEEBI, S. K.; KOLLURU, V. C. Wheat Bran-Composition and Nutritional Quality: A Review. *advances in biotechnology and microbiology*. V.9 (1), 2018.
- [34] DE CASTRO, R. J. S., et al. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.4, n.4, p.678-688. 2015.
- [35] NOVELLI, P.K, BARROS, M.M, FLEURI, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization, *Food Chem.* v.198, 119-124. 2016.
- [36] SOUZA, P.M. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. 2015. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação das condições de fermentação e desenvolvimento do processo de purificação e a caracterização da protease também são atividades essenciais visando a aplicação da mesma, uma vez que tais qualidades direcionam o setor onde enzimas podem atuar. No capítulo 1 foi observada a produção protease com atividade colagenolítica do fungo *Aspergillus sclerotiorum* URM5792 a partir de fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato e sua purificação por meio de técnicas cromatográficas. Para avaliação de seu potencial biotecnológico, foram realizadas atividades proteásicas e colagenolíticas bem como caracterização parcial, baseando-se na atividade colagenolítica. Os resultados obtidos, embora preliminares, demonstram o potencial do fungo para produção de colagenase nas condições estudadas. Além de evidenciarem o uso de resíduo de café como potencial substrato para fermentações, sendo importante como uma solução para o descarte destes materiais.

No capítulo 2 foram estabelecidas as melhores condições de cultivo do fungo *Aspergillus ochraceus* URM604 a partir de planejamento fatorial 2^3 , visando reduzir os custos do processo inicial de obtenção de proteases foram avaliados dois substratos de baixo custo e resíduos agroindustriais (farelo de trigo e resíduo de café, respectivamente), dentre estes destacou-se o farelo de trigo na condição de 60% de umidade e 3g de substrato. Estes resultados são importantes tendo em vista que a escolha do substrato pode alterar significativamente o teor da amostra extraída, além de corroborarem com outros estudos que destacam o farelo de trigo como substrato por seu alto teor nutricional. Em seguida foi realizada a purificação parcial da protease por técnicas cromatográficas.

Nesta perspectiva, este trabalho destaca o potencial de ambos os fungos estudados para produção de proteases de interesse biotecnológico, e igualmente ressalta que a fermentação em estado sólido pode beneficiar-se de coprodutos e/ou resíduos da agroindústria, reduzindo os custos deste processo enquanto oferece alternativa para o uso destes materiais.

ANEXOS

TRABALHOS PUBLICADOS

Current Topics in
Biotechnology

Mini-Review

Fructosyltransferase produced by microorganisms for prebiotic synthesis: a brief review

Juanize Matias da Silva Batista, Anna Gabrielly Duarte Neves, Julyanne Victoria dos Santos Ferreira, Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Marcia Nieves Carneiro Da Cunha, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa* and Ana Lúcia Figueiredo Porto

Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Recife, PE, 52171-900, Brazil.



DECLARAÇÃO

DECLARAMOS PARA OS DEVIDOS FINS QUE O TRABALHO INTITULADO **EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTES: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA EM PUBLICAÇÕES BRASILEIRAS** COM AUTORIA DE **SYBELLE MONTENEGRO DOS SANTOS, AMANDA LUCENA DOS SANTOS, KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO, ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES, JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO** FOI APRESENTADO NA FORMA DE COMUNICAÇÃO ORAL NO EVENTO II SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO, PROMOVIDO PELA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO, OCORRIDO ENTRE 1 E 4 DE OUTUBRO DE 2020 E PUBLICADO EM FORMATO DE RESUMO EXPANDIDO NOS ANAIS DO EVENTO, DE ISSN 2675-3731.

Garanhuns, 21 de outubro de 2020.

COORDENADOR GERAL DA II SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO
COORDENAÇÃO SETORIAL DE EXTENSÃO E CULTURA

Prof. Higor Ricardo M. Santos
Coord. Set. de Extensão
UPE Multicampi Garanhuns
Mat.: 12096-0



DECLARAÇÃO

DECLARAMOS PARA OS DEVIDOS FINS QUE O TRABALHO INTITULADO **NANOTECNOLOGIA VERDE: UMA NOVA ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**. COM AUTORIA DE **MICHELINE THAIS DOS SANTOS, KETHYLEN BÁRBARA BARBOSA CARDOSO, SYBELLE GEORGIA MESQUITA DA SILVA, JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA, THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO, ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA, ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO** FOI APRESENTADO NA FORMA DE COMUNICAÇÃO ORAL NO EVENTO II SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO, PROMOVIDO PELA UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO, OCORRIDO ENTRE 1 E 4 DE OUTUBRO DE 2020 E PUBLICADO EM FORMATO DE RESUMO EXPANDIDO NOS ANAIS DO EVENTO, DE ISSN 2675-3731.

Garanhuns, 21 de outubro de 2020.

