



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS DE *Pleurotus pulmonarius* (PLEUROTACEAE)**

ROBERTO BENTES ROZÁRIO

MANAUS-AM

2025

ROBERTO BENTES ROZÁRIO

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
ENZIMAS FIBRINOLÍTICAS DE *Pleurotus pulmonarius* (PLEUROTACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito obrigatório para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Waldireny Rocha Gomes

MANAUS-AM

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R893d Rozario, Roberto Bentes
Produção, purificação e caracterização bioquímica de proteases
fibrinolíticas de *Pleurotus pulmonarius* (Pleurotaceae) / Roberto
Bentes Rozario. - 2025.
60 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Waldireny Rocha Gomes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Manaus,
2025.

1. Trombose. 2. Resíduos. 3. Meios de cultivo. 4. Proteases. I.
Gomes, Waldireny Rocha. II. Universidade Federal do Amazonas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título

**“Produção, purificação e caracterização bioquímica de proteases
fibrinolíticas de *Pleurotus pulmonarius* (Pleurotaceae)”**

DISCENTE: ROBERTO BENTES ROZÁRIO

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 21/03/2025.

Documento assinado digitalmente
 PATRICIA DANIELLE OLIVEIRA DE ALMEIDA
Data: 14/04/2025 12:08:29-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**

Documento assinado digitalmente
 WALDIRENY ROCHA GOMES
Data: 25/03/2025 14:30:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Waldireny Rocha Gomes - Presidente e Orientadora

Documento assinado digitalmente
 THIAGO PAJEU NASCIMENTO
Data: 25/03/2025 13:58:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Pajeu Nascimento-Membro Externo

Documento assinado digitalmente
 JOAO VICENTE BRAGA DE SOUZA
Data: 25/03/2025 11:16:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. João Vicente Braga Souza - Membro Interno

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção, por ter guiado meus caminhos e ensinando a levantar a cabeça em momentos de dificuldade e mostrando que a vida não é tão ruim pois, no mundo, a gente perde, mas nem sempre o jogo é assim.

Aos meus pais, que me proporcionaram todo o suporte para que eu pudesse chegar a esse momento. As frases de orientação: “a quem Deus prometeu, Jamais faltou, na hora certa o bom Deus dará”, “Para tudo tem um jeito, e se não teve jeito é por ainda não chegou ao fim”, sempre permanecerão comigo. Vocês são os maiores responsáveis por mais essa conquista, amo todos vocês.

À minha esposa, meu amor, você e nossos filhos são minha inspiração para derrubar as barreiras que vivemos, estamos vivendo e ainda viveremos. Cada passo que dou sempre estarei compartilhando com você e sempre terás, através de meus olhos, que você sempre verá o meu amor sem fim.

À minha orientadora, que hoje, considero uma segunda mãe, por quem sempre terei maior apresso e carinho, Dra. Waldireny. O impacto positivo, de diversas formas, que a senhora me possibilitou é imensurável. Muito obrigado por tudo.

Ao meu irmão que, mesmo em seu silêncio, me mostrou o caminho da pesquisa através da sua caminhada. Te amo meu irmão.

Aos amigos e colegas de pesquisa, em especial, Romário Santana, que abriu suas portas e me acolheu em momento da pós-graduação que passei a levar em toda a caminhada até este momento. Ao Geilson, pelas orientações francas para melhoria da escrita foram e continuarão sendo imprescindíveis, Viviane Farias, que foi um guia para realização de atividades e como desenvolvê-las, Beatriz Pucu e Gerardo Junior, pelo auxílio nas atividades laboratoriais em um momento crítico de saúde que passei e tive vocês como apoio. Vocês são especiais para mim. Muito obrigado.

Aos colegas Júlio Nino e Maria Lucidalva pelos incentivos e orientações específicas na caminhada da pesquisa. Os conhecimentos que me repassaram foram fundamentais para meu crescimento nos estudos. Obrigado.

Ao Dr. João Vicente. Não tenho como mensurar a importância e impacto positivo de suas orientações. Foram firmes e cruciais e, por incrível que pareça, exatas para momentos em que tive imensa dificuldade no âmbito da pesquisa. Muito Obrigado.

Ao Dr. Thiago Pajéu e a Dra. Adriana Barros por ter auxiliado em momentos importantes durante a fase laboratorial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF-UFAM), pelas experiências que adquiri no campo da pesquisa científica.

Esta pesquisa foi desenvolvida sem bolsa, mas agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), por fomentar as atividades de pesquisa desenvolvidas pelo grupo de pesquisa que faço parte.

E agradeço, aos demais professores, técnicos e colaboradores do PPGCF.

RESUMO

Dentre as doenças cardiovasculares (DCV), a trombose representa 30% dos 70% dos óbitos globais e são oriundas da formação e/ou desenvolvimento de coágulos sanguíneos em veias e artérias pelo acúmulo de fibrina. As proteases com ação fibrinolítica dissolvem os coágulos mediante a ativação da plasmina. Dentre as mais variadas fontes de obtenção destas enzimas, os cogumelos comestíveis pertencentes ao gênero *Pleurotus sp.* se destacam como produtores de enzimas com potencial biotecnológico. O objetivo desse trabalho consistiu, inicialmente, em detectar e quantificar, dentre diferentes meios e métodos de cultivo, a produção de proteases fibrinolíticas, avaliar o nível de citotoxicidade dos extratos obtidos, purificar e determinar o tamanho molecular e caracterizar bioquimicamente o extrato selecionado. Para tal, quatro resíduos de frutas amazônicas, três produtos alimentares e três meios de cultivo sintéticos foram utilizados para obtenção das proteases. Em todos os substratos avaliados foi detectado a produção de proteases com ação fibrinolítica. Os meios de cultivo com maior teor de atividade fibrinolítica, foram: o resíduo borra de café – PPBB, 97,71 U/mL, o farelo de aveia - PPFA, 168,31 U/mL e o meio de cultivo sintético Extrato de Malte – PPEM, 173,20 U/mL. Em seguida, todos os extratos de *P. pulmonarius* foram submetidos a análise de toxicidade utilizando células de linhagens de fibroblastos humano (MRC-5) por 72 horas. Dentre os 10 substratos analisados, 2 substratos apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle negativo (DMSO). PPEM foi, então, liofilizado e semipurificado. Das 21 frações coletadas, a fração 1G11 apresentou maior atividade proteolítica e fibrinolítica específica. Esta fração foi então, reinjetada em sistema AKTA Avant sob as mesmas condições iniciais, obtendo um único pico ativo com 51% de recuperação de proteases e 5,94 vezes de purificação (atividade específica de 70,24 U / mL). Nas condições experimentais utilizadas, esta fração apresentou duas bandas distintas com peso molecular de 48 e 63 KDa, respectivamente, via SDS-PAGE, sugerindo fração enzimática homogênea sob condições não redutoras, apresentou atividade ótima em pH 8,0, a 50 °C, sendo classificada como metaloprotease, zinco e cálcio dependente e inibição parcial da atividade na presença de metanol, isopropanol, acetona, butanol, acetonitrila, DMSO, Triton X 100 e CTAB. A ação destes biocatalisadores foi inibida pela presença de Fe⁺². Desta forma foi possível concluir que a espécie de cogumelo comestível *P. pulmonarius* produziu proteases com ação fibrinolítica em ambos os métodos de cultivo avaliados demonstrando o potencial biotecnológico desta espécie de cogumelo na produção de proteases com ação fibrinolítica.

Palavras-chave: Trombose, resíduos, meios de cultivo, proteases.

ABSTRACT

Among cardiovascular diseases (CVD), thrombosis accounts for 30% of 70% of global deaths and is caused by the formation and/or development of blood clots in veins and arteries due to the accumulation of fibrin. Fibrinolytic proteases dissolve clots by activating plasmin. Among the most varied sources of obtaining these enzymes, edible mushrooms belonging to the genus *Pleurotus* sp. stand out as producers of enzymes with biotechnological potential. The objective of this study was initially to detect and quantify, among different culture media and methods, the production of fibrinolytic proteases, evaluate the level of cytotoxicity of the extracts obtained, purify and determine the molecular size and characterize biochemically the selected extract. For this purpose, four Amazonian fruit residues, three food products and three synthetic culture media were used to obtain the proteases. In all substrates evaluated, the production of proteases with fibrinolytic action was detected. The culture media with the highest fibrinolytic activity content were: coffee grounds residue - PPBB, 97.71 U/mL, oat bran - PPFA, 168.31 U/mL and the synthetic culture medium Malt Extract - PPEM, 173.20 U/mL. Then, all *P. pulmonarius* extracts were subjected to toxicity analysis using human fibroblast cell lines (MRC-5) for 72 hours. Among the 10 substrates analyzed, 2 substrates presented morphological alterations when compared to the negative control (DMSO). PPEM was then lyophilized and semipurified. Of the 21 fractions collected, fraction 1G11 presented the highest specific proteolytic and fibrinolytic activity. This fraction was then reinjected into the AKTA Avant system under the same initial conditions, obtaining a single active peak with 51% protease recovery and 5.94-fold purification (specific activity of 70.24 U/mL). Under the experimental conditions used, this fraction presented two distinct bands with molecular weights of 48 and 63 KDa, respectively, via SDS-PAGE, suggesting a homogeneous enzymatic fraction under non-reducing conditions. It presented optimal activity at pH 8.0, at 50 °C, and was classified as a zinc- and calcium-dependent metalloprotease, with partial inhibition of activity in the presence of methanol, isopropanol, acetone, butanol, acetonitrile, DMSO, Triton X 100, and CTAB. The action of these biocatalysts was inhibited by the presence of Fe⁺². Thus, it was possible to conclude that the edible mushroom species *P. pulmonarius* produced proteases with fibrinolytic action in both cultivation methods evaluated, demonstrating the biotechnological potential of this mushroom species in the production of proteases with fibrinolytic action.

Keywords: Thrombosis, residues, culture media, proteases.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Doenças cardiovasculares: trombose	13
2.1.1 Tratamento para a trombose	16
2.2 Cogumelos com potencial biotecnológico	18
2.3 O gênero <i>Pleurotus</i>	19
2.2.2 A espécie <i>Pleurotus pulmonarius</i>	21
2.3 As proteases	22
2.4 Meios de cultivo	23
2.5 Técnicas de isolamento e purificação de proteínas	24
3. METODOLOGIA	29
3.1 Local de realização da pesquisa	29
3.2 O Obtenobtenção do Material Biológico	29
3.3 Caracterização micro morfológicas e preservação dos fungos	29
3.4 Cultivo em meio Sólido	29
3.6 Dosagem proteica	31
3.7 Análise da atividade proteolítica	32
3.8 Determinação da atividade fibrinolítica	33
3.9.1 Precipitação da proteína	34
3.9.2 Purificação por eletroforese	35
3.9.2.1 Preparação dos géis separados e concentrados	35
3.10 Caracterização Bioquímica das Proteases Semipurificadas	36
3.10.1 Influência da temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática	36
3.10.2 Influência do pH na atividade enzimática	36
3.10.3 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica	36
3.10.4 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática	37
3.10.5 Efeito de surfactantes na atividade enzimática	37
3.1 Avaliação do potencial citotóxico <i>in vitro</i>	37
3.1.1 Cultivo celular	37
3.1.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
6.2 Análise de toxicidade dos extratos de <i>P. pulmonarius</i> via alamar blue	41
4.3 Semipurificação da proteína	43

4.4 Caracterização da fração semipurificadas de 1G11 de <i>P. pulmonarius</i>.	46
4.4.1. Efeito da temperatura e estabilidade térmica nas atividades enzimáticas	46
4.4.2. Efeito do pH nas atividades enzimáticas	47
4.4.3. Efeito de íons metálicos nas atividades enzimáticas	47
4.4.4. Efeito de inibidores nas atividades enzimáticas	48
4.4.5. Efeito de surfactantes nas atividades enzimáticas	49
4.4.6. Efeito dos solventes	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

As doenças são definidas como condições particulares anormais que afetam negativamente o organismo, estrutura e/ou função (Leônidas hegenberg, 1998). Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (2023), as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) estão entre os principais problemas de saúde pública sendo responsáveis por 70 % dos óbitos globais equivalendo, em média, a 38 milhões/ano. Dentre essas doenças, 30% são oriundas de doenças cardiovasculares (DCV) e 16% a neoplasias (Malta *et al*, 2023).

Dentre as DCV, destaca-se a trombose caracterizada pela formação ou desenvolvimento de coágulo sanguíneo (trombo) (Huang C, *et al*, 2020) decorrente da ausência de hidrólise da fibrina (Muguet *et al*, 2022) gerando inflamação das paredes dos vasos e/ou artérias (Choi *et al*, 2018).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2023), a angina de peito e o infarto do miocárdio podem ocorrer em casos de hemorragia intracerebral grave (HIC), sendo a formação de coágulos de fibrina nos vasos sanguíneos um dos principais fatores que contribuem para essas complicações (Sharma *et al.*, 2021). Os coágulos de fibrina, que constituem o principal componente de um trombo, são formados a partir do fibrinogênio, o qual é catalisado pela enzima trombina. Em condições fisiológicas normais, há um equilíbrio dinâmico entre a formação e a degradação do fibrinogênio. No entanto, quando esse equilíbrio entre os sistemas de coagulação e fibrinólise é perturbado, ocorre acúmulo de fibrinogênio, favorecendo a formação excessiva de coágulos de fibrina (Wong & Mine, 2004).

A fibrina é uma proteína presente no sangue que desempenha um papel essencial na hemostasia. Ela é formada a partir da conversão do fibrinogênio, uma proteína solúvel, em monômeros de fibrina. Esses monômeros polimerizam-se espontaneamente, originando uma rede tridimensional de gel de fibrina que contribui para a estabilização do coágulo sanguíneo (Buba *et al.*, 2018).

Atualmente, os tipos comuns de medicamentos usados para intervenção clínica incluem inibidores de agregação plaquetária (aspirina), anticoagulantes (heparina e varfarina) e agentes trombolíticos (Barzkar *et al.*, [2022](#) ; De Carlo *et al.*, [2023](#)) (Figura [1](#)). No entanto, dados clínicos revelaram que os tratamentos com esses medicamentos foram associados a um risco substancialmente aumentado de complicações, incluindo hemorragia cerebral (Christopoulou *et al.*, [2017](#) ; Dimitriadis *et al.*, [2022](#) ; Geller *et al.*, [2023](#) ; Reish *et al.*, [2023](#) ; Tanaka *et al.*, [2023](#)). Portanto, métodos mais seguros e eficazes para prevenir a formação de trombos são necessários.

No tratamento da trombose, duas abordagens principais são empregadas: o uso de agentes farmacológicos antitrombóticos — como anticoagulantes, antiplaquetários ou agentes fibrinolíticos — que atuam dissolvendo ou inibindo a formação de trombos em veias e/ou artérias; e a realização de procedimentos cirúrgicos, quando necessário (Mackman et al., 2020).

Os medicamentos trombolíticos têm se mostrado altamente eficazes, com taxas de sucesso em torno de 95% (Organização Mundial da Saúde [OMS], 2022). No entanto, seu elevado custo, o difícil acesso em algumas regiões e a ocorrência de efeitos colaterais de diferentes intensidades evidenciam a necessidade de identificar novas fontes terapêuticas, como proteases com ação fibrinolítica de origem alternativa (Audêncio et al., 2023).

