



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO



ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

PRODUTO ALIMENTÍCIO FORTIFICADO COM BIOMASSA DE COGUMELO COMO
FONTE DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA

MANAUS-AM

2025

ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador (a): Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

Coorientador (a): Doutor Salomão Rocha Martim

Área de Concentração: Biotecnologias para a saúde

MANAUS-AM

2025

Ficha Catalográfica

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

B238p Barbosa, Elliza Emily Perrone
 Produto alimentício fortificado com biomassa de cogumelo como fonte
 de protease fibrinolítica / Elliza Emily Perrone Barbosa. - 2025.
 132 f. : il., color. ; 31 cm.

 Orientador(a): Maria Francisca Simas Teixeira .
 Coorientador(a): Salomão Rocha Martim .
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de
 Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus , 2025.

 1. Fermentação estado sólido. 2. Cogumelo. 3. Bioproduto. 4. Tubérculo.
 I. Teixeira, Maria Francisca Simas. II. Martim, Salomão Rocha. III.
 Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em
 Biotecnologia. IV. Título

ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

PRODUTO ALIMENTÍCIO FORTIFICADO COM BIOMASSA DE COGUMELO COMO
FONTE DE PROTEASE FIBRINOLÍTICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

Aprovado em 09/05/2025

Banca Examinadora

Prof. Dr. Salomão Rocha Martim
Coorientador – Presidente da Banca

Profa. Dra. Raiane Áila Teixeira Souza
(Membro)

Profa. Dra. Enedina Nogueira de Assunção
(Membro)

Profa. Dra. Ana Rita Gaia Machado
(Membro)

Profa. Dra. Tiara Sousa Cabral
(Membro)

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais por todo amor, suporte e refúgio ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Os caminhos na vida em sua maioria iniciam com gratas surpresas, perpassam por grandes desafios e se encerram com grandes conquistas. Esta tese é fruto de um sonho de uma pequena jovem que amava biologia, e decidiu que queria ser cientista. Ao longo desses caminhos, muitas pessoas apareceram para ajudar a concretizar este sonho.

Deus diante da sua bondade permitiu que tudo fosse possível, e não seria diferente agradecer a Ele pelo extremo cuidado com os seus planos. Agradecer também aqueles que sempre fizeram o possível e o impossível para me guiar nos estudos, meus pais, Iza e Ellinaldo que com seu profundo e imenso amor conduziram para que todas as oportunidades pudessem chegar até mim. A eles não existem palavras para expressar minha gratidão.

Dentre as oportunidades, conhecer a Profª Doutora Maria Francisca Simas Teixeira (*in memoriam*) foi um divisor de águas na minha vida acadêmica, através dela conheci os fungos, e pude ter como orientadora e referência essa profissional ímpar. Ela que com duras e doces palavras ensinou, orientou, guiou e foi uma “mãe científica” em todos os momentos da minha jornada, ela que deixou o seu legado e fez nome na Micologia, ela que será sempre lembrada por mim e por todos pela sua profunda dedicação e amor pelos fungos e pela pesquisa. Minha eterna gratidão a ela.

Aos meus irmãos, Ellinaldo Junior e Humberto por tornar todo o processo mais fluído e leve, minha gratidão pelos momentos de descontração. Aos meus amigos que em meio ao caos não me deixaram desistir e foram fundamentais durante a pesquisa do Doutorado. Sem eles, tudo seria mais difícil. Agradeço por toda ajuda, seja na bancada, seja com as palavras de acolhimento da Karoline, Laynah, Victor, Yasmin, Alexandra, Adriele, Samara, Salomão, Ana e Tiara, todos foram essenciais durante a minha caminhada, afinal, ninguém faz ciência sozinho. Meu profundo e sincero agradecimento ao Denis e a Sharima que nos momentos difíceis estiveram comigo, sempre trazendo palavras de apoio e otimismo.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec-UFAM), ao Laboratório de Micologia Médica e Industrial da UFAM, à Coleção de Cultura (DPUA), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte estrutural e financeiro.

Encerrar esta jornada traz um sentimento de missão cumprida, de que todos os esforços, dificuldades e esperas valeram à pena. Finalizo com o sentimento de profunda gratidão e felicidade por concretizar o que antes era apenas um sonho.

*Reze e trabalhe, fazendo de conta que esta vida é um
dia de capina com sol quente, que as vezes custa muito
a passar, mas que sempre passa. E que você ainda pode
ter muito pedaço bom de alegria (...). Cada um tem a
sua hora e a sua vez: você há de ter a sua.*
Guimarães Rosa

RESUMO

Cogumelos comestíveis são excelentes fontes de enzimas, em destaque as proteases fibrinolíticas, que atuam na dissolução de coágulos sanguíneos. Contudo, no cenário amazônico, o uso de cogumelos como produtores de enzimas fibrinolíticas, ainda é um tema pouco explorado. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi o desenvolvimento de um produto alimentício utilizando tubérculos nativos da Amazônia fortificado com massa micelial de cogumelo comestível como fonte de protease fibrinolítica para promoção da saúde humana. *P. ostreatoroseus* foi cedido pela coleção de culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas cultivado em ágar BDA suplementado com extrato de Levedura 0,5 % (p/v). A fermentação líquida foi conduzida em frasco de Erlenmeyer em 50 mL de meio GYP, MGYD e Malte. A seleção do meio de cultivo líquido foi realizada com base na atividade de enzimas fibrinolíticas. A massa micelial recuperada através de filtração à vácuo foi utilizada como inóculo na fermentação no estado sólido. Os tubérculos utilizados foram tratados, cortados em cubos de 1x1, submetidos a cocção, esterilizados a 121°C, por 30 minutos. A biomassa obtida foi transferida para superfície de tubérculos amazônicos de Inhame-roxo (*Dioscorea alata* L.) e ariá (*Goeppertia allouia* (Aubl.) Borchs. & S. Suárez.). A fermentação em estado sólido foi realizada em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, mantido a 28°C, por oito dias, umidade 60%, em base úmida, até completa miceliação do substrato. O bioproduto foi preparado utilizando polpa de tubérculos colonizados com massa micelial de *P. ostreatoroseus*, produto da fermentação no estado sólido. A seleção da proporção de tubérculos foi determinada de acordo com a atividade fibrinolítica significativa. Os bioprodutos fermentados foram desidratados a 40°C por 24 horas, em desidratadora com controle de temperatura e circulação de ar forçado. Cada produto foi triturado em processador para padronização da granulometria em peneira de alumínio de 60 mesh. Posteriormente, os bioprodutos elaborados foram submetidos à determinação de enzimas fibrinolíticas, composição centesimal, propriedade tecnológicas da farinha, teor de minerais, atividade prebiótica e hipocolesterolêmica, determinação de pH e acidez titulável total, e avaliação da qualidade microbiológica. A atividade máxima de enzimas fibrinolíticas sintetizadas por *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 foi verificada em GYP ($449,32 \pm 0,01$ U/mL). No extrato dialisado, *P. ostreatoroseus* excretou proteases fibrinolíticas ($1361,73 \pm 0,09$). Nos parâmetros de cultivo a idade do inóculo influenciou na produção enzimática. Nos extratos de GYP as proteases apresentaram atividade ótima em pH 8,0 e a 30 °C. Os cultivos em tubérculos amazônicos foram promissores quanto a atividade fibrinolítica, no entanto *D. alata* e *G. allouia* suplementado com farelo de trigo (80:20) apresentaram resultados significativos quanto a síntese de enzimas fibrinolíticas. As farinhas elaboradas apresentaram propriedades tecnológicas e nutricionais significativas de micro e macro minerais, além de valor nutricional agregado de proteína, fibras, cinzas e baixo teor de lipídeos. Os bioprodutos desenvolvidos apresentaram atividade fibrinolítica, ação prebiótica e hipocolesterolêmica significativas. O pH dos bioprodutos não causou redução significativa nos valores de pH e a acidez titulável seguindo os padrões exigidos, além de atenderem as exigências higiênico-sanitárias para consumo. Estes bioprodutos elaborados podem ser considerados um alimento versátil para diversas finalidades, pois é um bioproduto sem glúten, conservantes, e originário de recursos amazônicos, pode ser indicado com a intenção de substituir total ou parcialmente a farinha de trigo atendendo diferentes públicos de consumidores.