COORDENADOR GERAL DA II SEMANA CIENTÍFICA DO AGRESTE PERNAMBUCANO
COORDENAÇÃO SETORIAL DE EXTENSÃO E CULTURA

Prof. Higor Ricardo M. Santos
Coord. Set. de Extensão
UPE Multicampi Garanhuns
Mat.: 12096-0



Organizadores
Francisco Henrique da Silva
Sivoneide Maria da Silva
Matheus Alves Siqueira de Assunção
Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

FATORES DE VIRULÊNCIA MICROBIANOS E TERAPIAS EMERGENTES

Vol. 01 – Bactérias

São José dos Pinhais
LATIN AMERICAN PUBLICAÇÕES
2020

CAPÍTULO 14

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS SINTETIZADAS POR BACTÉRIAS

Juanize Matias da Silva Batista

Doutora em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: juanizematias@yahoo.com.br

Micheline Thais dos Santos

Mestre em Zootecnia pela Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: michelinesantos@live.com

Kethylen Bárbara Barbosa Cardoso

Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: kethybarbara@gmail.com

Amanda Lucena dos Santos

Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de

Pernambuco-UFPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: amandalucena17@gmail.com

Júlia Maria Rodrigues Guimarães

Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de

Pernambuco-UFPE

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: guimaraesjuliarodrigues@gmail.com

Thiago Pajeú Nascimento

Doutor em Biologia Aplicada a Saúde – LIKA/UFPE

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235- Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil/ Rua Dom

Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: thiago_pajeu@hotmail.com

Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Universidade de Pernambuco-UPE

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Gov. Agamenon Magalhães - Santo Amaro, Recife -PE, Brasil

E-mail: romero_brandao@hotmail.com

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Doutora em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas UNICAMP

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: analuporto@yahoo.com.br

II CURSO DE INVERNO EM BIOCÊNCIAS

CERTIFICADO

Certificamos que **Kethylen Barbara Barbosa Cardoso** apresentou com êxito o trabalho na modalidade pôster intitulado **APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE CAFÉ PARA PRODUÇÃO DE COLAGENASES POR *Aspergillus sclerotiorum* URM – 5792** de autoria de Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa e Ana Lúcia Figueiredo Porto, durante as atividades do II Curso de Inverno em Biociências, realizado no período de 23 a 27 de Julho de 2019, pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Recife, 26 de julho de 2019



Dra. Márcia Vanusa da Silva
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Wêndeo Kennedy Costa
Comissão Organizadora



II CURSO DE INVERNO EM BIOCÊNCIAS

CERTIFICADO

Certificamos que **Kethylen Barbara Barbosa Cardoso** apresentou com êxito o trabalho na modalidade pôster intitulado **POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO FUNGO *Aspergillus ochraceus* PARA PRODUÇÃO DE COLAGENASES** de autoria de Kethylen Barbara Barbosa Cardoso, Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa, Anna Gabrielly Duarte Neves, Karolaine da Conceição Gama Santos, Juanize Maias da Silva Batista, Julyanne Victoria dos Santos Ferreira, Maria Clara do Nascimento e Ana Lúcia Figueiredo Porto, durante as atividades do II Curso de Inverno em Biociências, realizado no período de 23 a 26 de Julho de 2019, pela Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Recife, 26 de julho de 2019



Dra. Márcia Vanusa da Silva
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Wêndeo Kennedy Costa
Comissão Organizadora



VOLUME 1

**PESQUISAS EM TEMAS
DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



EDNILSON SERGIO RAMALHO DE SOUZA
(EDITOR)

CAPÍTULO 3

LECTINAS DE FOLHAS DE *Phthirusa pyrifolia*

BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa.¹

BATISTA, Juanize Matias da Silva.²

CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa.³

ARAUJO, Vivianne Ferreira.⁴

NASCIMENTO, Thiago Pajeú.⁵

PORTO, Ana Lucia Figueiredo.⁶

DOI: 10.46898/rfb.9786599152481.3.

1 – UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

2 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

3 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

4 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

5 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

6 UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CAPÍTULO 5

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* ssp. SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

SANTOS, Amanda Lucena dos.¹

CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa.²

NASCIMENTO, Thiago Pajeú.³

BATISTA, Juanize Matias da Silva.⁴

NEVES, Anna Gabrielly Duarte.⁵

BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa.⁶

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo.⁷

DOI: 10.46898/rfb.9786599152481.5.

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus
Recifeamandalucena17@gmail.com

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus
Recifekethybarbara@gmail.com

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Recife
thiago_pajeu@hotmail.com

4 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Recife
juanizematias@yahoo.com.br

5 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) Campus
Recifea.gabriellydneves@gmail.com

6 Universidade de Pernambuco (UPE), Campus
Reciferomero_brandao@yahoo.com.br

CAPÍTULO 6

LECTINAS DE SEMENTES ENCONTRADAS NO BRAZIL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

CARDOSO, Kethylen Barbara Barbosa.¹

SANTOS, Sybelle Montenegro dos.²

SANTOS, Amanda Lucena dos.³

BATISTA, Juanize Matias da Silva.⁴

NASCIMENTO, Thiago Pajeú.⁵

BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa.⁶

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo.⁷

DOI: 10.46898/rfb.9786599152481.6.