Diante das limitações associadas aos agentes trombolíticos convencionais, cresce o interesse da comunidade científica na exploração de novas fontes de enzimas com potencial fibrinolítico, especialmente as de origem microbiana vegetal.

Dessa maneira, analisando a biodiversidade de fungos e sua importância para o mercado industrial, inúmeras espécies desses organismos são consideradas produtores de proteases, sendo predominantes nos processos biotecnológicos os representantes dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* e *Pleurotus* (Santana et al, 2022).

Espécies do gênero *Pleurotus* são cogumelos com valiosas fontes de nutrientes e fibras que, em diferentes condições de cultivo, produzem diversos metabólitos com alto valor econômico, baixo custo e com amplo interesse alimentício, farmacêutico e ambiental (Coelho et al, 2022).

Estudos apontam que a espécie *P. pulmonarius* produz diferentes compostos bioativos que podem ser estudadas para aplicação no tratamento de diferentes doenças (Rahman et al, 2022) que podem ser sintetizados e produzidos em escala para o manejo de diversas doenças (Okechi et al, 2024).

À medida que o modo de produção industrial de enzimas fibrinolíticas evolui, a produção de enzimas fibrinolíticas a partir de resíduos agroindustriais não renováveis tornou-se um foco mediante o valor agregado e aspecto sustentável (Yang et al., 2020) o que requer estágios de purificação e caracterização, promovendo uma visão geral sobre sua estrutura e mecanismo de ação, que está associado às suas propriedades físico-químicas e parâmetros cinéticos únicos (Ali et al, 2020).

Assim o presente trabalho foi avaliado a produção, semipurificação e caracterização bioquímica de proteases com ação fibrinolítica obtidas por extratos de *P. pulmonarius* 1958.

Com o intuito de aprofundar o desenvolvimento da pesquisa, o objetivo geral deste estudo é: Produção e caracterização de proteases fibrinolíticas obtidas por *Pleurotus pulmonarius*. Para alcançar esse objetivo, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- Produzir proteases utilizando diferentes meios de cultivo e substratos com *Pleurotus pulmonarius*;
- Determinar o teor de proteínas totais, bem como a atividade proteolítica e fibrinolítica dos extratos obtidos;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos produzidos;
- Realizar a semipurificação do extrato selecionado;
- Determinar o teor de proteínas totais, além da atividade proteolítica e fibrinolítica das frações obtidas;
- Determinar o peso molecular das proteínas por meio de SDS-PAGE a partir do extrato selecionado;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima obtida, avaliando parâmetros como pH, temperatura, íons metálicos, inibidores e solventes.
- Detectar o teor de proteínas totais, atividade proteolítica e fibrinolítica das frações obtidas;
- Determinar tamanho molecular das proteínas via SDS-PAGE do extrato selecionado;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima obtida do extrato selecionado (pH, temperatura, íons metálicos, inibidores, solventes).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doenças cardiovasculares: trombose

As doenças são definidas como condições particulares anormais que afetam negativamente o organismo e/ou estrutura ou função (Leonidas hegenberg, 1998). Dentre elas, as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são responsáveis por cerca de 70% dos óbitos globais, equivalendo a mais de 38 milhões de mortes por ano, excedendo significativamente as mortes por causas externas e por doenças

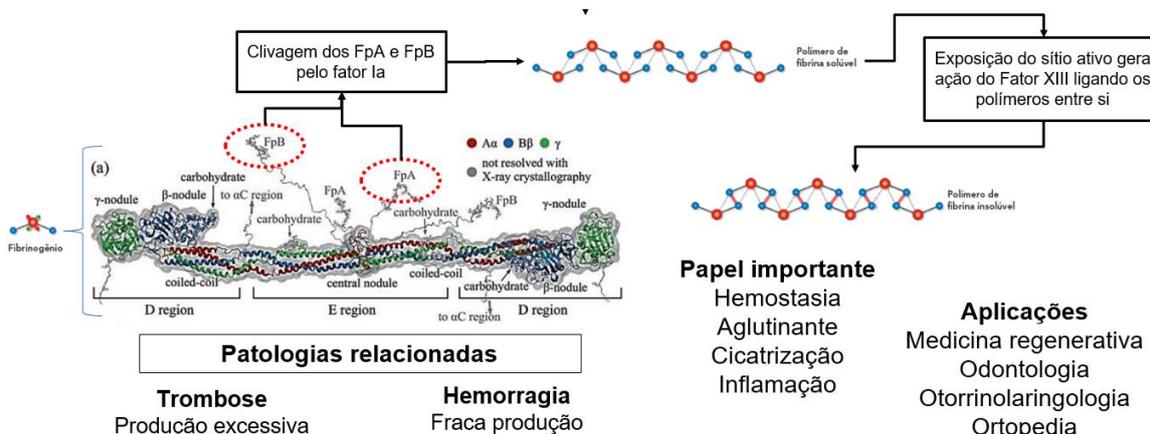
infecciosas, perda de qualidade de vida, além de impactos adversos econômicos e sociais (OMS, 2023).

Dos óbitos por DCNT, cerca de 45%, mais de 17 milhões, são causadas por doenças cardiovasculares (DCV) (Malta *et al*, 2023) e distribuição similar é observada no Brasil, onde 72% das mortes (em média, 14 milhões de brasileiros) resultam de DCNT, sendo que 30% correspondem às doenças cardiovasculares e 16% a neoplasias, comprovando que as DCV são a principal causa de morte no país (SBC, 2022). Dentre as DCV, destaca-se a trombose, caracterizada pela formação ou desenvolvimento de coágulos sanguíneos cujo componente proteico principal é a fibrina que reveste o coágulo formado, originada a partir da reação entre o fibrinogênio e a trombina no endotélio vascular, ocasionando obstrução parcial ou total do fluxo sanguíneo (Huang C, *et al*, 2020).

A fibrina contém domínios estruturais globulares expandidos em ambas as extremidades (domínios D) e um domínio estrutural central (domínio E), que são conectados por três cadeias peptídicas α -helicoidais (Figura 1). A estimulação por fatores exógenos ou endógenos leva à ativação de fatores de coagulação, após os quais a tromboplastina é convertida em trombina sob catálise de íons de cálcio (Li *et al.*, 2024).

A trombina se liga ao sítio substrato do domínio E do fibrinogênio e cliva o fibrinopeptídeo A (FpA), um peptídeo de 16 peptídeos de comprimento, do N-terminal da cadeia $A\alpha$. Ela também cliva o fibrinopeptídeo B (FpB), um peptídeo de 14 peptídeos de comprimento, do N-terminal da cadeia $B\beta$, deixando apenas o monômero de fibrina (MACRAE *et al.*, 2021). Os monômeros de fibrina formam espontaneamente fibrina insolúvel através de ligação não covalente entre os domínios estruturais D e E, enquanto as interações entre as cadeias α - α e α - γ promovem agregação lateral (MACRAE *et al.*, 2021)

Figura 1: Etapas do processo de ativação da trombina (Adaptado de Santana)



Fonte: Adaptado de Santana et al, 2022.

A geração de um multímero de fibrina estável e insolúvel somente ocorre através da ativação do fator de coagulação XIII para produzir o fator de coagulação XIIIa (uma transglutaminase que promove ligação do grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina ao grupo γ -amino de um resíduo de glutamina, formando assim, uma ligação peptídica), sob catálise de íons de cálcio, levando à formação de ligações cruzadas covalentes por meio da montagem das extremidades C-terminais antiparalelas das cadeias γ entre as moléculas de fibrina polimerizadas (Li *et al.*, 2024).

A trombose subdivide-se em dois tipos principais: em trombose arterial e trombose venosa (Quintero *et al*, 2020). A trombose arterial é composta pelo acúmulo de plaquetas agregadas e aderidas à parede da artéria danificada, particularmente na circulação coronária, enquanto que a trombose venosa acontece em vasos mais profundos localizadas nas pernas ou braços (OMS; 2023).

Uma oclusão arterial geralmente é desencadeada pela erosão ou ruptura de uma placa aterosclerótica, ou devido à embolização de um trombo no coração ou em outras artérias (Quintero *et al*, 2020). Os mecanismos que levam à ruptura da placa e aqueles que determinam a natureza e a extensão das respostas trombóticas subsequentes não são totalmente compreendidos (De filippis *et al*, 2018). Aproximadamente 80% das rupturas de placas são curadas por meio de uma resposta hemostática controlada e, não necessariamente, resultam em trombose coronária oclusiva (Quintero *et al*, 2020).

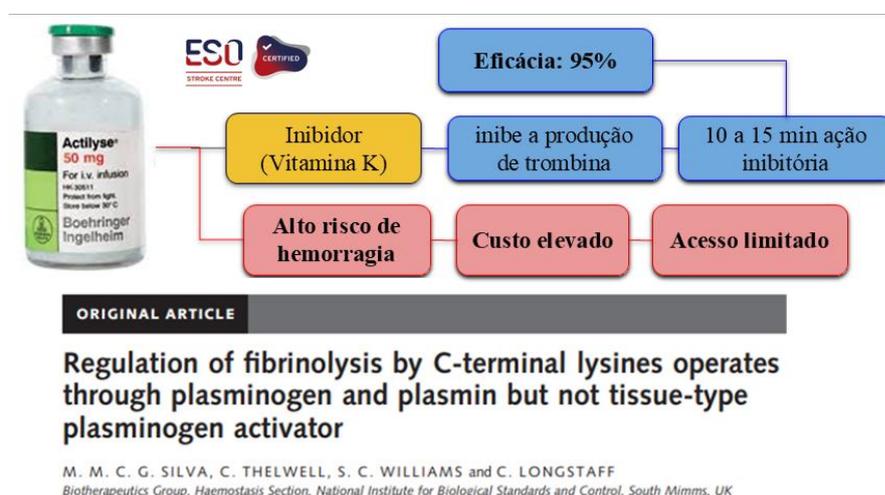
Para a formação da trombose venosa, são compreendidos dois tipos clínicos principais: ocorrência tanto numa veia profunda (TVP) quando um ou vários êmbolos são liberados na circulação venosa e se alojam na vascularização pulmonar, originando assim, uma tromboembolia pulmonar (TEP) (Cercas *et al*, 2017).

2.1.1 Tratamento para a trombose

Atualmente, pacientes com DCV recebem ativadores de plasmina, como estreptoquinase, alteplase (t-PA), anistreplase, reteplase (r-PA) e tenecteplase (TNK- t-PA), que estão disponíveis comercialmente e são trombolíticos aprovados pela *Food Drug Administration* - FDA (Hazare chimnay *et al*, 2024).

No entanto, referente a estreptoquinase e agentes trombolíticos derivados, como tratam-se de proteína derivada de uma bactéria hemolítica, é capaz de estimular a produção de anticorpos em humanos, tornando o medicamento inativo e impedindo sua readministração por, em média, seis meses após sua primeira aplicação (Hazare chimnay *et al.*, 2024).

Figura 2: Atividade enzimática e particularidades do agente fibrinolítico alteplase.



Fonte: Elaboração própria (2025).

A *European Stroke Organization* (ESO), divulgou diretrizes para o tratamento de trombose intravenosa para acidente vascular cerebral isquêmico agudo, com Alteplase, um agente trombolítico, comprovadamente eficaz no tratamento de

acidente vascular cerebral isquêmico agudo, trombose venosa profunda e outras doenças vasculares (BERGE *et al*, 2021).

Medicamentos antiplaquetários como aspirina, clopidogrel, prasugrel e ticagrelor, juntamente com inibidores de fosfodiesterase como dipiridamol e cilostazol, demonstraram papéis significativos na prevenção e tratamento de acidente vascular cerebral isquêmico e síndrome coronariana aguda (SCA) (Rothwell, p, m, 2021; liu *et al*, 2023).

O uso prolongado de AINEs está associado a vários efeitos adversos, incluindo toxicidade gastrointestinal, riscos cardiovasculares, hepatotoxicidade, toxicidade renal e hipertensão (BINDU *et al.*, 2020).

Estudos presentes na literatura propõem que a aspirina inibe a ação enzimática da cicloxigenase/prostaglandina-endoperóxido sintase (PGHS), que por sua vez impede a biossíntese da prostaglandina (PG), responsável pelos efeitos analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios (SINNIAH *et al.*, 2021).

Figura 3: Etapas da ação fisiológica dos AINES.



Fonte: elaboração própria (2025).

Os agentes fibrinolíticos podem ser administrados oralmente ou serem injetáveis. A terapia trombolítica utiliza um ativador de plasminogênio (enzima estreptoquinase) que desempenha um papel vital na dissolução de coágulos sanguíneos por muitos anos (Yousaf, S. *et al.*, 2024). Dentre os fármacos utilizados

na terapia trombolítica estão a estreptoquinase (SK), sua enzima extracelular é produzida por várias cepas de *Streptococcus* β -hemolíticas (Asada *et al.*, 2020) e a natoquinase advinda do Natto®, um alimento semelhante ao queijo feito de soja fermentada com *Bacillus subtilis* (Santana *et al.*, 2022).

O mecanismo de proteólise direta é realizado por tPA (plasminogênio tipo tecidual) e uroquinase, enquanto SK produz um complexo com plasminogênio. Portanto, SK é agora considerado agente trombolítico com alta eficiência para doenças tromboembólicas (YOUSAF, S. *et al.*, 2024). Quanto ao NK, sabe-se que não apenas degrada a fibrina direta e efetivamente, mas também aumenta a liberação de tPA com um aumento subsequente na formação de plasmina (JENSEN *et al.*, 2016). Outro estudo que investigou o mecanismo pelo qual o NK exerceu seu efeito fibrinolítico, o NK aumentou a fibrinólise por meio da clivagem e inativação do PAI-1 (CHEN *et al.*, 2018).

Apesar dos agentes fibrinolíticos serem uma boa alternativa para o tratamento da trombose, o seu alto custo produtivo e efeitos colaterais demandam a busca por novas fontes de enzimas fibrinolíticas, que possam ser usadas no tratamento trombolítico (Ali & bavisetty, 2020; Altaf *et al.*, 2021).

2.2 Cogumelos com potencial biotecnológico

Os fungos são responsáveis pela maior parte da decomposição de matéria orgânica, especialmente de celulose, hemicelulose e lignina dos vegetais, possibilitando a ciclagem de nutrientes (Oliveira *et al.*, 2022).

Os cogumelos pertencem ao reino fungi. Estima-se que possa haver cerca de 3 milhões de espécies de fungos no mundo, mas a ciência ainda conhece 10 % dessa estimativa (Oliveira *et al.*, 2022).

Basidiomycota é o segundo maior filo do reino fungi com aproximadamente 2,2 milhões de espécies, sendo 150.000 espécies descritas das quais 40.000 são basidiomicetos (Ghobad-nejhad *et al.*, 2023).

Estudos presentes na literatura relatam diversos compostos bioativos provenientes dos basidiomicetos (alcalóides, carotenóides, enzimas, lipídios, fenólicos, terpenos) (SK *et al.*, 2021) sendo utilizados para o tratamento de várias

doenças, incluindo resfriados, tosse, asma, câncer, problemas estomacais e hepáticos (Motta *et al.*, 2021) mediante a presença atividade antiinflamatória, antidiabética, antitumoral, imunomoduladora e antimicrobiana (Hamza *et al.*, 2023).