Palavras-chave: fermentação estado sólido, cogumelo, bioproduto.

ABSTRACT

Edible mushrooms are excellent sources of enzymes, particularly fibrinolytic proteases, which act to dissolve blood clots. However, in the Amazonian scenario, the use of mushrooms as producers of fibrinolytic enzymes is still a little explored topic. The aim of this research was to develop a food product using native Amazonian tubers fortified with the mycelial mass of an edible mushroom as a source of fibrinolytic protease to promote human health. *P. ostreatoroseus* was provided by the DPUA culture collection at the Federal University of Amazonas and cultivated on BDA agar supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract. The liquid fermentation was carried out in an Erlenmeyer flask in 50 mL of GYP, MGYT and Malt medium. The liquid culture medium was selected based on fibrinolytic enzyme activity. The mycelial mass recovered by vacuum filtration was used as inoculum for solid-state fermentation. The tubers used were treated, cut into 1x1 cubes, cooked and sterilized at 121°C for 30 minutes. The biomass obtained was transferred to the surface of Amazonian tubers of purple yam (*Dioscorea alata* L.) and guinea arrowroot (*Goeppertia allouia* (Aubl.) Borchs. & S. Suárez.). Solid-state fermentation was carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks, kept at 28°C for eight days at 60% humidity on a wet basis, until the substrate had completely micellized. The bioproduct was prepared using tuber pulp colonized with *P. ostreatoroseus* mycelial mass, the product of solid-state fermentation. The proportion of tubers selected was determined according to significant fibrinolytic activity. The fermented bioproducts were dehydrated at 40°C for 24 hours in a dehydrator with temperature control and forced air circulation. Each product was ground in a processor to standardize the particle size using a 60-mesh aluminium sieve. The bioproducts were subjected to the determination of fibrinolytic enzymes, centesimal composition, technological properties of the flour, mineral content, prebiotic and hypocholesterolemic activity, determination of pH and total titratable acidity, and evaluation of microbiological quality. The maximum activity of fibrinolytic enzymes synthesized by *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 was found in GYP (449.32 ± 0.01 U/mL). In the dialyzed extract, *P. ostreatoroseus* excreted fibrinolytic proteases (1361.73 ± 0.09). In the cultivation parameters, the age of the inoculum influenced enzyme production. In the GYP extracts, the proteases showed optimum activity at pH 8.0 and at 30 °C. Cultivation on Amazonian tubers was promising in terms of fibrinolytic activity, but *D. alata* and *G. allouia* supplemented with wheat bran (80:20) showed significant results in terms of fibrinolytic enzyme synthesis. The flour produced showed significant technological and nutritional properties in terms of micro and macrominerals, as well as added nutritional value in terms of protein, fiber, ash and low lipid content. The bioproducts developed showed significant fibrinolytic activity, prebiotic and hypocholesterolemic action. The pH of the bioproducts did not cause a significant reduction in pH values and the titratable acidity complies with the required standards, as well as meeting the hygiene and health requirements for consumption. These bioproducts can be considered a versatile food for various purposes, as it is a bioproduct without gluten, preservatives, and originating from Amazonian resources, it can be indicated with the intention of totally or partially replacing wheat flour, serving different consumer audiences.

Keywords: solid state fermentation, mushroom, bioproduct.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo da Cascata da coagulação sanguínea.....	22
Figura 2 – Representação da ação de enzimas fibrinolíticas na dissolução do coágulo sanguíneo. Fonte: próprio autor, adaptada de Diwan <i>et al.</i> (2021), imagens criadas com BioRender.com.....	27
Figura 3 – (A) Conjunto de basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> em tronco de árvore. (B) Basidioma sem presença de véu e lamelas não intervenosas.....	29
Figura 4 – Características morfológicas dos tubérculos (A, B, C) e, folhas (D, E, F) de <i>Dioscorea alata</i>	31
Figura 5 – Características morfológicas externas e internas de <i>Goeppertia allouia</i> (ariá).....	32
CAPÍTULO 1	47
Figure 1 –Effect of pH (A) and temperature (B) on the fibrinolytic of <i>P. ostreatoroseus</i> in GYP medium.....	52
Figure 2 – Effect of pH (A) and temperature (B) stability on the fibrinolytic activity of <i>P. ostreatoroseus</i> in GYP medium.....	52
CAPÍTULO 2.....	58
Figura 1 – Substratos utilizados na fermentação no estado sólido: (A) <i>Dioscorea alata</i> (Inhame roxo) e (B) <i>Goeppertia allouia</i> (ariá).....	62
Figura 2 – Efeito do pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade fibrinolítica de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em DA+FT e AR+FT (80:20).....	70
Figura 3 – Efeito da estabilidade ao pH (A) e da temperatura (B) sobre a atividade fibrinolítica de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em DA+FT e AR+FT (80:20).....	71
Figura 4 – Efeito de inibidores na atividade de proteases fibrinolíticas de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> nos extratos de DA+FT e AR+FT (80:20).....	72
Figura 5 – Efeito de íons metálicos na atividade de proteases fibrinolíticas de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> nos extratos de DA+FT e AR+FT (80:20).....	73
CAPÍTULO 3.....	78
Figura 1 – Esquema do processo de obtenção do bioproduto.....	84