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus

Recife

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus

Recife

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus

Recife

4 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus

Recife5 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Campus Recife

6 Universidade de Pernambuco (UPE), Campus Recife



870200023542



18/02/2020

12:02

29409161912039361

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

Número do Processo: BR 10 2020 003364 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS ACOPLADO À CROMATOGRAFIA PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS.

Resumo: SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS ACOPLADO À CROMATOGRAFIA PARA OBTENÇÃO DE ENZIMAS. A invenção refere-se ao acoplamento de um sistema de duas fases aquosas (SDFA) a uma cromatografia para purificação de enzimas, preferencialmente a frutotransferase (FTase), nesse caso, produzida por fungo filamentosos. Para SDFA utiliza-se preferencialmente polietileno glicol e citrato de sódio (PEG/citrato de sódio). As etapas foram acopladas utilizando colunas verticalmente posicionadas em superior e inferior, onde a coluna superior compreende ao SDFA a inferior à resina cromatográfica, e ambas conectadas por mangueira ou tubo, onde o fluxo é controlado por válvula presente na coluna superior. Apesar da implantação de diversas técnicas para o aumento da eficiência na purificação enzimática industrial, muitas dessas técnicas são demoradas, com muitas etapas e acabam resultando num menor rendimento. Assim, o acoplamento do SDFA a uma cromatografia possibilitou a redução do tempo gasto na purificação de enzimas, de forma que o SDFA foi utilizado nas etapas de extração, clarificação e concentração e a cromatografia como etapa final da purificação. Dentre as possíveis enzimas para purificação nesse modelo, a FTase apresentou 12,39 U/mL de atividade, fator de purificação 6,42 e um rendimento em atividade de 352%. Assim, os resultados sugerem que a técnica é eficaz na purificação de enzimas, podendo ser aplicada em diversos setores industriais como alimentos, farmacêutico e animal.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: ANA LUCIA FIGUEIREDO PORTO

Inventor 2 de 8

Nome: JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA

Inventor 3 de 8

Nome: ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA

Inventor 4 de 8

Nome: KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO

Inventor 5 de 8

Nome: CAMILA SOUZA PORTO

Inventor 6 de 8

Nome: ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES

Inventor 7 de 8

Nome: RAQUEL PEDROSA BEZERRA

Inventor 8 de 8

Nome: MARCIA NIEVES CARNEIRO DA CUNHA



06/12/2019 870190129661
21:29

29409161811251039

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

Número do Processo: BR 10 2019 025957 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24134488000108
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP: 50670-901
País: Brasil
Telefone: (81)2126 8959
Fax: (81)2126 8959
Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE)
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 24416174000106
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço: Rua Dom Manoel de Medeiros nº s/n, Dois Irmãos
Cidade: Recife
Estado: PE
CEP:
País: BRASIL
Telefone: (81) 332 06104
Fax:
Email: coordenacao.nit@ufrpe.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FILTRO BIOLÓGICO DE BIOMASSA FÚNGICA PARA TRATAMENTO POR BIOSSORÇÃO DE EFLUENTES COM CARGA DE CORANTES E RESPECTIVO PROCESSO DE TRATAMENTO

Resumo: Esta invenção proporciona um filtro biológico que consiste na utilização de um cartucho, material filtrante ou refil de biomassa de fungos filamentosos, preferencialmente do gênero *Aspergillus*, para tratamento de efluentes coloridos através do processo de bioissorção. O cartucho permite o contato da biomassa com o efluente em quaisquer condições ambientais, independentemente de viabilidade celular, num processo de até 120min para máxima descoloração e redução de toxicidade do efluente. A água tratada pode ser reciclada ou eliminada conforme legislação. Assim, a presente invenção fornece um método e um produto seguro, econômico, compacto, fácil de aplicar, rápido, sem liberação de subprodutos, e consequentemente, ecologicamente correto, para o problema do tratamento e disposição de efluentes industriais coloridos.

Figura a publicar: 3

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 15**Nome:** ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES**Inventor 2 de 15****Nome:** ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA**Inventor 3 de 15****Nome:** KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO**Inventor 4 de 15****Nome:** JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA**Inventor 5 de 15****Nome:** ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES**Inventor 6 de 15****Nome:** KAROLAINE DA CONCEIÇÃO GAMA SANTOS**Inventor 7 de 15****Nome:** ARTHUR FILIPE FERREIRA PEQUENO**Inventor 8 de 15****Nome:** NAYARA VITÓRIA DOS SANTOS CRUZ**Inventor 9 de 15****Nome:** BRUNO OLIVEIRA DE VERAS**Inventor 10 de 15****Nome:** RAQUEL PEDROSA BEZERRA**Inventor 11 de 15****Nome:** VIVIANNE LAYS RIBEIRO CAVALCANTI**Inventor 12 de 15****Nome:** MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA**Inventor 13 de 15****Nome:** SÁVIA GAVAZA**Inventor 14 de 15****Nome:** ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO**Inventor 15 de 15****Nome:** MÁRCIA VANUSA DA SILVA