A China é o principal produtor, consumidor e exportador de cogumelos em todo o mundo, seguida pelo Japão, Estados Unidos, Holanda, Polónia, Espanha, França, Itália, Irlanda, Canadá e Reino Unido (Hamza *et al.*, 2023).

De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a participação da produção global da China aumentou de 70% em 2008 para 93% em 2021 (Figura. 4).

Figura 4: Participação na produção (%) de cogumelos e trufas por país ao redor do mundo.



Fonte: Elaborado pelo autor, com base em AFAOSTAT (2021).

Em relação a biodiversidade e sua importância industrial, inúmeras espécies são consideradas produtores de proteases, contudo predominam nos processos biotecnológicos os representantes do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* e *Pleurotus* (Santana *et al.*, 2022).

2.3 O gênero *Pleurotus*

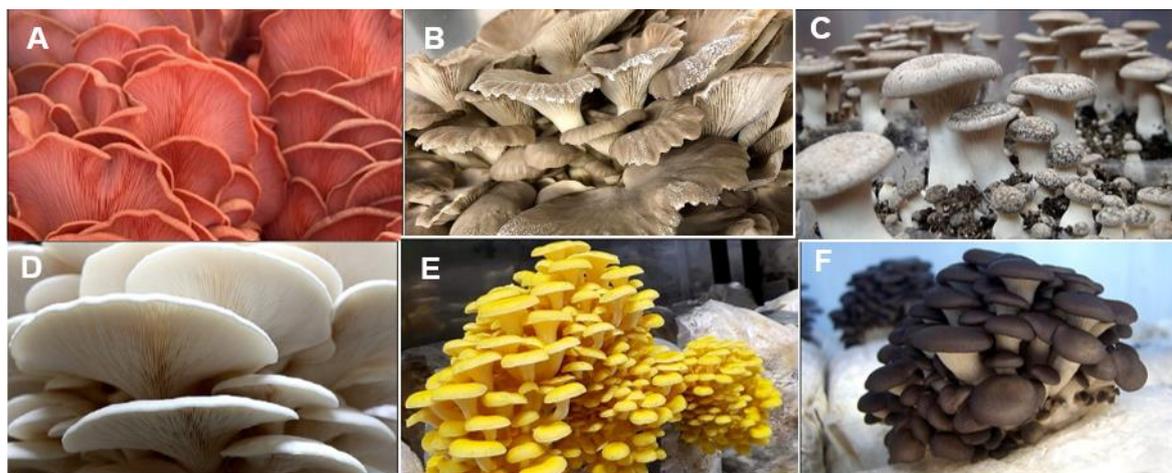
O gênero *Pleurotus* (Basidiomycota, *Pleurotaceae*), conhecido como “cogumelo-ostra” devido à semelhança ao seu corpo frutífero ser semelhante a uma concha, sendo a sua forma de distinção pela sua cor que varia entre azul escuro,

branco, creme a marrom, amarelo e rosa, sendo a maioria saprófita (Rahman *et al.* 2021).

Seu píleo chegando a 150 mm de diâmetro, orbicular (em forma de círculo), semicircular a flabeliforme (forma de leque) ou em forma de funil, carnoso a fibroso, branco ou com cores pálidas (rosa, amarelo, marrom e cinza). Superfície fértil com lamelas brancas ou creme, poucas a numerosas, arqueadas, estreitas, geralmente decorrentes, estirpe ausente, ou lateral, às vezes excêntrico a lateral, curto, cilíndrico, sólido, liso, escamoso ou flocoso (Oliveira *et al.*, 2022) (Figura 5).

Esporos cilíndricos, ovóides ou elipsoides (duas elipses em simetria), hialinos (transparente), inamiloides (sem fibrila proteica), lisos, com parede fina. Superfície do píleo em forma de cútis de hifas. Sistema contendo um ou dois tipos de hifas (Oliveira *et al.*, 2022) (Figura 5).

Figura 5: Algumas espécies do gênero *Pleurotus*: *P. djamor* (A), *P. pulmonarius* (B), *P. eryngii* (C), *P. ostreatus* (D), *P. citrinopileatus* (E) e *P. columbinus* (F).



Fonte: <https://www.fungicultura.com.br/>, 2025

Mais de 1.000 espécies deste gênero são descritas no mundo, entretanto, aproximadamente 50 destas são reconhecidas e cerca de 15 espécies de *Pleurotus* são ocorrentes no Brasil (Santana *et al.*, 2022). São predominantes em florestas temperadas; no entanto, algumas espécies são encontradas em florestas tropicais (Rahman *et al.*, 2021).

Estudos apontam que *Pleurotus sp.* contêm proteínas completas com boa distribuição de aminoácidos essenciais, além de aminoácidos não essenciais como o

ácido gama-aminobutírico (GABA), que atuam como neurotransmissores, e ornitina que é precursora na síntese de arginina, além de conter quantidades variáveis de polissacarídeos que demonstraram ter múltiplos benefícios para a saúde humana, tais como atividade antiviral, antioxidante e bactericida, e propriedades medicinais para terapia tumoral e doenças cardiovasculares, e também são considerados uma fonte potencial de prebióticos (Diamantopoulou *et al.*, 2023).

Estudos na literatura apontam que espécies de *Pleurotus* são utilizadas como alimento funcional por não conter colesterol, conter baixo teor calórico, baixo teor de gordura, carboidratos e sódio (Okechi *et al.*, 2024), possuem valiosas fontes de nutrientes e fibras, produzem variedade de metabólitos atuando na degradação de diversas substâncias e apresentam benefícios farmacológicos contra doenças cardiovasculares e atividade antioxidante (Rahman *et al.*, 2022).

Dentre as espécies mais conhecidas e que possuem um valor econômico considerável, estão o *P. djamor*, *P. citrinopileatus*, *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *P. cistidiosus*, *P. columbinus*, *P. cornucopiae* e *P. pulmonarius* (Bellettini *et al.*, 2019).

2.2.2 A espécie *Pleurotus pulmonarius*

A espécie *P. pulmonarius* pertence à família *Pleurotaceae*, é facilmente cultivado em vários materiais lignocelulósicos, incluindo resíduos agrícolas, papel e serragem (Okechi *et al.*, 2024). Seus corpos frutíferos caracterizam-se por um sabor suave e um ligeiro aroma a anis (Akyuz *et al.*, 2023). Possui textura distinta, crocante e um perfil de sabor umami (Zhang *et al.*, 2019), rico em nutrientes essenciais, como proteínas, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais (Wu *et al.*, 2019), além de conter variedade de compostos bioativos, incluindo polissacarídeos fúngico, ergosterol e ácido γ -aminobutírico (GABA) (Wang *et al.*, 2022).

Seu consumo tem sido associado a uma ampla gama de benefícios à saúde, incluindo compostos como polissacarídeos, polifenóis, terpenóides e lectinas, conferindo potenciais vantagens à saúde, como propriedades antioxidantes, imunomoduladoras, antivirais e anticancerígenas (Aditya *et al.*, 2023; Garcia *et al.*, 2022).

2.3 As proteases

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas em fragmentos de proteínas (Bakratsas *et al.*, 2021). Elas têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, participando de vias metabólicas e de vias de sinalização celular (Aruna *et al.*, 2023). Adicionalmente, muitos microrganismos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para a multiplicação celular (Teulte-paredes *et al.*, 2024).

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), as proteases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases e a subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases) (Hasan *et al.*, 2022).

As Peptidases, com base no seu mecanismo de ação, podem ser classificadas em: exopeptidases, quando a enzima atua próximo ou no final da cadeia polipeptídica, isto é, nas partes carboxila ou amino-terminais e, endopeptidases (EC 3.4.21-99), quando clivam as ligações peptídicas internas que compõem a cadeia peptídica (Ashraf *et al.*, 2023).

As exopeptidases ainda podem ser subdivididas com base no local de clivagem: as carboxipeptidases agem no terminal C, enquanto as aminopeptidases agem no terminal N, enquanto que as endopeptidases são classificadas a partir do grupo funcional presente no sítio ativo, podendo ser: protease de serina, protease de ácido aspártico, proteases de cisteína e metaloprotease (Hasan *et al.*, 2022).

Estimava-se que o mercado global de enzimas aumentasse de US\$ 15,9 bilhões (2008) para 22,4 bilhões, como taxa de crescimento 7% ao ano (Mordor intelligence, 2022). Porém, em nova pesquisa, espera-se que esse mercado cresça de US\$ 1,83 trilhão no ano atual e registre uma taxa de crescimento anual (*Compound Annual Growth Rate – CAGR*) de 6,7% nos próximos cinco anos tendo como principal mercado o setor Ásia-Pacífico (Mordor intelligence, 2022).

No campo médico, estudos relatam que enzimas fibrinolíticas tem aplicação como medicamento na terapia trombolítica (Jaouadi *et al.*, 2012) pois agem como biocatalizadores degradando coágulos de fibrina, prospectando assim, importante papel na indústria farmacêutica como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares (CHO *et al.*, 2004; DAS; PRASAD, 2010).

Diversos estudos demonstraram a diversidade de microrganismos como fonte de proteases fibrinolíticas, identificados e estudadas, nos quais são incluídos: insetos, poliquetas, veneno de serpentes e cogumelos comestíveis ou medicinais (BUBA; 2018).

2.4 Meios de cultivo

Os meios de cultivo são responsáveis pela produção dos mais variados produtos utilizados pelas indústrias de alimentos, farmacêutica, química, agroindústria e são compostos por uma série de etapas que devem ser avaliadas de forma conjunta para obtenção de metabólitos com alto rendimento e produtividade (Spoti *et al.*, 2023).

Os principais componentes e etapas do processo de cultivo são: a seleção do microrganismo responsável pela transformação, degradação ou síntese de produtos, o meio de cultivo fornecido às células microbianas e seus tratamentos, os sistemas de condução do processo fermentativo e os processos de recuperação e purificação de produtos (Chen *et al.*, 2020).

São métodos de cultivo de microrganismos subdividem-se em dois: O cultivo submerso (CS) e o cultivo em estado sólido (CES) (Santana *et al.*, 2022). O CS se desenvolve em maior quantidade de água e todos os nutrientes são dissolvidos ou em suspensão no meio de cultivo ou as células microbianas se desenvolvem no interior do meio de fermentação líquida utilizado (Santana *et al.*, 2022) enquanto que no CES, as células microbianas se desenvolvem e produzem metabólitos de interesse na superfície ou no interior de partículas de uma matriz sólida na ausência de água livre (Chilakamarry *et al.*, 2022).

O CS é o método tradicional de produção enzimática que utiliza caldo líquido com alta concentração de nutrientes e oxigênio necessários para o cultivo de microrganismos permitindo maior eficácia no controle de variáveis de processo como:

pH, temperatura, espuma, aeração e reduzindo problemas de transferência de calor e massa e dispondo de fornecimento de ar ou oxigênio para a população microbiana em desenvolvimento (Thakur *et al.*, 2023).

O CES oferece perspectivas interessantes e está fortemente ligada ao conceito de desperdício para riqueza por ser sugerida como um método potencial de reciclagem de resíduos utilizando resíduos sólidos como substratos com microrganismos para convertê-los em produtos de valor agregado (Banat *et al.*, 2021).

Uma ampla variedade de produtos fermentados é produzida em todo o mundo sendo que muitos deles caracterizados pela utilização de matéria-prima local e processos regionais, o que possibilita agregar valor em razão da certificação de origem (Banat *et al.*, 2021).

Uma etapa importante do cultivo de microrganismos é o tratamento térmico do substrato, por pasteurização ou autoclavação, a fim de prevenir contra microrganismos competitivos (CHEN *et al.*, 2020).

A seleção de um substrato, microrganismos e condições de processo influenciam a produção enzimática desejada pois o teor de água necessário no cultivo é absorvido pelo substrato em uma matriz sólida e oferece mais vantagens para o crescimento de microrganismos para a transferência de oxigênio (ŠELO *et al.*, 2021).

Os substratos utilizados para obtenção de proteases por diferentes formas de cultivo podem ser categorizados em dois: aqueles utilizados como materiais principais (fonte de lignocelulose) e aqueles utilizados como materiais suplementares (fontes de nitrogênio e minerais) (CHEN *et al.*, 2020).

Estudo presentes na literatura demonstram que a composição do substrato e a adição de suplementos têm impacto na eficiência biológica dos cogumelos resulta em aumento do rendimento produtivo (Okechi *et al.*, 2024).

2.5 Técnicas de isolamento e purificação de proteínas

O isolamento de biomoléculas a partir de microrganismos, geralmente, se inicia com a obtenção de líquidos contendo metabólitos utilizando diversas soluções, onde serão extraídos os compostos de maior afinidade com o solvente (Rocha *et al.*, 2018).

As proteínas constituem uma classe de moléculas e, como tal, apresentam várias propriedades em comum, o que permite sua separação de outras moléculas advindos do mesmo meio reacional sendo, portanto, imprescindível o conhecimento de tais características para a utilização de métodos de separação e purificação para, posteriormente, quantificar e/ou qualificar produtos biotecnológicos obtidos de sistemas fermentativos viabilizando o isolamento de uma molécula-alvo de maior valor agregado (COSKUN *et al.*, 2016).

A purificação de produtos biotecnológicos produzidos por células microbianas constitui uma etapa complexa do processo dadas as variadas características dos meios e das biomoléculas de interesse como: ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, aminoácidos, peptídeos e proteínas (Jamal *et al.*, 2024).

O processo de purificação de proteínas pode ser dividido em quatro etapas: separação de células e seus fragmentos do meio de cultivo (clarificação), concentração, purificação, e operações para acondicionamento final do produto (Pessoa *et al.*, 2005).

A secagem, a cristalização, a precipitação e a liofilização compreendem processos que visam a estabilização e a redução do volume, para o acondicionamento dos metabólitos em estudo (Pastore *et al.*, 2013).

O processo de precipitação, muito utilizada na indústria como etapa inicial do processo de purificação, atua na separação e recuperação de proteínas solúveis, mediante a utilização de substâncias que possam interagir com as ligações de hidrogênio promovendo concentração das mesmas e, conseqüentemente, diminuindo o volume da amostra (Rocha *et al.*, 2018).

As vantagens da aplicação da precipitação para concentração e purificação de proteínas, ácidos nucleicos e pequenos metabólitos são: a facilidade de operação adaptadas para grandes escalas, o uso de processo contínuo, equipamentos relativamente simples, grande número de precipitantes que podem ser utilizados, com baixo custo ou usados em pequenas concentrações (Scopes., 1993).

A liofilização é definida como processo de secagem de extrato ou produto devidamente congelado em que maior parte de água é removida por sublimação

(Bhatta *et al.*, 2020). É extremamente útil para a conservação de materiais biológicos, microrganismos e medicamentos (Bornbush *et al.*, 2024).

Existem produtos cuja aplicação não requer elevado grau de pureza, de modo que operações cromatográficas não são necessárias e, por vezes, a simples concentração do meio é suficiente para a comercialização e o uso (Shanu *et al.*, 2024). Porém, existem outros, como os produtos farmacêuticos (diagnósticos e terapêuticos), que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade é o custo do processo de fabricação, o qual pode chegar a 80 % do custo final do produto (Omrani *et al.*, 2024).