Figura 2 – Características morfológicas típicas das farinhas (A) PGT e (B) PDT.....	94
---	----

ANEXOS.....132

Figura 1 – Aceite da Revista para publicação.....	132
---	-----

Figura 2 – Processo da submissão do segundo artigo enviado a Revista Bioprocess and Biosystems Engineering.....	132
---	-----

Figura 3 – (A) e (B) Identidade visual da farinha nutracêutica de cogumelo e ariá – embalagem frente e verso. (C) e (D) Identidade visual da farinha nutracêutica de cogumelo e inhame roxo – embalagem frente e verso.....	132
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura padrão dos principais fatores de ativação da cascata de coagulação.....	21
Tabela 2 – Alimentos fermentados por microrganismos com atividade fibrinolítica.....	34
Tabela 3 – Misturas de substratos utilizados na fermentação em estado sólido.....	38
Tabela 4 – Componentes do bioproduto Padrão e da Farinha nutracêutica a base de biomassa de Cogumelo <i>P. ostreatoroseus</i> e tubérculos amazônicos suplementados com farelo de trigo.	43

CAPÍTULO 147

Table 1 – Qualitative and quantitative activity of fibrinolytic proteases from <i>P. ostreatoroseus</i> produced by submerged fermentation in different culture media.....	51
Table 2 – Effect of metal ions and inhibitor substances on the activity of fibrinolytic proteases of <i>P. ostreatoroseus</i>	52

CAPÍTULO 2.....58

Tabela 1 – Misturas de substratos utilizados na fermentação em estado sólido nos tubérculos amazônicos.....	63
Tabela 2 – Atividade fibrinolítica e proteolítica específica de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivados em tubérculos tropicais <i>D. alata</i> e <i>G. allouia</i> (ariá) na proporção 100:10.....	66
Tabela 3 – Atividade fibrinolítica e proteolítica dos extratos brutos de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em tubérculos amazônicos de <i>D. alata</i> suplementados com farelo de arroz ou farelo de trigo.....	68
Tabela 4 – Atividade proteolítica e fibrinolítica dos extratos brutos de <i>P. ostreatoroseus</i> cultivado em tubérculos amazônicos de <i>G. allouia</i> suplementados com farelo de arroz ou farelo de trigo.	69

CAPÍTULO 3.....78

Tabela 1 – Componentes do bioproduto Padrão e da Farinha nutracêutica a base de biomassa de Cogumelo <i>P. ostreatoroseus</i> e tubérculos amazônicos suplementados com farelo de trigo.	83
Tabela 2 – Atividade fibrinolítica e proteolítica quantitativa específica dos bioprodutos.....	91
Tabela 3 – Propriedades tecnológicas dos bioprodutos.....	92

Tabela 4 – Composição centesimal dos bioprodutos, valores médios expressos em base seca...	94
Tabela 5 – Composição de macro e micro minerais dos bioprodutos elaborados.....	97
Tabela 6 – Determinação do pH e acidez total titulável dos bioprodutos.....	101
Tabela 7 – Atividade prebiótica do extrato das farinhas nutracêuticas elaboradas.....	101
Tabela 8 – Atividade de Inibição da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGC _o AR).....	103
Tabela 9 – Informação nutricional do bioproduto de ariá com adição de cogumelo comestível <i>P. ostreatoroseus</i>	105
Tabela 10 – Informação nutricional do bioproduto de inhame roxo e adição de cogumelo comestível <i>P. ostreatoroseus</i>	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DA: <i>Dioscorea alata</i>	38
AR: <i>Goeppertia allouia</i>	38
FA: Farelo de arroz.....	38
FT: Farelo de trigo.....	38
GT - Tubérculo <i>Goeppertia allouia</i> (Ariá) e farelo de trigo.....	38
DT - Tubérculo <i>D.alata</i> (Inhame roxo) e farelo de trigo.....	38
PGT: Farinha de Biomassa de <i>P. ostratoroseus</i> + <i>Goeppertia allouia</i> (ariá) + Farelo de trigo (80:20).....	43
PDT: Farinha de Biomassa <i>P. ostreatoroseus</i> + <i>D. alata</i> (inhame roxo) + Farelo de trigo (80:20).....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Fatores de Coagulação sanguínea	20
2.1.1 Hemostasia	20
2.1.2 Cascata de Coagulação Sanguínea	21
2.2 Distúrbios no processo de coagulação sanguínea	23
2.2.1 Trombose.....	23
2.3 Proteases com ação no Sistema Fibrinolítico	24
2.3.1 Enzimas proteolíticas	24
2.3.2 Enzimas fibrinolíticas e fibrinólise	25
2.4 Microrganismos como fonte de enzima fibrinolítica	28
2.5 Espécies de cogumelos com potencial biotecnológico	29
2.5.1 <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> Singer	29
2.6 Fermentação em estado sólido	30
2.7 Tubérculos – Plantas alimentícias não convencionais (PANCs)	30
2.7.1 <i>Dioscorea alata</i> L. (Inhame roxo)	31
2.7.2 <i>Goeppertia allouia</i> (Aubl.) Borchs. & S. Suárez (Ariá)	32
2.8 Alimentos como fonte de enzimas fibrinolíticas	33
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 Cultivo e Manutenção de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	37
4.2 Preparação da Cultura Matriz	37
4.3 Fermentação Submersa	37
4.3.1 Preparação de meio líquido	37
4.3.2 Seleção de meio de cultivo líquido para produção de proteases fibrinolíticas.....	37
4.4 Fermentação no Estado Sólido utilizando polpas de tubérculos como substratos.....	38
4.4.1 Tratamento dos tubérculos Amazônicos	38
4.4.2 Crescimento de <i>P. ostreatoroseus</i> em polpa de tubérculos Amazônicos.....	38
4.4.3 Fermentação submersa: obtenção de massa micelial para utilização como inóculo ...	39
4.4.4 Fermentação no estado sólido	39