O método de extração aquosa se baseia na utilização de água como meio de extração, permitindo a entrada de óleos e proteínas na solução e separando-os por centrifugação (LIU *et al.*, 2024). Este método evita a necessidade de solventes orgânicos e reduz a destruição de proteínas, mas tem as desvantagens de baixas taxas de desengorduramento e tendência de contaminar microrganismos durante o processo de extração (Liu *et al.*, 2024).

Uma das características mais marcantes das proteínas é seu elevado tamanho, tornando possível, aplicação de métodos para separação de proteínas de moléculas menores bem como de métodos de separação de misturas proteicas de tamanhos distintos (Barros *et al.*, 2024).

Um dos métodos mais úteis e eficazes para separação de proteínas é a cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel, cromatografia de peneira molecular ou simplesmente cromatografia em gel (Striegel, 2022). Seu princípio básico é a partição das moléculas, em virtude das diferenças de tamanho entre um solvente (fase móvel) e uma fase estacionária de porosidade definida (DA Silva *et al.*, 2021).

No fracionamento de alta resolução, a amostra é separada de acordo com as diferenças em sua massa molar, podendo ser empregada para isolar um ou mais componentes, para separar monômeros de agregados, para determinar a massa molar ou para efetuar uma análise de distribuição de massas molares (Silva *et al.*, 2019).

A cromatografia por exclusão permite também separar as proteínas de acordo com sua massa molar, ou tamanho de proteínas nativas ou desnaturadas, em condições variadas de pH, temperatura e força iônica (Ellegreen *et al.*, 1989). Para tal, faz-se necessário a utilização de coluna contendo *Sephacryl*®, *Sephadex*® ou *Sepharose*®, calibrada com uma série de padrões proteicos, que podem ser adquiridos em conjunto para cada intervalo de massa molar desejado ou preparado no laboratório a partir de proteínas isoladas (Fisher *et al.*, 1969).

O *Sephadex*® é um material muito estável quimicamente, apesar de conter ligações glicosídicas suscetíveis ao ataque ácido (Ellegreen *et al.*, 1989). Os diferentes tipos são caracterizados pela letra G, seguida de um número que representa o volume de água, absorvidos por 1 g do gel x 10 (AKTA, AVANT; 2015). Diferentes diâmetros de partícula para cada G-número referem-se à partícula seca. Para o diâmetro de partícula entumescida, devem - se levar em conta outros fatores como, por exemplo, para fracionamento de peptídeos e separações de proteínas com massa molar acima de 10000, é indicada a utilização de géis que absorvam entre 7,5 a 20 g de água, ou seja, entre *Sephadex G-75* e *Sephadex G-200* e, para fracionamento de peptídeos e separações de grupo, como dessalificação, devem-se usar *Sephadex G-10* ou *Sephadex G-50* (Fisher *et al.*, 1969).

Quanto a fase móvel, vários tampões de pH e força iônica moderada podem ser utilizados em cromatografia de permeação em gel levando em consideração a natureza e da compatibilidade das proteínas em interesse (PASTORE *et al.*, 2013).

O material eluído na cromatografia pode ser detectado por propriedade do soluto tanto existentes como desenvolvidas pela absorvância, condutividade, índice de refração, fluorescência, etc (Carol, H *et al.*, 2006).

A separação entre a molécula-alvo e os demais compostos presentes na solução, dado pelos valores adimensionais da resolução cromatográfica, leva em consideração o tempo e o volume de retenção e a largura de picos (PASTORE *et al.*, 2013).

As medidas podem ser dadas em frações coletadas, podem ser calibradas em termos de volume e tempo, em que o eluente da coluna é mecanicamente

encaminhado aos detectores que determinam a substância de acordo com seu princípio e registram o resultado em curvas ou em números que possam ser manipulados (Carol, H *et al.*, 2006).

O AKTA avant é um sistema de cromatografia líquida específico para o desenvolvimento do método e do processo na purificação de biomoléculas utilizado para projetar a escolha otimizada de parâmetros de execução, meios e colunas para purificação de determinadas proteínas (AKTA, AVANT; 2015).

Os parâmetros (pH e temperatura ótimas) são fatores preponderantes a serem observados para verificar se a composição do substrato influencia na produtividade do cogumelo através do monitoramento da sua eficiência biológica (OKECHI *et al.*, 2024).

A análise eletroforética das proteínas se resume em fracioná-las, reconhecê-las e determinar a quantidade de cada proteína fracionada (Marakova *et al.*, 2023). Essas duas etapas, separação qualitativa e determinação quantitativa, são efetuadas após a coloração das proteínas com corante específico que as destacam nitidamente além da presença de marcadores moleculares que auxiliam na determinação do tamanho molecular em estudo (Othman *et al.*, 2022).

Fatores nutricionais como fonte de carbono e nitrogênio, juntamente com outros fatores como pH, temperatura, tempo de incubação e umidade, são conhecidos por influenciar a produção de enzimas (Brugnari *et al.*, 2021).

Durante a proteólise, subprodutos ricos em nitrogênio são liberados, causando um aumento no pH do meio (Korniłowicz-Kowalska e Bohacz., 2011). As proteases podem ser classificadas, com base em seu pH ótimo, em proteases ácidas, neutras e alcalinas. Estudos com proteases fúngicas relataram melhor desempenho dessas enzimas em pH básicos (Sampaio e Silva *et al.*, 2011; Schlander *et al.*, 2016).

A caracterização das enzimas produzidas, em especial, quando destinadas à indústria farmacêutica, é essencial. Para tal, a atividade enzimática do seu estado nativo é submetido a exposição aos mais variados agentes físicos e químicos podendo desnaturá-los e, conseqüentemente, inibir totalmente sua ação (CARDOSO *et al.*, 2022).

3. METODOLOGIA

3.1 Local de realização da pesquisa

Este trabalho é de caráter experimental e foi realizado nos Laboratório de Química orgânica e Cromatografia, Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) e Centro de apoio multidisciplinar (CAM) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

3.2 O Obtenobtenção do Material Biológico

A espécie *P. pulmonarius* havia sido anteriormente e deposita na coleção de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o número 1958 pela Dra. Maria Aparecida de Jesus e foi cedida para a realização desta pesquisa.

3.3 Caracterização micro morfológicas e preservação dos fungos

Foi realizado através de microscópio óptico, baseando-se em características fenotípicas já descritas na literatura (Hanlin, 1990; Rossman *et al.* 1987; Sneh *et al.*,1991; SUTTON *et al.*, 1980; Toussoun; Nelson, 1976).

3.4 Cultivo em meio Sólido

Para crescimento de *P. pulmonarius* foram utilizados três tipos de meios de cultivo: os resíduos agroindustriais não renováveis, sendo eles: casca do fruto de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) - PPCT, casca do fruto de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) - PPCC, borra de café (*Coffea arabica*) - PPBC, bagaço de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) – PPBCA; Os Produtos alimentícios: arroz branco tipo agulha - PPAR, farinha de milho – PPFT, aveia em flocos grossos – PPAV; Três meios sintéticos: caldo de Malte - PPEM, extrato de levedura e sacarose YES – PPEY e meio de cultura extrato de levedura e malte YMA - PPYM. Cada meio de cultivo foi utilizado siglas contendo, respectivamente, as iniciais do nome do substrato e as iniciais do nome do microrganismo.

Figura 6: Meios de cultivo utilizados para produção de metabólitos por *Pleurotus pulmonarius*.



11

Fonte: Elaboração própria (2025).

. Os resíduos agroindustriais foram, primeiramente, submetidos a lavagem em água corrente e posteriormente desidratados em estufa a 60 °C durante 3 dias. Após isso, foram triturados em liquidificador. Em seguida, 200 g de cada resíduo e cada produto alimentício foram adicionados em Erlenmeyers de 500 mL previamente esterilizados e umedecidos com 200 mL de água destilada. Por fim, todos os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave três vezes seguidas a 121 °C por 30 minutos, com intervalos de 15 minutos entre esterilizações, salvo os três meios de cultivo sintéticos utilizados (caldo de Malte - PPEM, extrato de levedura e sacarose YES – PPEY e meio de cultura extrato de levedura e malte YMA – PPYM) que foram submetidos a esterilização, juntamente com os demais, apenas na terceira autoclavagem.

Figura 7: Fluxograma da metodologia de inoculação de *P. pulmonarius* em diferentes meios de cultivo.



Fonte: Adaptado de Santana *et al.*, (2023).

Logo após os meios de cultivo atingirem temperatura ambiente (28 °C), 07 discos miceliais ($\varnothing = 8$ mm) foram inoculados em cada recipiente e armazenados em sala escura, a 25-30 °C durante 25 dias. Ressalta-se que, antes da inoculação, *P.pulmonarius* foi repicado em placas contendo meio BDA e mantidos em estufa a 25°C, por sete dias. Após este tempo, em cada Erlenmeyer, foram adicionados 50 mL de água destilada, submetidos a processo de cavitação utilizando banho ultrassônico por 20 minutos a 200 RPM. Passado este tempo, os meios de cultivo foram submetidos a filtração à vácuo. O filtrado foram então, armazenados em frascos previamente esterilizados e mantidos – 4 °C.

3.6 Dosagem proteica

A concentração relativa de proteínas dos extratos obtidos foi estimada pelo método de Bradford (1976), onde BSA (albumina sérica bovina) atuou como padrão azul brilhante de Coomassie G-250. 2,5 mL da solução de Bradford, previamente preparada, foi adicionado em frascos juntamente com 100 μ L de cada amostra, submetidos a agitação e, posteriormente, incubados por 2 minutos a temperatura ambiente. Os testes foram realizados em triplicata e lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm, conforme ilustrado na figura 8.

Figura 8: Fluxograma da metodologia de proteínas totais.

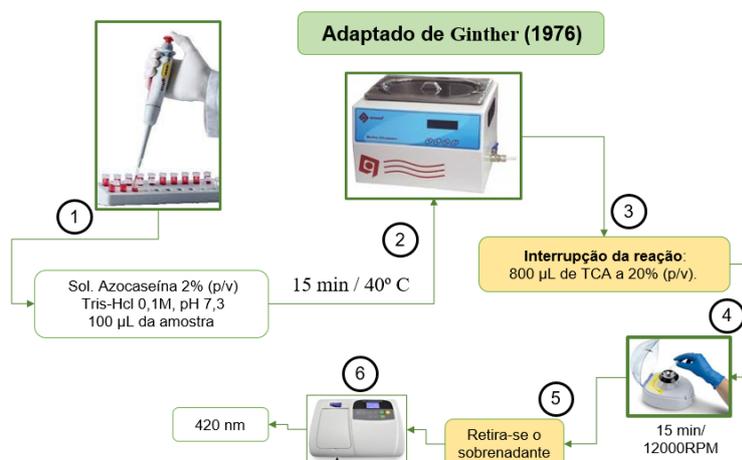


Fonte: Elaboração própria (2025).

3.7 Análise da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada através do método descrito por Ginther (1979). Em microtubos de 2 mL, foram adicionados 200 µL de solução tampão de azocaseína Tris-Hcl 0,1M. Para obtenção do equilíbrio térmico da solução obtida, incubou-se a mesma em banho-maria de 1 a 2 minutos a 40°C. Posteriormente, adicionaram-se 100 µL do analito em temperatura ambiente. Após essa adição, foi incubado novamente em banho-maria durante 15 minutos a 40 °C. Ressalta-se que tanto as amostras quanto o branco foram incubados. Passado este tempo, interrompeu-se a reação pela adição de 800 µL de TCA a 20 % (p/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 RPM por 15 minutos. O sobrenadante das amostras e do branco foram retirados e lidos em 420 nm através de espectrofotômetro (figura 9).

Figura 9: Fluxograma da determinação da atividade proteolítica.



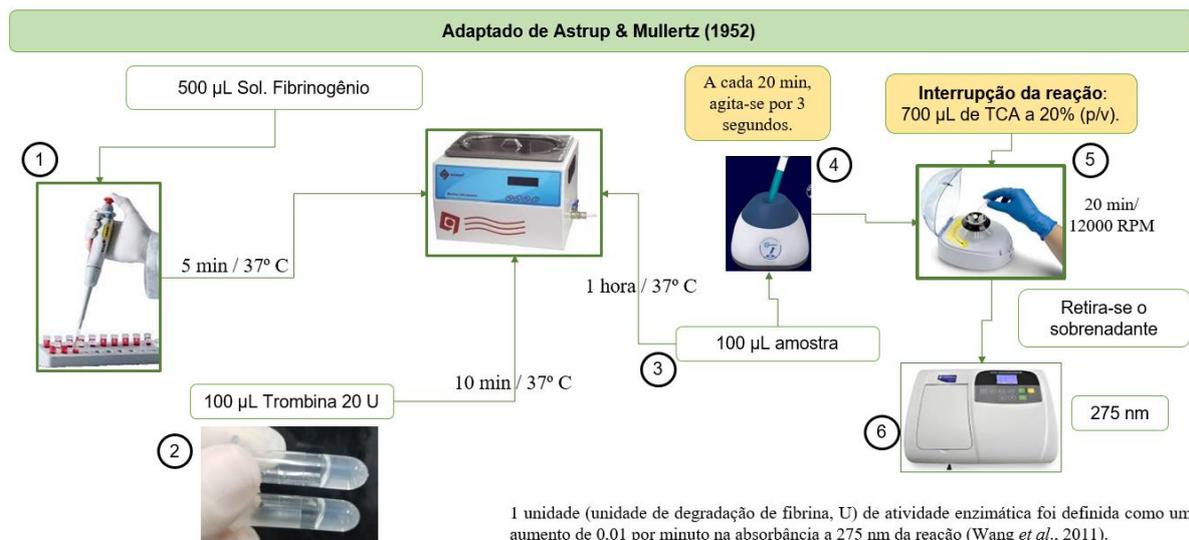
Fonte: Elaboração própria (2025).

3.8 Determinação da atividade fibrinolítica

Uma alíquota de 500 µL da solução de fibrinogênio previamente preparada foi incubada em banho-maria por 5 min a 37°C. Em seguida, cada amostra foi solubilizada com 100 µL de trombina 20U e incubada em banho-maria por 10 min a 37°C. Após este tempo, foram adicionados 100 µL da amostra e novamente incubadas em banho-maria durante uma hora a 37 °C. Ressalta-se que, a cada 20 minutos, as amostras foram agitadas em vórtex por 3 segundos e retornadas à incubação. Finalizada essa etapa, a reação foi interrompida com adição de 700 µL de solução de TCA 0,2 M. Os analitos foram centrifugados a 12000 RPM por 20 minutos. Por fim, as amostras e o branco foram retirados e lidos em 275 nm através de espectrofotômetro.

Neste ensaio, 1 unidade (unidade de degradação de fibrina, U) de atividade enzimática foi definida como um aumento de 0,01 por minuto na absorbância a 275 nm da reação.

Figura 10: Fluxograma da determinação da atividade fibrinolítica.



Fonte: Elaboração própria (2025).

3.9 Purificação da proteína

3.9.1 Precipitação da proteína

O processo de purificação foi iniciado com resuspensão de 2 g (alíquota) do extrato PPEM liofilizado em 50 mL de água destilada previamente esterilizada, centrifugado a 16.000 RPM por 10 min. Em seguida, do sobrenadante foram retirados 150 µL e solubilizados com 300 µL de solução tampão Tris-HCl pH 8,0 (atuou como fase móvel no decorrer da corrida cromatográfica) e filtrado usando Filtro PES de seringa de 0,22 microns. Em seguida, 150 µL da amostra foi injetada em sistema ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em *Superdex G-75* (HR10 / 300 g/L). Todo o processo foi monitorado com espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 275 nm e atividade proteolítica. Foram coletadas 18 frações de 1 mL em fluxo de 0,5 mL/ min. As frações coletadas foram, então, submetidas a determinação de proteínas totais, atividades proteolítica e fibrinolítica.

Por fim, a fração que apresentou maior teor de protease com ação fibrinolítica foi liofilizada e uma alíquota de 100 mg foi solubilizada em 1 mL de água ultra pura e 50 µL de solução tampão Tris-HCl pH 8,0, filtrado usando Filtro PES-filtros de seringa de 0,22 microns. Após filtração, 100 µL da fração foi injetada em sistema ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em *Superdex G-75* (HR10 / 300GL) e monitorado

com espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 275 nm e atividade proteolítica.

Figura 11: Fluxograma da metodologia de precipitação/semipurificação da proteína.



Fonte: Elaboração própria (2025).

3.9.2 Purificação por eletroforese

A detecção das bandas polipeptídicas foi realizada utilizando método SDS-PAGE adaptado de Laemmli (1970). Inicialmente, foram preparadas 10 % de gel de resolução e 5 % de empilhamento de gel, sob condições não redutoras. Como marcador molecular, foi utilizado *blueEye prestained protein marker* (ps-104; jena bioscience). A coloração para detecção de proteínas no gel, foi realizada com solução de negro de amido a 1 % (p/v) e ácido acético a 10 % (v/v) para a descoloração. Por fim, foi realizada leitura das bandas polipeptídicas obtidas através de scanner.

3.9.2.1 Preparação dos géis separados e concentrados

O método de Harlow e Lane (1988), com algumas modificações, foi utilizado para preparação de 5 mL do gel separador e 2 mL do gel concentrador. Para o gel separador, foram adicionados em tubo Falcon 1,9 mL de H₂O ultrapura, 1,7 mL de solução de acrilamida mix a 30 %, 1,3 mL de solução Tris - pH 8,8 - 1,5 M, 0,05 mL de solução SDS 10 %, 0,05 mL de solução de persulfato de amônio a 10 % e 0,002 mL de solução TEMED. Para preparação do gel concentrador, foram adicionados em microtubo 1,4 mL de água ultrapura, 0,13 mL de solução de acrilamida mix a 30 %, 0,13 mL de solução Tris - pH 8,8 - 1,5 M, 0,05 mL de solução SDS 10 %, 0,05 mL de solução de persulfato de amônio a 10 % e 0,002 mL de solução TEMED.

0,25 mL de solução Tris, pH 6,8, 0,02 mL de solução SDS 10 %, 0,02 mL de solução de persulfato de amônio a 10 % e, por fim, 0,002 mL de solução TEMED. (1962). Os géis foram adicionados em duas placas de vidro (8 x 8 cm x 1,5 mm) lavadas, desengorduradas e seladas.

3.10 Caracterização Bioquímica das Proteases Semipurificadas

3.10.1 Influência da temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática

Para avaliação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada em 25 °C, utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. Todos os sistemas de reação e o branco foram incubados por uma hora, na ausência de luz e, em seguida, foi determinada a atividade proteolítica, conforme o item 4.7 (Martim *et al.*, 2017).

3.10.2 Influência do pH na atividade enzimática

Nos testes de avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25 °C por 1 hora. No ensaio de estabilidade à temperatura, os extratos foram mantidos em temperaturas de 30 a 80 °C por 1 hora. Após este período, as amostras foram incubadas em azocaseína 1% (p/v) durante 60 minutos, na ausência de luz, nas condições ótimas de temperatura e pH. Os resultados foram expressos como atividade relativa em todos os experimentos (Martim *et al.*, 2017) e submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o software Minitab, versão 19.0.

3.10.3 Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica

Para avaliação do efeito de inibidores na atividade proteolítica, foram utilizadas as seguintes substâncias 1mM: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), β -mercaptoetanol, fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF) e pepstatina. O efeito dos íons metálicos foi determinado as seguintes soluções 1mM: sulfato ferroso (FeSO_4), sulfato de manganês (MnSO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), cloreto de sódio (NaCl), sulfato de zinco (ZnSO_4), cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl_2) e sulfato de cobre (CuSO_4). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura.

A atividade enzimática residual foi comparada com o controle, incubado sem os inibidores ou íons metálicos e correspondeu a 100 % de atividade (Martim *et al.*, 2017). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Por fim, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o software Minitab, versão 19.0.

3.10.4 Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática

Para avaliar o efeito de solventes orgânicos, a enzima foi incubada em concentração de 1:1 com os solventes: Metanol, Isopropanol, Acetona, Butanol, Sulfóxido de Dimetilo (DMSO) previamente diluídos em concentração de 20 %. A incubação foi realizada em temperatura ambiente, durante 10 minutos. Em seguida, a atividade residual foi dosada de acordo com as condições de ensaio descrito no item 4.7. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle (100 %) sem adição de solvente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Por fim, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o software Minitab, versão 19.0.

3.10.5 Efeito de surfactantes na atividade enzimática

Para avaliar o efeito de surfactantes na atividade proteolítica foi analisado com a presença de Tween 60, Polietileno glicol (PEG), Triton X 100, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 1,4 Diotritol (DTT) e Bromido Centrimônio (CTAB). Todos os surfactantes foram previamente diluídos a 20 %. A enzima foi incubada com concentração de 1:1 dos surfactantes durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente a atividade residual foi dosada conforme descrito no item 4.7. Os resultados foram expressos em atividade relativa, sendo o controle (100 %) sem adição de solvente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Por fim, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o software Minitab, versão 19.0.

3.1 Avaliação do potencial citotóxico *in vitro*

3.1.1 Cultivo celular

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram mantidas em garrafas de polipropileno, contendo meio Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco by Life Technologies) e 50

$\mu\text{g/mL}$ de penicilina/estreptomicina (Gibco by Life Technologies), em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO_2 . O crescimento celular foi acompanhado diariamente com auxílio de microscópio ótico invertido e a troca do meio de cultivo ocorreu sempre que o limite de confluência das células fosse alcançado, ou houvesse necessidade de repor nutrientes. Para a manutenção das linhagens, foi utilizada solução de tripsina EDTA a 0,25% (Gibco by Life Technologies) para destacar as células das garrafas de cultura.

3.1.2 Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue®

O ensaio de Alamar Blue® foi realizado segundo metodologia descrita por Ahmed e seus colaboradores (1994). As células foram semeadas na concentração de 5×10^4 células/poço em microplacas de 96 poços. A fim de determinar os valores CI50 (índice de citotoxicidade que causa morte celular de 50%), as células foram tratadas com a CNFD nas concentrações que variaram de 0,312 - 10 μM (triplicata). O grupo controle recebeu 0,2 % de Dimetilsulfóxido (DMSO) estéril. A doxorrubicina foi usada como controle positivo para todas as linhagens tumorais e o paclitaxel foi utilizado apenas para a linhagem MCF-7. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, 10 μL da solução de Alamar Blue® 0,4 % foi adicionado em cada poço da placa e após 2h de exposição à fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter). A determinação do valor de CI50 foi realizada por teste de regressão não-linear através do software GraphPad Prism 6.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Análises de proteínas, proteolítica e fibrinolítica.

Neste estudo, observou-se que *P. pulmonarius* sintetizou proteases em todos as condições de cultivo testados (Tabela 1). Os resultados obtidos destacam a influência das condições de cultivo e dos substratos na quantificação de proteínas totais e seu efeito nas atividades proteolíticas e fibrinolíticas específicas.

Tabela 1. Determinação do teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade fibrinolítica específica dos meios de cultivo sintéticos (extrato de malte (PPEM); Extrato YMA (PPYM) e Extrato YES (PPEY).

Cultivo	Substratos	Proteínas Totais (mg)	Atividade proteolítica específica (U/mL)	Atividade fibrinolítica específica (U/mL)
Meio de cultivo Submerso	PPEM	0,0141 0,0129 ^c	± 666,67 ± 0,026 ^a	173,20 ± 0,019 ^a
	PPYM	0,0150 0,0018 ^b	± 223,62 ± 0,001 ^c	123,53 ± 0,004 ^c
	PPEY	0,0153 0,0089 ^a	± 640,04 ± 0,018 ^b	162,12 ± 0,003 ^b

Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

O substrato PPEM apresentou a maior atividade proteolítica específica com 666 UI/mL, seguido de PPEY com 640 UI/mL. Na atividade fibrinolítica, o substrato PPEM também se destacou com média de 173 UI/mL, apresentando resultados próximos com PPEY 162 UI/g. Esses dados indicam que o meio de cultivo submerso pode ser otimizado para a produção de enzimas específicas, especialmente em sistemas que requerem alta atividade enzimática. Outros autores também obtiveram proteases via meio de cultivo submerso. Silva *et al*, 2022 utilizaram extrato malte em meio de cultivo submerso e em farelo de trigo, obtiveram proteases via meio de cultivo sólido inoculados com *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Santana *et al*, 2022 disseram que o meio de cultivo sintético em caldo malte favoreceu a excreção de proteases fibrinolíticas *P. eryngii* ($226,47 \pm 7,27$ UI/mL) e *P. ostreatus* ($71,5 \pm 0,56$ UI/mL), via meio de cultivo submerso. Lee *et al.*, 2023 afirmaram que *Mycocleptodonoides aitchisonii* produz enzima fibrinolítica semelhante a quimiotripsina, tolerante a ácidos e antioxidante sendo, portanto, benéfico para a prevenção de DCV.

Tabela 2. Determinação do teor de proteínas totais, atividade proteolítica e atividade fibrinolítica específica dos três produtos alimentares (arroz branco (PPAR); farelo de aveia (PPFA) e farinha de trigo (PPFT)) e quatro resíduos agroindustriais não renováveis (borra de café (PPBC), casca de tucumã (PPCT), casca de castanha (PPCC) e bagaça de cana (PPBCA)).

Cultivo	Substratos	Proteínas Totais (mg)	Atividade proteolítica específica (U/mL)	Atividade fibrinolítica específica (U/mL)
---------	------------	-----------------------	--	---

Meio cultivo Sólido	PPAR	0,018 0,0001 ^a	±	174,67 ± 0,037 ^c	143,19 ± 0,091 ^c
	PPFA	0,027 ± 0,0002 ^c		307,82 ± 0,003 ^a	168,31 ± 0,005 ^a
	PPFT	0,044 0,0002 ^b	±	206,96 ± 0,023 ^b	156,31 ± 0,010 ^b
	PPBC	0,189 0,0092 ^d	±	103,67 ± 0,001 ^d	97,71 ± 0,001 ^a
	PPCT	0,262 ± 0,0135 ^c		170,66 ± 0,007 ^c	86,51 ± 0,001 ^b
	PPCC	0,510 0,0163 ^b	±	182,01 ± 0,042 ^b	44,72 ± 0,021 ^c
	PPBCA	0,861 0,0076 ^a	±	218,34 ± 0,036 ^a	6,76 ± 0,001 ^d

Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

Os valores obtidos via meio de cultivo sólido mostraram maior variabilidade, tanto na concentração de proteínas totais quanto nas atividades específicas. No substrato com PPBCA foram obtidas 0,861 mg de proteínas totais, mas apresentou baixa atividade fibrinolítica com 6,76 UI/mL, sugerindo que a alta concentração proteica não se traduz necessariamente em maior eficiência enzimática. Por outro lado, o substrato PPFA apresentou equilíbrio entre a quantidade de proteases com 307 UI/mL e a ação fibrinolítica com 168 UI/mL.

O substrato PPFT também apresentou resultados promissores, com atividades proteolítica e fibrinolítica de, respectivamente, 206 UI/mL e 156 UI/mL. O substrato PPBC apresentou resultados promissores para proteases com 103 UI/mL e ação fibrinolítica com 97 UI/mL após apresentar menor variabilidade na concentração de proteínas totais com 0,189 mg sugerindo que a alta concentração proteica se traduz na atividade específica em estudo. Outros autores também obtiveram proteases utilizando resíduo de café como substrato. Okechi *et al.*, 2024 relataram que a composição do substrato tem impacto na eficiência biológica do fungo. Chai *et al.*, 2024 relataram que a granulometria e suplementação interferem diretamente na produção de proteases excretadas em resíduos de café. Chai *et al.*, 2021 utilizaram resíduos de café em formulação de substratos pra obtenção de proteases via FES por

P. pulmonarius e *P. floridanus* demonstrando que os cogumelos produzem enzimas proteolíticas em ambos os tipos de meio de cultivo.

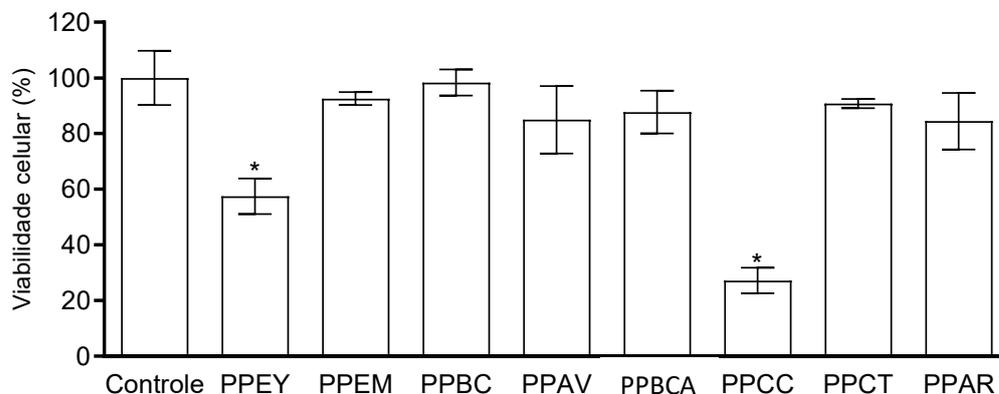
O substrato PPAR, assim como o substrato PPBC, também apresentou resultados promissores para proteases com 174 UI/mL e ação fibrinolítica com 143 UI/mL após apresentar menor variabilidade na concentração de proteínas totais com 0,018 mg sugerindo que a alta concentração proteica se traduz na atividade específica estudada.

Outros autores também encontraram proteases utilizando arroz como substrato. Lou *et al*, 2023 utilizaram em farinha de arroz, farinha de milho e trigo. Olagunju *et al*, 2023 utilizaram FES em diferentes períodos no valor alimentar e na qualidade da palha de milho com *Pleurotus ostreatus*. Contato *et al*, 2023 utilizaram FES em farelo de trigo, bagaço de laranja, farelo de aveia, casca de maracujá, bagaço de cana e bagaço de milho para estudar *P. pulmonarius* como produtor de proteases em resíduos lignocelulósicos. Faizah *et.al.*, 2020 relataram que o tipo de arroz influencia na produção de metabólitos, em especial, compostos fenólicos totais em até 19,76%. (Jannah *et.al.*, 2020).