4.4.4.1 Determinação do efeito da idade do inóculo na produção de enzimas fibrinolíticas por fermentação no estado sólido.....	39
4.5 Extração das enzimas fibrinolíticas do substrato.....	39
4.6 Diálise do extrato bruto.....	39
4.7 Determinação da Atividade Quantitativa das Proteases	40
4.8 Determinação de Proteínas totais.....	40
4.9 Determinação da atividade fibrinolítica qualitativa em placa de fibrina	40
4.10 Determinação da atividade fibrinolítica quantitativa	41
4.11 Caracterização bioquímica das proteases fibrinolíticas	41
4.11.1 Efeito do pH e da Temperatura na atividade de Protease Fibrinolítica	41
4.11.2 Efeito do pH e da Temperatura na Estabilidade da Protease Fibrinolítica	42
4.11.3 Efeito de Íons e inibidores na atividade enzimática fibrinolítica	42
4.12 Elaboração do bioproduto formulado com polpa de tubérculo fortificado com massa micelial de <i>P. ostreatoroseus</i>	42
4.12.1 Matéria-prima.....	42
4.13 Caracterização do bioproduto	43
4.13.1 Determinação da Atividade de água (aW) do bioproduto.....	43
4.13.2 Determinação do índice de absorção de água e índice de solubilidade em água. ..	43
4.13.3 Determinação da capacidade de Intumescimento.....	44
4.14 Caracterização nutricional e físico-química	44
4.14.1 Determinação da composição centesimal do bioproduto.....	44
4.15 Caracterização funcional do bioproduto	45
4.15.1 Determinação da atividade de inibição de 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGROs), Sigma-Aldrich®.....	45
4.15.2 Efeito prebiótico <i>in vitro</i> do bioproduto.....	46
4.16 Caracterização microbiológica do bioproduto	46
4.16.1 Avaliação da qualidade microbiológica do bioproduto	46
4.17 Análise Estatística.....	46
CAPÍTULO 1	47
Production and partial characterization of a new fibrinolytic protease from salmon oyster mushroom from Amazonia	48
CAPÍTULO 2	58
Cogumelo ostra salmão cultivado em tubérculos amazônicos como fonte de enzimas fibrinolíticas.....	58
Introdução	59
Material e Métodos	61

Cultivo e Manutenção de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	61
Obtenção da Cultura Matriz	61
Inóculo.....	61
Obtenção e tratamento dos substratos utilizados na fermentação no estado sólido	61
Fermentação no estado sólido	62
Influência da Idade do Inóculo na síntese de proteases fibrinolíticas	62
Avaliação da suplementação na produção de enzimas fibrinolíticas	62
Extração das enzimas fibrinolíticas.....	63
Diálise do extrato bruto	63
Determinação da atividade proteolítica.....	63
Determinação de proteínas totais	64
Determinação da atividade fibrinolítica	64
Caracterização bioquímica das proteases fibrinolíticas	64
Efeito do pH e da temperatura na atividade fibrinolítica	64
Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da protease fibrinolítica.....	65
Efeito de Íons e inibidores na atividade enzimática fibrinolítica	65
Análise Estatística	65
Resultados e discussão.....	65
Idade do Inóculo.....	65
Conclusão.....	73
Agradecimentos	74
Referências.....	74
CAPÍTULO 3	78
Farinha nutracêutica de cogumelo ostra salmão e tubérculos amazônicos: fonte de enzimas fibrinolíticas, potencial hipocolesterolêmico e prebiótico.....	78
Resumo	78
Introdução	80
Material e Métodos	82
Cultivo e Manutenção de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	82
Obtenção da Cultura Matriz	82
Inóculo.....	82
Obtenção e tratamento dos substratos utilizados na fermentação no estado sólido	82
Fermentação no estado sólido (FES).....	83
Elaboração de bioproduto formulado com polpa de tubérculo fortificado com massa micelial de <i>P. ostreatoroseus</i>	83

Matéria-prima.....	83
Extração das enzimas fibrinolíticas do bioproduto	85
Caracterização do bioproduto.....	85
Determinação da Atividade Quantitativa das Proteases do bioproduto	85
Determinação de Proteínas totais do bioproduto.....	86
Determinação da atividade fibrinolítica quantitativa da farinha	86
Determinação da Atividade de água (aW) do bioproduto.....	86
Determinação do índice de absorção de água e índice de solubilidade em água	87
Determinação da capacidade de Intumescimento	87
Caracterização nutricional e físico-química	88
Determinação da composição centesimal do bioproduto	88
Determinação de macro e micro minerais.....	88
Caracterização funcional do bioproduto	89
Determinação da atividade de inibição de 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGROs), Sigma-Aldrich®	89
Efeito prebiótico <i>in vitro</i> do bioproduto.....	89
Caracterização microbiológica do bioproduto	90
Avaliação da qualidade microbiológica do bioproduto	90
Análise Estatística	90
Resultados e discussão.....	90
Caracterização enzimática do bioproduto	90
Caracterização tecnológica, nutricional e físico-química	92
Caracterização funcional do Bioproduto.....	101
Atividade Prebiótica.....	101
Determinação da atividade de inibição de 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGROs), Sigma-Aldrich®	103
Caracterização microbiológica do bioproduto	104
Conclusão.....	107
Agradecimentos	107
Referências.....	107
6 CONCLUSÃO.....	118
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119
8 ANEXOS	131

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são alimentos integrantes da dieta humana e se destacam como fontes de fibras, proteínas, vitaminas, aminoácidos essenciais e lipídios. Além do seu valor nutricional, seu consumo equilibrado está associado a diversos benefícios à saúde humana, incluindo a redução dos níveis de colesterol, e a modulação da microbiota intestinal devido à ação probiótica, entre outros efeitos benéficos que causam ao organismo (Barzee *et al.*, 2021; Chugh *et al.*, 2022).

Além da sua relevância nutricional, os cogumelos comestíveis possuem notável capacidade biotecnológica, sendo eficazes na síntese de diferentes enzimas com aplicação na indústria de alimentos, têxtil e farmacêutica. Embora a maioria das pesquisas se concentrem em fontes bacterianas ou fúngicas convencionais para obtenção de enzimas, negligenciando o estudo dos macrofungos (Bano *et al.*, 2018; Cardoso *et al.*, 2022, Santana *et al.*, 2023).

Nesse contexto, os macrofungos constituem uma alternativa eficaz na degradação de coágulos sanguíneos. Esse cenário reflete o aumento da demanda por biocatalisadores na indústria farmacêutica e alimentícia. De forma mais ampla, o mercado global de enzimas microbianas tem crescido e pode atingir cerca de US\$ 302 bilhões até 2030, impulsionado pesquisas na busca por soluções biotecnológicas sustentáveis e inovadoras (Darbandi *et al.*, 2024).

Os cogumelos comestíveis apresentam grande potencial devido à sua capacidade em sintetizar enzimas extracelulares, em função dessa propriedade, diversas espécies estão sendo cultivadas em diferentes substratos para obtenção de enzimas ecologicamente corretas, entre as quais muitas dessas podem ter ação antitrombótica em doenças cardiovasculares (Salim *et al.*, 2021, Barzee *et al.*, 2021; Jamal *et al.*, 2025).

Dentre as enzimas com potencial biotecnológico, as proteases fibrinolíticas se destacam, por serem reconhecidas como agentes trombolíticos altamente eficazes na degradação de coágulos sanguíneos, devido a sua alta especificidade pela fibrina (Bano *et al.*, 2018; Diwan *et al.*, 2021; Singh e Shera, 2023). As enzimas fibrinolíticas desempenham um papel fundamental no sistema de hemostasia, auxiliando na dissolução de coágulos e na manutenção do fluxo sanguíneo, prevenindo danos teciduais e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares graves (Ghosh *et al.*, 2021; Kwaan *et al.*, 2021).