A análise detalhada revelou padrões semelhantes entre os meios de cultivo submerso e meio de cultivo em estado sólido o que vai de acordo com Chai *et al.*, 2021 que obtiveram proteases via cultivo submerso e cultivo sólido por *P. pulmonarius* e *P. floridanus* demonstrando que os cogumelos produzem proteases em ambos os tipos de meio de cultivo. Contato *et al.*, 2023, utilizaram cultivo sólido em diferentes resíduos para estudar *P. pulmonarius* como produtor de proteases em resíduos lignocelulósicos.

6.2 Análise de toxicidade dos extratos de *P. pulmonarius* via alamar blue.

A atividade citotóxica foi avaliada em células de linhagens de fibroblastos humano (MRC-5). Essas foram expostas na concentração de 100 UI/mL das substâncias testes, no intervalo de tempo de tratamento em 24 horas (Figura 12).

Figura 12: Efeito dos extratos de *P. pulmonarius* na viabilidade de células MRC-5

Fonte: Elaboração própria (2025).

As células foram expostas aos meios de cultivo sintético, alimentícios e resíduos agroindustriais não renováveis, por 30 dias. Após 72 horas de tratamento, avaliou-se a viabilidade celular pelo método Alamar Blue. O controle negativo foi tratado com veículo (DMSO) usado para diluir a substância testada. Os dados apresentados como valores médios \pm S.E.M. de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo por ANOVA seguido de teste Student-Newman-Keuls.

Conforme observada na Figura 3, após 72 h de tratamento, a viabilidade celular MRC5 foi superior a 80 % para os extratos PPEM, PPBC, PPAV, PPBCA, PPCT e PPAR e as células não apresentaram alterações morfológicas quando comparadas ao controle negativo (Dimetilsulfóxido [DMSO]). Porém, houveram resultados significativos para: PPEY - % morte celular = $42,53 \pm 5,40\%$ e PPCC - % morte celular = $72,81 \pm 4,58\%$.

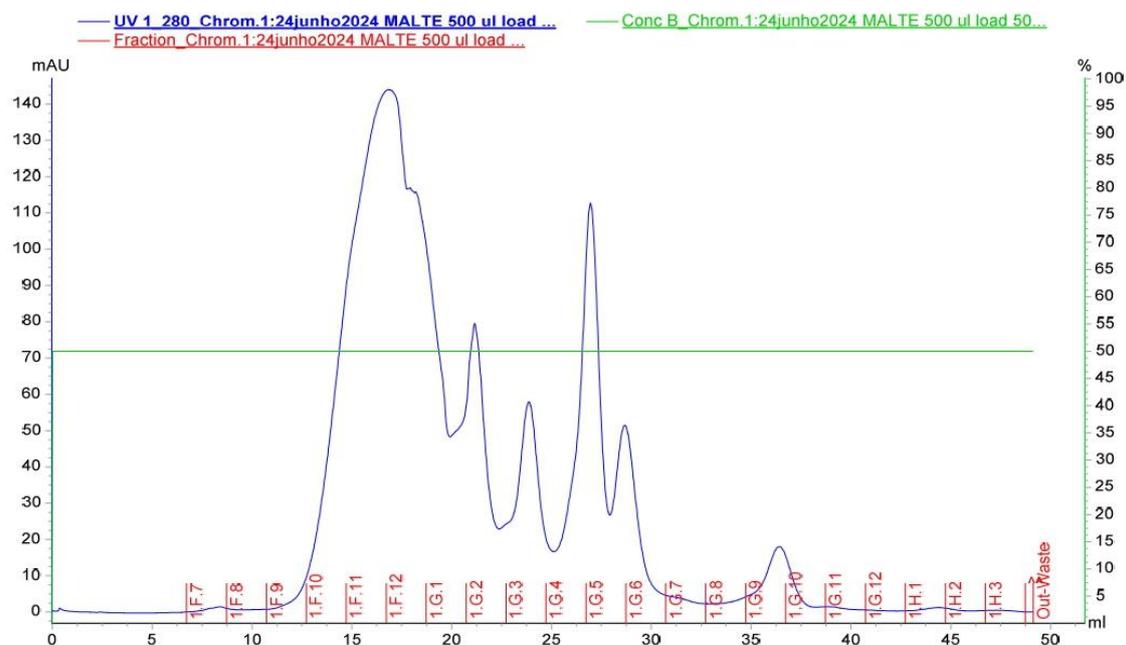
Outros autores testaram viabilidade celular para extratos de espécies do gênero *Pleurotus*. Al-Temimay *et al.*, (2015) relatou viabilidade celular de *P. ostreatus* em linhagens cancerígenas (CaSki, MCF-7 e A549) exceto em MRC-5, onde teve 30 % de viabilidade celular na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, apresentando efeitos colaterais nocivos sobre as células normais, avaliados em 59 e 72h.

Estudos realizados por Martin *et al.*, (2017) estudaram a viabilidade celular de proteases do extrato de *P. fabellatus* na concentração de 40 mg/mL, apresentando viabilidade celular em 60,53% de citotoxicidade células da linhagem MRC-5.

4.3 Semipurificação da proteína

O extrato PPEM foi concentrado e submetido a análise de cromatografia de exclusão molecular utilizando uma coluna DEAE *Sephadex G-75*. Foram coletadas 21 frações de 1 mL cada (Figura 13).

Figura 13: Semipurificação do extrato PPEM de *Pleurotus pulmonarius*. O perfil de eluição de cromatografia de exclusão molecular de alto desempenho de *Sephadex G-75*



Fonte: Elaboração própria (2025).

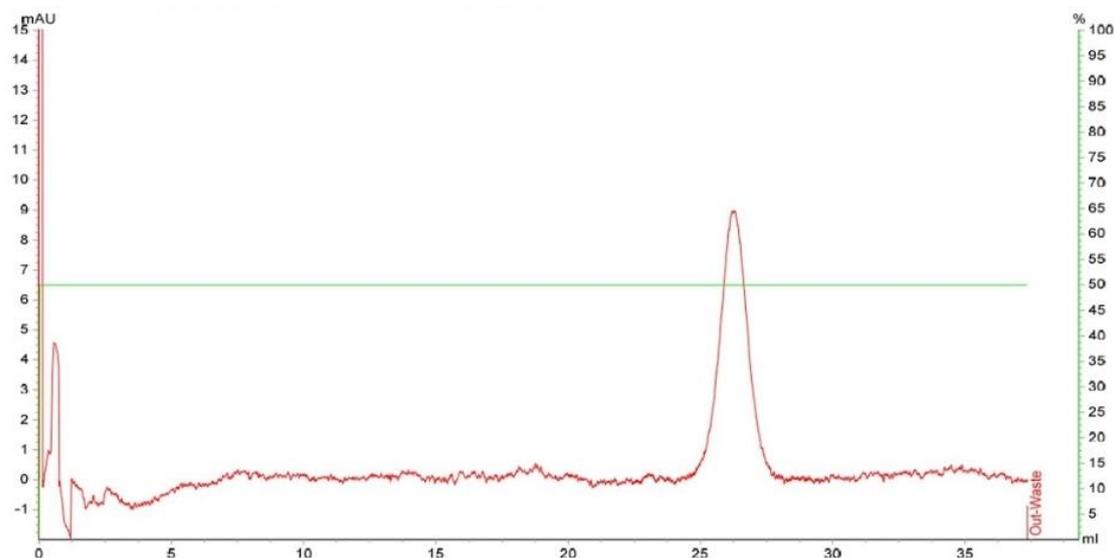
As frações coletadas correspondente aos picos destacados na figura 13, foram submetidas a determinação de proteínas totais, atividade proteolítica específica e atividade fibrinolítica específica (tabela 3).

Tabela 3. Determinação de teor de proteínas totais, teor de proteases e teor de proteases específicas das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular do extrato PPEM de *P. pulmonarius*.

Cultivo	Frações/Malte	Proteínas Totais (mg)	Atividade proteolítica específica (UI/g)	Atividade fibrinolítica específica (UI/g)
Meio de cultivo submerso Malte purificado	1F10	0,180 0,0001 ^a	± 74,67 ± 0,002 ^c	13,19 ± 0,091 ^l
	1F11	0,095 0,0002 ^c	± 77,12 ± 0,003 ^a	18,31 ± 0,005 ^k
	1F12	0,057 0,0002 ^b	± 105,05 ± 0,001 ^b	46,31 ± 0,010 ^f
	1G1	0,089 0,0002 ^d	± 93,67 ± 0,001 ^d	37,71 ± 0,001 ^h
	1G2	0,078 0,0005 ^c	± 107,66 ± 0,007 ^c	56,51 ± 0,001 ^c
	1G3	0,162 0,0006 ^b	± 112,01 ± 0,042 ^b	44,72 ± 0,021 ^e
	1G4	0,084 0,0001 ^a	± 74,15 ± 0,006 ^c	19,45 ± 0,091 ^j
	1G5	0,102 0,0002 ^c	± 94,19 ± 0,005 ^a	27,39 ± 0,005 ⁱ
	1G6	0,056 0,0002 ^b	± 81,43 ± 0,003 ^b	56,48 ± 0,010 ^d
	1G9	0,040 0,0002 ^d	± 67,01 ± 0,001 ^d	44,50 ± 0,001 ^g
	1G10	0,108 0,0005 ^c	± 75,67 ± 0,003 ^c	56,32 ± 0,001 ^e
	1G11	0,091 0,0003 ^b	± 86,14 ± 0,004 ^b	70,24 ± 0,004^a
1H1	0,061 0,0006 ^a	± 98,31 ± 0,012 ^a	67,19 ± 0,001 ^b	

O resultado apresentado mostra que a fração 1G11 exibiu a maior atividade fibrinolítica específica (Tabela 3). A fração foi, então, reinjetada nas mesmas condições obtendo um único pico ativo com 51% de recuperação de protease e 5,94 vezes de purificação (atividade específica de 70,24 U / mL) (Figura 14).

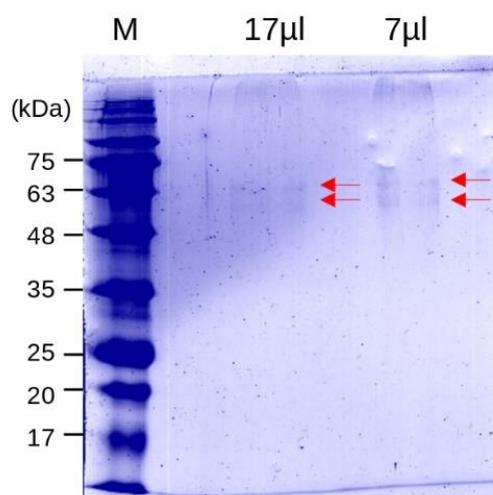
Figura 14. Semipurificação da fração 1G11 do extrato PPEM de *Pleurotus pulmonarius*.



Fonte: Elaboração própria (2025).

A fração 1G11 foi, então, analisada por SDS-PAGE revelando a presença de duas bandas distintas, em diferentes concentrações, com massas moleculares comparadas ao marcador molecular BluEye Prestained Protein Ladder, de 48 KDa e 63 KDa, respectivamente (figura 15).

Figura 15. SDS-PAGE da fração semipurificada 1G11 do extrato PPEM de *Pleurotus pulmonarius*.



Fonte: Elaboração própria (2025).

Foi observado que o método de purificação não purificou totalmente para 1G11 de *P. pulmonarius* não sendo possível estimar o peso molecular da enzima, com exatidão o que vai de acordo com (Rao *et al.*, 1998) que, de forma geral, as proteases exibem baixo o peso molecular em que a serino protease geralmente possuem 18 a 35 KDa, aspártico proteases tem de 30 a 45 KDa, e metaloproteases possuem de 48 a 63 KDa o que sugere que as bandas indicadas pelas setas vermelhas tiveram peso molecular dentro da média descrita na literatura (Yu *et al.*, 2023).

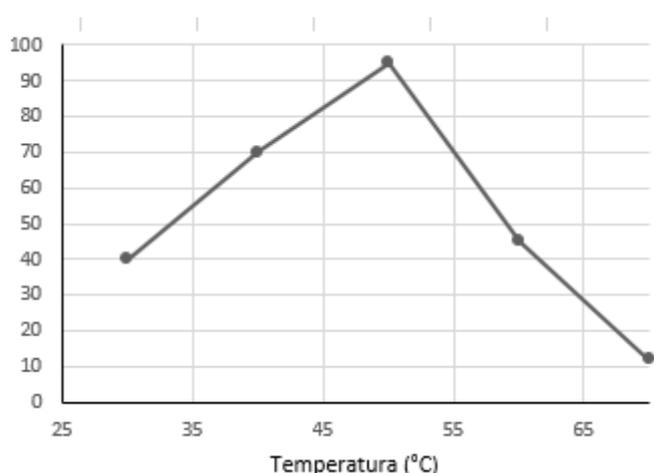
Após os processos cromatográficos, as proteases de 1G11 de *P. pulmonarius* foram caracterizados bioquimicamente.

4.4 Caracterização da fração semipurificadas de 1G11 de *P. pulmonarius*.

4.4.1. Efeito da temperatura e estabilidade térmica nas atividades enzimáticas

Analisando os efeitos de diferentes temperaturas, observou-se que a atividade máxima da enzima a 50°C. A partir dessa faixa de temperatura, foi observada redução da atividade, conforme mostrado na Figura 16. A atividade relativa máxima foi tomada como 100%. Portanto, a temperatura de 50 °C foi considerada ótima para proteases alcalinas.

Figura 16: Impacto da temperatura na atividade da fração 1G11 de *P. pulmonarius*.

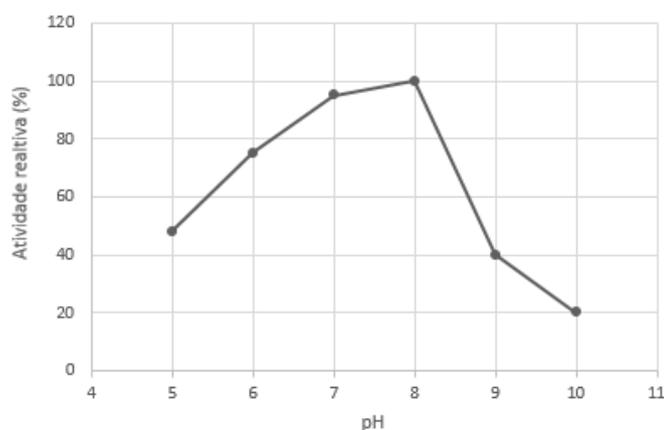


Fonte: Elaboração própria (2025).

4.4.2. Efeito do pH nas atividades enzimáticas

A Atividade proteolítica máxima foi medida em pH 7,3 e o controle foi tomado como 100% da atividade relativa. As proteases purificadas foram ativas a partir de pH de 5, com uma atividade ótima em pH 8. Em valores de pH mais alcalinos (9,0 a 10,0) verificou-se queda acentuada na atividade, conforme figura 16 abaixo:

Figura 16: Efeito do pH na atividade da fração 1G11 de *P. pulmonarius*.



Fonte: Elaboração própria (2025).