O crescente interesse pelo uso terapêutico dessas enzimas tem impulsionado a sua comercialização, segundo *Archive Market Research* (2025) há projeções de crescimento do mercado em US \$ 7,701.9 milhões para 2025. Estudos com espécies do cogumelo *Pleurotus*

revelaram resultados promissores quanto a atividade de proteases fibrinolíticas (Cardoso *et al.*, 2022; Santana *et al.*, 2023).

Entre as espécies desse gênero, *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. tem se destacado pela síntese de proteases em diversos substratos (Machado *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2020; Barbosa *et al.*, 2023). Entre os substratos que demonstraram ser fontes alternativas e sustentáveis para o cultivo de cogumelos foram os tubérculos *Dioscorea alata* (inhame roxo) ou *Goeppertia allouia* (Aubl.) Borchs. & S. Suárez (ariá), os quais apresentam viabilidade para produção de novos alimentos com ação funcional para dieta humana saudável (Teixeira *et al.*, 2016; Katrolia *et al.*, 2020; Moula Ali *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2021).

Diante do exposto, apesar dos avanços no estudo da atividade proteolítica dos cogumelos do gênero *Pleurotus*, a capacidade de *P. ostreatoroseus* na síntese de proteases fibrinolíticas ainda é pouco explorada. Além disso, há uma lacuna de pesquisas voltadas para a sua aplicação na formulação de alimentos funcionais, especialmente utilizando tubérculos amazônicos como substrato. Portanto, esta pesquisa teve como finalidade o desenvolvimento de um produto alimentício utilizando tubérculos nativos da Amazônia fortificado com massa micelial de *Pleurotus ostreatoroseus* como fonte de protease fibrinolítica, visando a promoção da saúde humana e ao desenvolvimento de novos alimentos funcionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fatores de Coagulação sanguínea

2.1.1 Hemostasia

O processo de hemostasia está relacionado aos mecanismos que garantem a fluidez sanguínea dentro dos vasos. Este processo fisiológico impede a formação de coágulos, consequentemente evitando os eventos hemorrágicos e trombolíticos (Sousa *et al.*, 2018; Nader *et al.*, 2019).

Os fatores vasculares devem estar em equilíbrio completo entre agentes pró-coagulantes, anticoagulantes e fibrinolíticos, havendo uma igualdade quanto ao número de plaquetas, resistência, contratilidade dos vasos, e equilíbrio na formação do coágulo, permitindo que o sangue permaneça líquido no interior dos vasos. O equilíbrio funcional dos diferentes agentes promotores da hemostasia é garantido por uma variedade de mecanismos, envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas e regulação de fluxo sanguíneo (Guyton *et al.*, 2021).

Quando todo o conjunto funciona de modo harmônico, ativando e desativando quando necessário, a hemostasia está mantida. No entanto, quando eventuais rompimentos ocorrem nos vasos, o sistema hemostático desencadeia mecanismos de contração dos vasos, formação de tampão plaquetário e coágulo sanguíneo, bem como o crescimento do tecido fibroso. Assim, quando os vasos sanguíneos são lesados ocorre um desequilíbrio no processo de hemostasia (Grimaldo-gómez, 2017; Negrier *et al.*, 2019).

Para garantir o equilíbrio, diversos fatores estão presentes nesse processo, como os fatores plasmáticos de coagulação, inibidores fisiológicos, sistema fibrinolítico, mecanismo antitrombótico, células endoteliais e plaquetas (Hashimoto *et al.*, 2006; Mandel *et al.*, 2022).

A hemostasia pode ser dividida em hemostasia primária e secundária. Na hemostasia primária ocorre a ação das plaquetas para a formação do tampão plaquetário quando o tecido é lesado, dessa forma parando o sangramento por meio da adesão, difusão, ativação e agregação plaquetária. Posteriormente, as plaquetas fornecem um local de encontro para as proteínas da cascata de coagulação. Estes eventos são regulados pelo nível de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) presente no interior das plaquetas, derivado da adenosina trifosfato (ATP) pela ação da fosfodiesterase (Gillespe; Doctor, 2021).

A hemostasia secundária é ativada pela ação dos fatores da cascata de coagulação para a formação da rede de fibrina. Todo princípio da cascata está baseado na ativação consecutiva

de fatores de coagulação, que pode se iniciar através de vias de ativação extrínsecas ou intrínsecas (Weisel e Litvinov, 2019; Nader *et al.*, 2019, Mandel *et al.*, 2022).

2.1.2 Cascata de Coagulação Sanguínea

Em 1964, Macfarlane, Davis e Ratnoff propuseram a hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue. Nesse evento fisiológico, a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica e inicia a partir de uma lesão ocasionada no tecido endotelial. Esse sistema compreende uma série de reações químicas entre várias proteínas que convertem pró-enzimas (zimógenos) em enzimas (proteases), são denominados fatores de coagulação que perpassam pelas vias de coagulação (Negrier *et al.*, 2019; Siilen *et al.*, 2021).

Para facilitar nos processos relacionados a coagulação, Biggs *et al.* (1975) estabeleceram uma nomenclatura padrão designada por algarismos romanos aos fatores de coagulação, que foram denominados por ordem de descoberta, bem como os fatores ativados são indicados pelo acréscimo da letra a (Tabela 1). Desse modo, após ativação, por exemplo, o fator XII é indicado por XIIa (Fischbach *et al.*, 1988).

Tabela 1 – Nomenclatura padrão dos principais fatores de ativação da cascata de coagulação.

Numeração	Fatores proteicos da coagulação
I	Fibrinogênio
Ia	Fibrina
II	Protrombina
IIa	Trombina
III	Fator-3-Plaquetário (tromboplastina tecidual)
IV	Cálcio
V	Fator Lábil (proacelerina, vitamina K dependente)
VII	Fator estável, Pró-Convertina
VIII	Fator Anti-hemofílico A (FAH)
IX	Fator Anti-hemofílico B (Fator Christmas)
X	Fator Stuart-Power
XI	Fator Anti-hemofílico C
XII	Fator Hageman
XIII	Fator estabilizador da fibrina

Fonte adaptada: Fischbach (1988), Negrier (2019).

A cascata de coagulação sanguínea tem como finalidade formar um coágulo no local em que o vaso sanguíneo foi lesado. O coágulo formado funciona como um tampão para evitar hemorragia, sendo que esta ação pró-coagulante fica restrita ao local da lesão. Neste

evento do sistema circulatório, também é desencadeada a ação de plaquetas, do sistema fibrinolítico, dos inibidores fisiológicos da coagulação e mecanismos antifibrinolíticos (Fischbach *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 2019; Chung *et al.*, 2023).