4.4.3. Efeito de íons metálicos nas atividades enzimáticas

Analisaram-se os efeitos de vários íons metálicos e inibidores na atividade da fração semipurificadas 1G11 de *P. pulmonarius* sendo identificado que o íon Fe^{2+} apresentou maior porcentagem de inibição enzimática quando comparado com os demais (Tabela 4).

Os estudos bioquímicos de inibição enzimática são importantes para fornecer dados referentes à natureza da enzima, funcionamento do centro ativo e necessidade de cofatores (Okechi *et al.*, 2022). Além de possibilitar análise de como os íons podem conectar resíduos de aminoácidos e alterar a conformação da proteína resultando em modificações na atividade catalítica da protease (Contato *et al.*, 2023).

Contudo, os resultados apresentados na tabela 3 demonstram o efeito dos íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica de *P. pulmonarius*. Nas condições avaliadas foi observado que os íons Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e K^+ estimularam a ação catalítica em 96%, 92%, 89%, e 88%, respectivamente. Em contrapartida quem proporcionou maior ação inibitória foi o íon Fe^{2+} com 76 %.

Outros autores espécies do mesmo gênero e também identificaram diminuição de atividade enzimática através da reação com íon Fe^{2+} . Martin *et al.*, 2021 observou a diminuição da atividade enzimática em 32 e 11%, respectivamente, na atividade de coagulação do leite de proteases de *Pleurotus albidus* por Fe^{2+} e Mg^{2+} .

Tabela 4: Efeito dos íons na atividade da fração semipurificada 1G11 de *P. pulmonarius*.

Íons (10 mM)	Atividade Relativa (%)
Controle	100
ZnSO ₄	96,5 (±0,5)
CuSO ₄	92,9 (±0,5)
MgSO ₄	83,8 (±0,1)
FeSO ₄	76,8 (±0,0)
MnSO ₄	89,4 (±0,04)
CaCl ₂	84,3 (±1,4)
KCl	88,3 (±0,0)
NaCl	87,4 (±0,62)

4.4.4. Efeito de inibidores nas atividades enzimáticas

Os resultados apresentados na tabela 5 demonstram que houve uma inibição parcial da protease de *P. pulmonarius* quando cada um dos inibidores foi usado, com exceção do EDTA, que apresentou ação inibitória de 95,67 %. Contudo, sugere-se que a protease semipurificada é do tipo metaloprotease, o que vai de acordo com Cruz-Vásquez *et al.*, 2022, que diz que O EDTA, as metaloproteases, na presença de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1, 10 – fenantrolina, são inibidas por quelantes de metais.

Tabela 5. Efeito de inibidores de protease na atividade da fração semipurificada 1G11 de *P. pulmonarius*.

Inibidores de protease (10 mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
PMSF	42,63 (\pm 0,15)
EDTA	95,67 (\pm 0,95)
Pepstatina	32,66 (\pm 0,10)
β -mercaptoetanol	27,39 (\pm 0,75)

4.4.5. Efeito de surfactantes nas atividades enzimáticas

O estudo da interferência de surfactantes na atividade proteolítica mostrou que as proteases extracelulares de *P. pulmonarius* 1958 sofreram efeito desnaturante gerando ação inibitória por triton X 100 e CTAB com, respectivamente, 99 % e 89 %. Os demais apresentaram inibição parcial da atividade da protease, onde até 50% da atividade foi mantida, conforme tabela 6.

Tabela 6: Efeito de surfactantes na atividade da protease extracelular purificada de *P. pulmonarius*

Surfactantes	Atividade relativa (%)
Controle	100
SDS (DESNATURANTE)	42,12 (\pm 0,49)
Tween 60	34,29 (\pm 0,22)
PEG	52,76 (\pm 0,29)
Triton X 100	99,23 (\pm 0,33)
DTT	40,20 (\pm 0,12)
CTAB	89,77 (\pm 2,45)

4.4.6. Efeito dos solventes

A utilização de enzimas em sistema de solventes orgânicos apresenta vantagens como aumento da solubilidade com substratos hidrofóbicos e eliminação da contaminação microbiana (Okechi *et al.*, 2023). Entretanto, a atividade catalítica da enzima pode ser prejudicada ou até mesmo inativada (Yu *et al.*, 2025). Cada enzima apresenta estabilidade única aos solventes orgânicos, já que a sua estabilidade é influenciada pela estrutura conformacional (Contato *et al.*, 2023). Sendo assim, foi avaliada a estabilidade enzimática, onde as proteases foram incubadas em vários solventes orgânicos.

Na tabela 7 é apresentado que as proteases de *P. pulmonarius* sofreram ação inibitória na presença de metanol, isopropanol, acetona, butanol, acetonitrila e DMSO.

Tabela 7. Efeito de solventes orgânicos na atividade da protease extracelular purificada de de *P. pulmonarius*

Solventes	Atividade relativa (%)
Controle	100
Methanol	32,91 (\pm 1.52)
Isopropanol	31,28 (\pm 2.33)
Acetona	28,14 (\pm 1.26)
Butanol	37,43 (\pm 1,23)
DMSO	42,46 (\pm 0,25)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições experimentais utilizadas nesta pesquisa, o cogumelo comestível da espécie *P. pulmonarius* produziu proteases com atividade fibrinolítica específica em diferentes meios e métodos de cultivo a que foi submetido. Todos os extratos obtidos foram avaliados quanto a atividade citotóxica sendo apenas dois extratos: o extrato YES - PPEY, obtido através de cultivo em meio submerso e o extrato de casca de castanha - PPCC, obtido através de cultivo em meio sólido, apresentaram proporção de morte celular no limite máximo de aceitação e abaixo do limite de aceitação, respectivamente, sugerindo presença de micotoxinas produzidas por *P. pulmonarius*.

O extrato obtido através de meio de cultivo sintético, extrato de malte – PPEM, foi semipurificado e foram obtidas, via SDS-PAGE, bandas distintas de moléculas com tamanho molecular entre 48 e 63 KDa o que sugere novos ensaios a partir das moléculas obtidas no gel de poliacrilamida para purificação e posterior isolamento das proteínas obtidas visando obtenção de enzimas específicas com potencial biotecnológico.

A fração 1G11 quanto a caracterização bioquimicamente, apresentou atividade ótima em pH 8,0 e a 50 °C, classificadas como metaloprotease e zinco e cálcio dependente. A ação destes biocatalisadores é inibida pela ação de Fe⁺² e mesmo na presença de solventes orgânicos e surfactantes a ação da enzima foi mantida.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADITYA.; JARIAL, R, S.; BHATIA, J, N. **Performance of Various Agroforestry Wastes for the Cultivation of Elm Oyster Mushroom *Hypsizygus ulmarius* (Agaricomycetes) in India and Its Biochemical Constituents.** *International Journal of Medicinal Mushrooms*. V. 25, Issue 8, 2023, pp. 55-62. DOI: 10.1615/IntJMedMushrooms.2023049037.

ÄKTA, avant **Operating Instructions. Original instructions.** 29-1015-56 AA. General Electric Company – All rights reserved. First published Mar. 2015.

AKYÜZ, M.; INCL, S.; KIRBAG, S. **Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant, Cytotoxic and DNA Protective Effects of Oyster Mushroom: *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.** *Arabian Journal for Science and Engineering*. 48:7273–7283, 2023.

ALI, M, M, A; BAVISETTY, S, B, C; GULLO, M; LERTSIRI, S; MORRIS, J; MASSA, S. **Production of fibrinolytic enzymes during food production.** Elsevier, 2020.

ALTAF, F.; WU, S.; KASIM, V. **Role of fibrinolytic enzymes in anti-thrombosis therapy.** *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 8, p. 1-17, 2021.

Al-Temimay IA, AL-Jibouri MH, Hassan AA, Mohammad FI (2015). **Teste a citotoxicidade da Pleurotina extraída de um cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* contra três linhagens de células de carcinoma humano.** *Iraqi J. Sci.* 56:2773-2781.

AUDÊNCIO, V.; GOTINE, A, R, M.; FALCÃO, R, L.; ANDRÊA, J.; F, FERREIRA, FLORES-ORTIZ, R.; XAVIER, S, P.; VASCO, M, D.; SILVA, N, J.; MAHOICHE, M.; RODRIGUES, S, O, A.; RODRIGUES, K, S.; RIBEIRO, R, C.; RONDÓ, P, H.; BARRETO, M, L. **Association between food environments and fetal growth in pregnant Brazilian women.** *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2023.

BAKRATSAS, G., POLYDERA, A., NILSON, O., KOSSATZ, L., XIROS, C., KATAPODIS, P., & STAMATIS, H. **Produção de proteína unicelular por *Pleurotus ostreatus* em meio de cultivo submersa.** *Tecnologia Alimentar Sustentável*, 1 (3), 377-389, 2023.

BANAT, I, M.; CARBOUÉ, Q.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; CÁZARES-MARINERO, J, J. **Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF).** *Technology. Bioresource Technology*. V. 320, Part A, 2021, 124222, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124222>.

BARROS, J. R. S. do R. **Comparando Diferentes Técnicas Cromatográficas na Análise no Paracetamol**. Revista Contemporânea, [S. l.], v. 4, n. 11, p. e6737, 2024.

BATISTA, L. dos S.; KUMADA, K. M. O. **Análise metodológica sobre as diferentes configurações da pesquisa bibliográfica**. Revista Brasileira de Iniciação Científica, [S. l.], v. 8, p. e021029, 2021. Disponível em: <https://periodicoscientificos.itp.ifsp.edu.br/index.php/rbic/article/view/113>. Acesso em: 9 abr. 2024.

BELLETTINI, M, B.; FIORDA, F, A.; MAEIVES, H, A.; TEIXEIRA, G, L.; ÁVILA, S.; HORNUNG, P, S.; JUNIOR, A, M.; RIBANI, H, R. **Factors affecting mushroom *Pleurotus spp.***, Saudi Journal of Biological Sciences V. 26, Issue 4, 2019, Pages 633-646, ISSN 1319-562X, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.005>.

BERGE, E.; WHITELEY, W.; AUDEBERT, H.; DE MARCHIS, G, M.; FONSECA, A, C.; PADIGLIONI, C. **Diretrizes da European Stroke Organization (ESO) sobre trombólise intravenosa para acidente vascular cerebral isquêmico agudo**. Eur Stroke J. 2021.

BHATTA, S.; STEVANOVIC JANEZIC, T.; RATTI, C.; **Liofilização de alimentos de origem vegetal**. Foods, v. 9, n. 1, p. 87, 2020.

BORNBUSCH, Sally L. et al. **Integrando a ciência do microbioma e a medicina evolucionária na saúde e conservação animal**. Biological Reviews, v. 99, n. 2, p. 458-477, 2024.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Analytical biochemistry, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUBA, J. C. **Produção de protease com atividade fibrinolítica por cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator**. Universidade de São Paulo (USP). 2018. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3137/tde28022018-133041/pt-br.php>.

CAROL, H, Collins, Gilberto L.; Braga e Pierina S. Bonato. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas, SP. Editora da Unicamp, 2006.

CASTELLANI, A. A. **Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches**. Journal of Tropical Medicine & Hygiene, v. 70, 1967.

CHEN, F.; XIONG, S.; SUNDELIN, J.; MARTIN, C.; HULTBERG. **Potential for combined production of food and biofuel: Cultivation of *Pleurotus pulmonarius***

on soft- and hardwood sawdusts. Journal of Cleaner Production. V. 266, 2020, 122011, ISSN 0959-6526, <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122011>.

CHILAKAMARRY, C, R.; MIMI SAKINAH, A, M.; ZULARISAM, A, W.; SIROHI, R.; KHILJI, I, A.; AHMAD, N.; PANDEY, A. **Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges.** Bioresource Technology. V. 343, 2022, 126065, ISSN 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126065>.

CHOI, J-H; KIM, K-J; KIM, S. **Purification and Antithrombotic Potential of a Fibrinolytic Enzyme from Shiitake Culinary- Medicinal Mushroom, Lentinus edodes GNA01 (Agaricomycetes).** International of Medicinal Mushrooms, v. 20, p. 47-59, 2018.

COELHO, Maria do Perpétuo Socorro de Lima Verde. **Padronização do ciclo do bioprocesso de duas espécies de cogumelos do ecossistema amazônico.** 2022. 76 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE) - Universidade federal do Amazonas - Universidade Estadual do Amazonas, Manaus (AM), 2021.

CROAN, S. **Conversion of conifer waste into edible and medicinal mushrooms.** For. Prod. J. 54(2), 68–76. 2004.

Cruz-Vásquez, A., Tomasini, A., Armas-Tizapantzi, A. et al. **Proteases extracelulares e lacases produzidas por Pleurotus ostreatus PoB: os efeitos das proteases na atividade da lacase.** In Microbiol 25, 495-502 (2022).

DA SILVA, N. S. R.; DE ARAUJO, M. M.; DERAGON, L. A. G.; QUINTAL, A. P. N.; DE OLIVEIRA, J. S.; DE VASCONCELOS, A. B. **Determinação de proteínas do plasma seminal usando cromatografia de exclusão molecular em touros jovens / Determination of seminal plasma protein range with molecular chromatography exclusion in young bulls.** Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 1874–1882, 2021.

DE FILIPPIS, A, P.; CHERNYAVSKIY, I.; AMRAOTKAR, A, R.; TRAINOR, P, J.; S. KOTHARI, S.; ISMAIL, I.; HARGIS, C, W.; KORLEY, F, K.; LEIBUNDGUT, G.; TSIMIKAS, S.; RAI, S, N.; BHATNAGAR, A. **Os níveis circulantes de plasminogênio e fosfolipídios oxidados ligados ao plasminogênio distinguem entre infarto do miocárdio aterotrombótico e não aterotrombótico.** J. Trombo. Trombólise, 42, (1), 2016.

DIAMANTOPOULOU, P.; FOURTAKA, K.; MELANOURI, E, M.; DEDOUSI, M.; DIAMANTIS, I.; GARDELI, C.; PAPANIKOLAOU, S. **Examinando o Impacto da**

Composição do Substrato nas Propriedades Bioquímicas e na Atividade Antioxidante dos cogumelos Pleorotus e Agáricos. *Fermentação*, 2023, 9, 689.

ELLEGREEN H.; Laas, T. J.; *chromatogr.*, 467, 1989, p. 217.

EL-RAMADY, H.; ABDALLA, N.; BADGAR, K.; LLANAJ, X. **Cogumelos comestíveis para uma alimentação humana sustentável e saudável: Atributos nutricionais e medicinais. Sustentabilidades**, 14, 9, 2022, 10.3390/su14094941.

FAIZAH, F.; KUSNANDAR, F.; NURJANAH, S. **“Senyawa Fenolik, Oryzanol, dan Aktivitas Antioksidan Bekatul yang Difermentasi dengan Rhizopus oryzae”**. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, vol. 31, no.1, pp. 86–94, 2020.

FISHER, L. *An introduction to gel chromatography*. Amsterdã: North Holland Publishing Co., 1969..

GARCIA, J.; RODRIGUES, F.; SAAVEDRA, F.; NUNES, F, M.; MARQUES, G. **Bioactive polysaccharides from medicinal mushrooms: A review on their isolation, structural characteristics and antitumor activity**. *Food Bioscience*. V. 49, 2022, 101955, ISSN 2212-4292.