A cascata de coagulação se inicia através da ativação da via intrínseca e extrínseca que posteriormente se encontram formando a via comum. Na via intrínseca todos os fatores estão no plasma. A via extrínseca, por sua vez, é desencadeada pelo fator tissular, que não está presente no plasma e sim no componente extravascular. A via comum ocorre após a transformação da protrombina em trombina ou após a ativação do fator X (Laat-kremers *et al.*, 2020; Al-amer *et al.*, 2022; Domingues *et al.*, 2022).

Na via intrínseca ocorre a fase do contato, que envolve quatro proteínas distintas. A ativação do fator XII em XIIa, ocorre quando o fator XII é ativado pelo contato com alguma superfície carregada negativamente, o sangue ao entrar em contato com o colágeno da parede vascular altera a conformação do fator XII (Figura 1). Na ativação do XII em XIIa necessita da participação do cininogênio de alto peso molecular (HMWK = *high molecular weight kinogen*) e a pré-caliceína, proporcionando um *feedback* positivo (Fischbach *et al.*, 1988; Ong *et al.*, 2018; Vanzweden *et al.*, 2022).

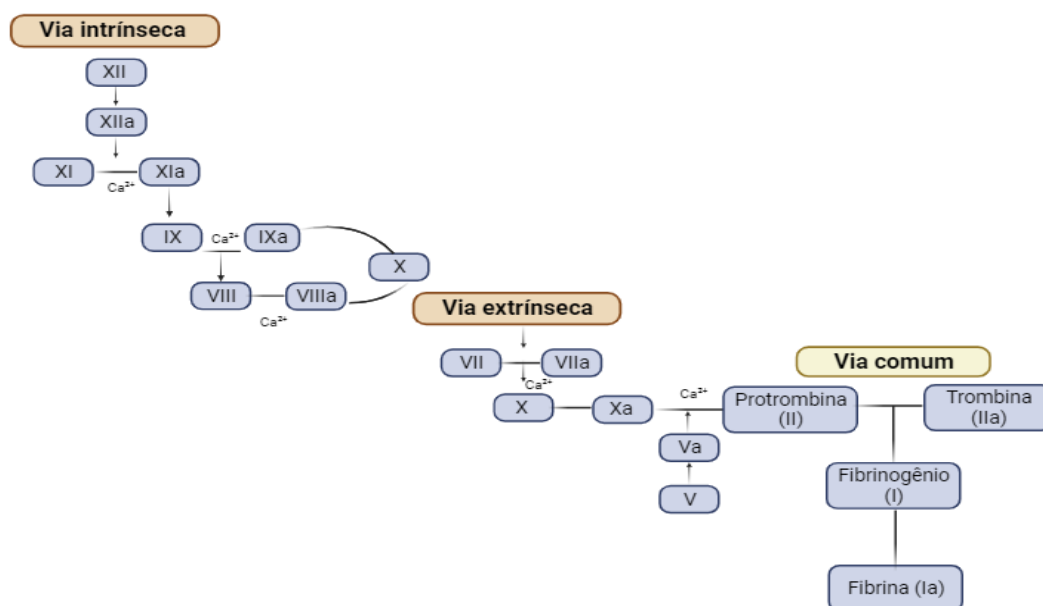


Figura 1 – Modelo da Cascata da coagulação sanguínea. Fonte: Próprio autor, figura adaptada de imagens criadas com BioRender.com.

O fator XIIa ativa o fator XI em XIa, o fator XI e a pré-caliceína necessitam de HMWK para proporcionar a adsorção da superfície em que está ligado o fator XIIa. Devido a interação destes elementos, ocorre a ativação do fator XI, que transforma o fator IX em IXa,

proporcionando a formação do complexo tenase intrínseca (complexo de superfície celular formado pelos fatores IXa e VIIIa) (Silva e Hashimoto, 2006; Ong *et al.*, 2022).

Assim, a via extrínseca se inicia devido os tecidos lesados liberarem a tromboplastina tecidual ou fator tecidual, formando um complexo juntamente com o fator VII que é principalmente mediado por fatores de íon cálcio. Com esse complexo formado sobre o fator X, proporciona a conversão no fator Xa. A partir dessas interações, as duas vias convergem se encaminhando para a via comum, que conduz o fator Xa convertendo protrombina (II) em trombina (IIa), na presença do fator V ativando em Va. A trombina, converte o fibrinogênio (fator I). Ao término da cascata na via comum, o fibrinogênio (I) é convertido em monômeros de fibrina (Ia) (Altaf *et al.*, 2021; Domingues *et al.*, 2022).

A fibrina é o produto da cascata de coagulação, sua produção a partir do fibrinogênio é o resultado desta ativação sucessiva de proteínas inativas, amplificadas a cada estágio, desta forma resultando em uma produção explosiva de fibrina que polimeriza ou se interliga para formar o coágulo de fibrina. Dessa forma, a consequência dessas ativações será a formação do coágulo. Posteriormente, os eventos secundários são a ativação das plaquetas havendo a adesão e agregação plaquetária, durante os primeiros segundos da lesão vascular (Peng *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2022).

A maioria dos fatores de coagulação circulantes são serinoproteases. Estas que são enzimas de clivagem semelhantes, mas diferindo pelo fato de que partem de substratos diferentes, estas circulam de forma inativa e em alta concentração. A limitação do ritmo do processo é a disponibilidade de uma superfície fosfolipídica apropriada para a união e a ativação da proteína de coagulação (Diwan *et al.*, 2021; Gillespe e Doctor, 2021; Wu *et al.*, 2023).

2.2 Distúrbios no processo de coagulação sanguínea

2.2.1 Trombose

Quando o sistema hemostático não funciona como o esperado, a hemostasia não ocorre e coágulos sanguíneos ou “trombos” são formados pelo acúmulo no sangue de uma serina protease. Essas enzimas, como a plasmina, bloqueiam veias ou artérias, limitando o fluxo sanguíneo, ocasionando inchaço e dor na região, causando diversas doenças vasculares (Hu *et al.*, 2019; Roth *et al.*, 2020).

A trombose pode ser classificada como aguda ou crônica. Na trombose aguda o corpo utiliza mecanismos para a dissolução dos coágulos sanguíneos que causam a obstrução do vaso. Na trombose crônica o coágulo natural não é dissolvido, deixando sequelas no interior

das veias e/ou artérias. Devido a essa falha, o fluxo sanguíneo é prejudicado ocasionando inchaços e outras complicações (Addi *et al.*, 2018; Hanff *et al.*, 2020; Mackman *et al.*, 2020).

Entre outras formas de classificações de trombozes, podemos citar a trombose venosa que está relacionada com a coagulação do sangue no interior das veias. Esta é subdividida em: trombose venosa profunda (TVP), que está relacionada com a coagulação do sangue no interior de uma veia profunda do corpo, frequentemente nos membros inferiores. E em tromboflebite, geralmente ocasionada devido a coagulação em veias superficiais, geralmente no braço ou na perna. Além disso, esta doença também acomete artérias e câmaras do coração, ocasionando trombose arterial e intracardíaca, respectivamente (Abas-osman *et al.*, 2018; Kruger *et al.*, 2019; Kirkilesis *et al.*, 2022; Campos e Reis, 2022).

Durante a pandemia da Covid-19 causada pelo “*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2*” (SARS-CoV-2), inúmeros pacientes foram acometidos por diferentes fisiopatologias, em destaque, a trombose que causa hipercoagulação e obstrução dos vasos sanguíneos, induzindo a um estado protrombótico eminente, contribuindo significativamente para a taxa de mortalidade e morbidade (Hanff *et al.*, 2020; Mandel *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2022).

Estudos mostraram que, de um total de 184 pacientes, houve 31% de incidência de casos trombóticos, incluindo diversas complicações como embolia pulmonar, trombose venosa profunda, acidente vascular cerebral isquêmico e embolia arterial sistêmica (Klok *et al.*, 2020; Page *et al.*, 2021). Connors e Levi (2020) afirmaram que, nos processos celulares, há mecanismos pró-coagulantes que podem ser estimulados positivamente durante a COVID 19. Dentre os mecanismos, podemos citar as enzimas fibrinolíticas, capazes de atuar durante a fibrinólise, garantindo a vasoconstrição e a dissolução de coágulos sanguíneos.

2.3 Proteases com ação no Sistema Fibrinolítico

2.3.1 Enzimas proteolíticas

As proteases ou peptidases são classes de hidrolases que clivam as cadeias peptídicas nas proteínas. A enzima extracelular catalisa a hidrólise de grandes moléculas de proteínas em moléculas menores que são absorvidas pelas células. A protease intracelular desempenha um papel fundamental na regulação do metabolismo (Shankar *et al.*, 2021).

Essas enzimas se destacam por serem um grupo importante de biocatalisadores, com alto valor econômico e aplicabilidade, representando 70% do mercado mundial de enzimas. Dentre as diferentes fontes disponíveis, as proteases de origem fúngica têm relevância

principalmente devido à sua utilização em diversos setores industriais, como na indústria de farmacêuticos, detergentes, couro e alimentos (Naeem *et al.*, 2022).

Além disso, as proteases fúngicas apresentam muitas vantagens entre as opções do mercado de enzimas, pois possuem alta especificidade por substratos, sítio ativo, mecanismos catalíticos, estabilidade em diferentes pH e temperaturas, gerando menores custos, principalmente por serem ecologicamente corretas, e consequentemente reduzindo o impacto ambiental (Omrane *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2020).

O caráter biotecnológico dessas enzimas é notório, estando entre os maiores grupos de enzimas industriais do mundo. Esse mercado tem crescido continuamente e estima-se que atinja até \$ 13.250 bilhões em 2025 com taxa anual de crescimento de 14%. Assim, se espera que a taxa de consumo e o aumento da procura por esses biocatalisadores aumente significativamente até 2027, atingindo até \$ 17,7 bilhões de dólares (Maghraby *et al.*, 2023).

Há uma infinidade de microrganismos que efetuam a proteólise para efeitos de sobrevivência e crescimento (Christensen *et al.*, 2022). Ao longo dos anos, os cogumelos se mostraram vantajosos, e se destacaram na síntese enzimática desses biocatalisadores em diversas condições, como reportados por Machado *et al.* (2017), Martim *et al.* (2017), Barbosa *et al.* (2020), Pimenta *et al.* (2021) utilizando diferentes espécies do gênero *Pleurotus*.

Esses organismos podem sintetizar diversos tipos de proteases, gerando consequentemente o processamento e conversão em produtos com inúmeras aplicabilidades. Devido a grande diversidade e especificidade, as proteases fúngicas estão sendo amplamente utilizadas no desenvolvimento de agentes terapêuticos eficazes. Como os reportados por Pawar *et al.* (2023) em pesquisas recentes que relataram que o fibrinogênio, a fibrina e o coágulo sanguíneo foram hidrolisados eficazmente por proteases obtidas de fungos.

2.3.2 Enzimas fibrinolíticas e fibrinólise

O processo de dissolução dos coágulos sanguíneos reconhecido como fibrinólise desencadeia a ativação do sistema fibrinolítico, sendo este regulado através de enzimas proteolíticas e inibidores de proteases (Lin *et al.*, 2020). Enzimas fibrinolíticas atuam catalisando a degradação da fibrina, o componente proteico principal dos coágulos sanguíneos. O sistema de dissolução dos coágulos é estabelecido devido a presença da plasmina, que está presente no sangue na sua forma inativa como plasminogênio (Urano *et al.*, 2018; Altaf *et al.*, 2021).

O plasminogênio é uma glicoproteína com 790 aminoácidos de síntese hepática, reconhecido como uma pró-enzima ou zimogênio inativo, apresentando sete domínios proteicos. A concentração do plasminogênio geralmente aumenta em processos inflamatórios, por esse motivo é considerada uma proteína de fase aguda. No entanto, o plasminogênio somente adquire atividade enzimática quando convertido em plasmina (serino protease) pelos ativadores de plasminogênio (Silva e Hashimoto, 2006; Schreuder *et al.*, 2020).

A ativação do plasminogênio é regulada por duas enzimas, sendo o ativador de plasminogênio tipo uroquinase ou uPA (*urokinasetype plasminogen activator*), que é uma serina protease de 50kDa sintetizado por células endoteliais, musculares e epiteliais, e seu receptor uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*), ou ativador de plasminogênio tipo tecidual tPA (“tissue-type plasminogen activator”), que é um dos principais ativadores de plasminogênio, principalmente associado ao coágulo do meio intravascular. O tPA têm sua ação enzimática bastante aumentada na presença da fibrina, e consequentemente na degradação da rede de fibrina (fibrinólise) (Medcalf *et al.*, 2021).

Existe uma infinidade de inibidores fisiológicos do sistema fibrinolítico localizados no sangue circulante, nas células sanguíneas, nos tecidos e na matriz celular. Destacando os inibidores das serino proteinases (SERPINs) estão presentes o PAI-1 e PAI-2, no processo de inibição ou inativação dos ativadores de plasminogênio. O PAI-1 considerado o principal supressor do sistema fibrinolítico, sintetizado no fígado, no baço, e no tecido adiposo está presente no sangue circulante, atua na regulação do tPA e uPA (Huebner *et al.*, 2018; Shereuder *et al.*, 2020, Yaron *et al.*, 2021).