GHOBAD-NEJHAD, M.; DIMA, B.; KAI CUI, B.; SI, J. **Editorial: Basidiomycete fungi: From biosystematics and biodiversity to biotechnology**. *Front. Microbiol.*, 25 January 2023. Sec. Microbiotechnology. V, 14 – 2023.

GINTHER, C. L. **Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephameycin C by Streptomyces lactamdurans**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 15, n. 4, p. 522–526, 1979.

HAMZA, A.; GHANEKAR, S.; KUMAR, D, S. **Current trends in health-promoting potential and biomaterial applications of edible mushrooms for human wellness**, *Food Bioscience*, V. 51, 2023, 102290, ISSN 2212-4292.

HAZARE, C.; BHAGWAT, P.; SINGH, S.; PILLAI, S. **Diverse origins of fibrinolytic enzymes: A comprehensive review**. *Heliyon*. V, 10, 2024.

HEGENBERG, L. **Doença: um estudo filosófico** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1998

HUANG, C. et al. **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China**. *The Lancet*, London, v. 39, n. 10223, 497-506, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(20\)30183-5/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(20)30183-5/fulltext).

INTELLIGENCE, MORDOR. "mercado de biossurfactantes-crescimento, tendências, impacto do covid-19 e previsões. (2022-2027), 2022." (2022).

JANNAH, A.; BARROROH, H.; MAUNATIN, A. "Potential of extract rice bran fermented by *Rhizopus oryzae* as antibacterial against *Salmonella typhi*", IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, vol. 456, no. 1, February. 2020.

SINNIAH, A; YAZID, S; FLOR, R.J. De AINEs a glicocorticoides e além. Células, 10 (12), 2021.

BINDU, S; MAZUMDER, S; BANDYOPADHYAY, U. Anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) e danos aos órgãos: uma perspectiva atual. Biochem. Pharmacol, 180, 2020.

JULIANA JOHN, K.K.; SURENDRANATHAN, Kaimal.; SMITH, M, L.; PATTANATHU, K, S, M.; RAHMAN, K, S,M.; CHELLAM, P, S. **Advances in upstream and downstream strategies of pectinase bioprocessing: A review**, International Journal of Biological Macromolecules, Volume 162, 2020, Pages 1086-1099.

KATAOKA, K.; NEMOTO, H.; SAKURAI, A.; YASUTOMO, K.; SHIKANAI, M. **Efeito preventivo de arroz integral fermentado e farelo de arroz no diabetes tipo 1 espontâneo em camundongos fêmeas NOD**. J. Função. Alimentos, 2021, 78, 104356.

KATZ, J, M.; TADI, P. **Fisiologia, Ativação do Plasminogênio**. [Atualizado em 26 de setembro de 2022]. In: StatPearls [Internet]. Ilha do Tesouro (FL): Publicação StatPearls. Jan, 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539745/>.

KRISHNAMURTHY, A.; BELUR, P, D.; SUBRAMANYA, S, B. **Methods available to assess therapeutic potential of fibrinolytic enzymes of microbial origin: a review**, Journal of Analytical Science and Technology. 9 – 1. 2018. 1–11, <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0143-3>.

KUMAR, K.; MEHRA, R.; GUINÉ, R, P, F.; LIMA, M, J.; KUMAR, N.; KAUSHIK, R.; AHMED, N.; YADAV, A, N.; KUMAR, H. **Cogumelos comestíveis: uma revisão abrangente sobre compostos bioativos com benefícios à saúde e aspectos de processamento**. Alimentos, 10, 12, 2021, pp. 1-22, 10.3390/alimentos10122996.

LIU, C.; ZHANG, Z.; SHANG, Y.; LI, S.; XIA, J.; TIAN, Y.; JIA, Y.; MA, A. **Progress in the preparation, identification and biological activity of walnut peptides**. Journal of Future Foods, V. 4, Issue 3, 2024, Pages 205-220, ISSN 2772-5669, <https://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2023.07.003>.

LIU, H.; JING, J.; WANG, A.; XU, Q.; MENG, X.; LI, H. **Recorrência de AVC e Antiplaquetários na Circulação Posterior Versus Anterior AVC Menor ou Ataque Isquêmico Transitório.** AVC. 2023.

LOU, H.; YANG, C.; GONG, Y.; LI, Y.; LI, Yonghui.; TIAN, S.; ZHAOM Y.; ZHAO, R. **Edible fungi efficiently degrade aflatoxin B1 in cereals and improve their nutritional composition by solid-state fermentation.** Journal of Hazardous Materials. V 451, 2023, 131139, ISSN 0304-3894, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131139>.

MACKMAN, N.; BERGMEIER, W.; STOUFFER, G, A.; WEITZ, J, I. **Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches.** Nature Reviews Drug Discovery, v 19, pg. 333–352, 2020.

MALTA, D.C., et al. **A implantação do Sistema de Vigilância de Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil, 2003 a 2015: alcances e desafios.** Rev bras epidemiol [online]. 2017, vol. 20, no. 4, pp. 661-675 [viewed 5 June 2023].

MARÁKOVÁ, K.; OPETOVÁ, M.; TOMAŠOVSKÝ, K. **Espectrometria de massa por eletroforese capilar para análise de proteínas intactas: aplicações farmacêuticas e biomédicas (2018–março de 2023).** Revista da Ciência da Separação, v. 15, pág. 2300244, 2023.

MARTIM, S. R. Silva, L. S. C., de Souza, L. B., do Carmos E. J., Alecrim, M. M., de Vasconcelos, M. C., Oliveira, I. M. de A., & Teixeira, M. F. S. (2017) **Pleutorus albidus: A nem source of mil-clotting proteases.** African Journal of Microbiology Research, 11 (17), 660-667.

MKHIZE, S. S.; ZHARARE, G. E.; BASSON, A. K.; MTHEMBU, M. S.; CLOETE, J. **Desempenho do cogumelo *Pleurotus pulmonarius* cultivado em resíduos de colmo de milho suplementado com vários níveis de farinha de milho e farelo de trigo.** Food Science Technology, Campinas, v. 37, n. 4, pág. 570-577, dez. 2017.

MOTTA, F.; GERSHWIN, M, E.; SELMI, C. **Cogumelos e imunidade.** Journal of Autoimmunity, 117, novembro de 2020, 2021, Artigo 102576, 10.1016/j.jaut.2020.102576.

MUGUET, C, M.; GUIMARÃES, K.; BASTOS, L.; BARONI, M.; CURTY, M.; MARZANO, M.; COSTA,. M.; TARDELLI, M.; RISI, R.; LUSTOSA, R.; ESTADO, V. **A trombose venosa profunda pós-COVID-19 e seu manejo farmacológico.** Research, Society and Development, v. 11, n. 1, e12311124991, 2022.

MUSZYŃSKA, B.; KAŁA, K.; LAZUR, J.; WŁODARCZYK, A. **Cogumelo culinário-medicinal *Imleria badia* com interessantes propriedades biológicas**. *Biociência Alimentar*, 37, 2020, 10.1016/j.fbio.2020.100663.

N. WU, N.; TIAN, F.; MOODLEY, O.; SONG, B.; JIA, C.; YE, J. **Otimização de resíduos agrícolas como substratos para produção de *Pleurotus pulmonarius***. *AMB Express*, 9, 1, 2019, Artigo 184.

OKECHI, O.; USULOR, E.; OTI, D.; ANYAMELE, T.; NWABUISI, A, Q.; UGBOGU, A.; WANKWO, V, C.; IBE, C. **Phenotypic, nutritional, and bioactive characteristics of *Pleurotus pulmonarius* grown on three different substrates**, *Food and Humanity*. V. 2, 2024, 100220, ISSN 2949-8244, <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2023.100220>.

OLAGUNJU, L, K.; ISIKHUEMHEN, O, S.; DELE, P, a.; ANIKÉ, F, N.; IKE, K, A.; SHAW, Y.; BRICE, R, M.; ORIMAYE, O, E.; WUAKU, M.; ESSICK, B, G. **Efeitos do período de incubação de *Pleurotus ostreatus* na composição química e disponibilidade de nutrientes da palha de milho fermentada no estado sólido**. *Animais*. 2023, 13, 2587. <https://doi.org/10.3390/ani13162587>.

OMRANI, Mohammadhassan et al. Tendência global em isolamento e aplicação de exossomos: um conceito de atualização no gerenciamento de doenças. ***Molecular and Cellular Biochemistry*** , v. 479, n. 3, p. 679-691, 2024.

OTHMAN, N. **Espectroscopia de infravermelho em análise qualitativa e quantitativa**. Em: **Espectroscopia de infravermelho - Perspectivas e aplicações**. IntechOpen, 2022.

PASTORE, Glaucia Maria, BICAS, JULIANO LEMOS, MARÓSTICA, MÁRIO ROBERTO JÚNIOR. **Coleção Ciência, Tecnologia, Engenharia de Alimentos e Nutrição – Volume 12 – Biotecnologia de Alimentos**. Editora Atheneu. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, 2013.

PATEL, A, K.; DONG, Cheng-Di, CHEN, Chiu-Wen.; PANDEY, Ashok.; SINGHANIA, R, R. Chapter 3 - **Production, purification, and application of microbial enzymes**. **Editor(s): Goutam Brahmachari, Biotechnology of Microbial Enzymes (Second Edition)**, Academic Press, 2023, Pages 25-57, ISBN 9780443190599.

QUINTERO. M.; TASIC, L.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J, M. **Thrombosis: Current knowledge based on metabolomics by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectrometry (MS)**, *Thrombosis Update*, vol. 1, 2020.

RAHMAN, M, M.; FAHADUL I.; HARUP, Or-Rashid, ABDULLAH AL, M.; SAIDUR, R Md.; MOHAIMENUL, I, Md. **The Gut Microbiota (Microbiome) in Cardiovascular**

Disease and Its Therapeutic Regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. V,12. 2022.

RAHMAN, S.; HASSAN, K.; TALUKKER, F, U.; RAHMAN, S, D. AKTHER, M. **Combined effect of low temperature and thickness of polypropylene package on shelf life and quality of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*).** *JOURNAL OF HORTICULTURE AND POSTHARVEST RESEARCH* 2021, VOL. 4(2), 127-140.

ROCHA, F, TM B. **Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato / Felype Thomaz de Brito Rocha.** – Recife, 2018.

ROTHMANN, C.; ROTHMANN, L.; VILJOEN, B.; CASON, E, D. **Application of solid-state fermentation using mushrooms for the production of animal feed.** *Journal of basic microbiology*. V. 63, Issue 10, 2023, Pages 1153-1164.

ROTHWELL, P, M. **Tratamento antiplaquetário para prevenir acidente vascular cerebral recorrente precoce.** *New Engl J Med*. 2020.

SALEHI, F. **Caracterização de diferentes cogumelos em pó e sua aplicação em produtos de panificação: uma revisão.** *Revista Internacional de Propriedades Alimentares*, 22, 1, 2019, pp.10.1080/10942912.2019.1650765.

SANTANA, R. da S.; BATISTA, S. C. P.; ASSUNÇÃO, E. N. de; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. S.; GOMES, W. R.; CARVALHO, R. P. **Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa.** *Concilium*, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 987–995, 2022. DOI: 10.53660/CLM-573-650. Disponível em: <https://www.cium.org/index.php/edicoes/article/view/573>. Acesso em: 9 abr. 2024.

SCOPES, Robert K. **Purificação de proteínas: princípios e prática.** Springer Science & Business Media, 1993.

SELO, G.; PLANINIĆ, M.; TISMA, M.; TOMÁS, S.; KOCEVA KOMLENIĆ, D.; BUCIĆ-KOJIĆ, A. **Uma revisão abrangente sobre a valorização de resíduos industriais agroalimentares por fermentação em estado sólido.** *Alimentos*. 2021, 10, 927. <https://doi.org/10.3390/foods10050927>.

SHANU, Kumari et al. **Processamento Downstream para Recuperação e Purificação de Bioprodutos.** Em: *Avanços Recentes em Engenharia de Bioprocessos e Design de Biorreatores*. Cingapura: Springer Nature Singapore, 2024. p. 139-169.

SHARMA, N.; SODHI, A, S.; BHATIA, S.; VERMA, A.; SONI, S.; BATRA. **Insights on sustainable approaches for production and applications of value-added products**. Chemosphere, V. 286, Part 1, 2022, 131623, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131623>.

SILVA, Francisca Manuela Santos da. **Fracionamento do extrato de casca de manga (*Mangifera indica* L.) CV. Tommy Atkinns para obtenção de mangiferina por HPLC-UV/VIS preparativo**. 2019. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Bacharelado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SPOTI, T, B; AMARAL, C, S, T. **Os desafios da gestão de resíduos sólidos urbanos domésticos no Brasil**. Revista Brasileira de Desenvolvimento, [S. l.], v. 2, pág. 8712–8724, 2023. DOI: 10.34117/bjdv9n2-164. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/57639>. Acesso em: 5 abr. 2024.

STRIEGEL, AM **Cromatografia de exclusão de tamanho: uma perspectiva do século XXI**. *Chromatographia* 85, 307–313 (2022).

TEUTLE-PAREDES, J, G.; MAZORRA-MANZANO, M, A.; PORCHAS, M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J, C.; VALLEJO-CÓRDOBA, B.; TORRES-LLANEZ, M, J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A, F. **Proteolytic, milk-clotting, and stability properties of proteases from *Solanum elaeagnifolium* fruit**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. V. 57, 2024.

THAKUR, N.; BHALLA, S, T, C.; Chapter 18 - **Enzymes and their significance in the industrial bioprocesses**, Editor(s): Arvind Kumar Bhatt, Ravi Kant Bhatia, Tek Chand Bhalla, Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship, Academic Press, 2023.

WANG, Q.; MENG, L.; WANG, X.; ZHAO, W.; SHI, X.; WANG, W. Produtividade, valor nutricional, componentes umami e conteúdo mineral dos cogumelos *Pleurotus pulmonarius* de primeira e segunda geração cultivados em três resíduos florestais. Food Chem, 397, 2022, Artigo 133714.

WU, J, Y.; SIU, K, C.; GENG, P. **Ingredientes bioativos e valores medicinais da *Grifola frondosa* (Maitake)**. Alimentos, v. 10, MDPI AG, 2021, 10.3390/alimentos10010095.

YU, Y.; LIU, T.; , Tianhai Liu, Yong Wang, Lixu Liu, Xiaolan He, Jianwei Li, Francis M. Martin, Weihong Peng, Hao Tan. **Comparative analyses of *Pleurotus pulmonarius* mitochondrial genomes reveal two major lineages of mini oyster**

mushroom cultivars. Computational and Structural Biotechnology Journal. V. 23, 2024, Pages 905-917, ISSN 2001-0370, <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.01.021>.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; LIU, H.; WANG, D.; WANG, J.; DENG, Z.; LI, T.; HE, Y.; YANG, Y.; ZHONG, S. **Caracterização físico-química e atividade antitumoral in vitro de um polissacarídeo de selênio de *Pleurotus ostreatus*.** Jornal Internacional de Macromoléculas Biológicas, 165, 2020, pp. 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.168.

ZHANG, Z.; ZHANG, X.; XIN, G.; GONG, Y.; WANG, L. **Sabor umami e sua associação com o status energético em *Pleurotus geesteranus* colhido e armazenado em diferentes temperaturas.** Química Alimentar. 279, 2019.