A maior concentração de PAI-1 está nos grânulos alfa das plaquetas. A secreção do PAI-1 é estimulada por citocinas, fatores de crescimento e proteínas de respostas inflamatórias, o PAI-1 tem função a adesão e na migração celular. O PAI-2 é sintetizado por monócitos, macrófagos e células epiteliais (Wojta *et al.*, 2020; Yaron *et al.*, 2021; Vanzweden *et al.*, 2022).

Desse modo, quando um tecido lesionado apresenta a produção excessiva de fibrina, as reações de fibrinólise são desencadeadas como processo contrário à cascata de coagulação. Neste evento do sistema circulatório, uma complexa cascata enzimática é desencadeada para formar os produtos da degradação da fibrina, atuando na dissolução dos coágulos sanguíneos visando restabelecer o fluxo sanguíneo do vaso obstruído por trombos, em fragmentos solúveis através de enzimas fibrinolíticas (Figura 2) (Kumar *et al.*, 2019, Medcalf *et al.*, 2021).

Nesse processo os ativadores de plasminogênio tPA e uPA atuam transformando a enzima inativa plasminogênio em plasmina ativa. A plasmina é uma serina protease, que restabelece o funcionamento vascular sanguíneo, realizando a dissolução dos coágulos. A plasmina como forma ativa do plasminogênio fraciona a fibrina em pequenos fragmentos, lisando efetivamente o coágulo de fibrina, formando os produtos da degradação da fibrina garantindo a dissolução do trombo (Figura 2) (Medcalf *et al.*, 2021; Altaf *et al.*, 2021).

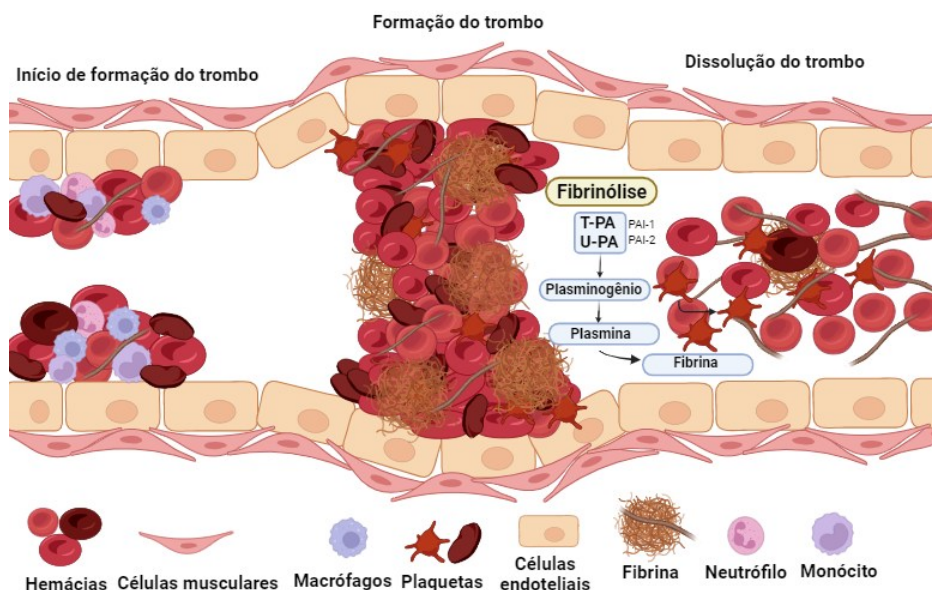


Figura 2 – Representação da ação de enzimas fibrinolíticas na dissolução do coágulo sanguíneo. Fonte: próprio autor, adaptada de Diwan *et al.* (2021), imagens criadas com BioRender.com.

Assim, as enzimas fibrinolíticas pertencem à classe de proteases, que se destacam quanto à ação na degradação de coágulos de fibrina. Essas enzimas são capazes de lisar os coágulos a partir da fibrinólise dos trombos sendo, portanto, compostos fundamentais no tratamento de trombose, doença responsável por 29% das mortalidades totais de pacientes (Silva *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2020).

Durante a pandemia do Coronavírus (COVID 19) houve notável piora em pacientes com hipercoagulabilidade sanguínea, devido a trombose nas veias superficiais e profundas, apresentando incidência superior a doenças respiratórias, como a embolia pulmonar (Ji *et al.*, 2020; Carfora *et al.*, 2021; Altaf *et al.*, 2021; Mandel *et al.*, 2022).

Desse modo, a compreensão da importância das proteases com ação fibrinolítica, pode levar a novos caminhos terapêuticos para o tratamento de uma gama diversificada de imunopatologias. Em destaque as metalo proteases e serino proteases representam as principais famílias de enzimas proteolíticas que atuam sobre a fibrina ou fibrinogênio, sendo

responsáveis pela redução do fibrinogênio no sangue e responsáveis pela lise dos coágulos de fibrina (Schereuder *et al.*, 2020; Yaron *et al.*, 2021; Shankar *et al.*, 2021).

2.4 Microrganismos como fonte de enzima fibrinolítica

Proteases com ação fibrinolítica proveniente de recursos biológicos, identificados e estudados ao longo dos anos (Zang *et al.*, 1995; Ianucci *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2021; Salim *et al.*, 2021). Dentre estes biocatalisadores, enzimas fibrinolíticas microbianas têm se destacado devido à sua atividade, diversidade bioquímica, baixo custo, viabilidade de aumento de escala e modificação genética através de abordagens biotecnológicas (Kotb, 2014; Sharma *et al.*, 2021).

A diversidade microbiana tem sido explorada com a finalidade de identificar fontes potenciais para a produção de enzimas proteolíticas, tendo em vista a capacidade de excreção de metabólitos (Cardoso *et al.*, 2022). Espécies de bactérias provaram ser eficazes na terapia trombolítica ao longo dos anos, sendo que as fontes mais baratas desses agentes como estreptoquinase e a estafilocinase foram isoladas de *Streptococcus hemolyticus* e *Streptococcus aureus* por Collen e Nijnen (1994).

No entanto estudos biotecnológicos evidenciaram que outros microrganismos poderiam ser fontes potenciais de enzimas fibrinolíticas, a exemplo os fungos e as algas (Peng *et al.*, 2005; Barzkar *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022). Pesquisas demonstraram que estes seres sintetizam enzimas que tem ação na lise do trombo existente no interior do vaso sanguíneo, proporcionando de forma eficiente a dissolução do coágulo (Altaf *et al.*, 2021).

A síntese de enzimas fibrinolíticas por cogumelos ainda é inexplorada. No entanto, apesar da escassez de pesquisas com enfoque em cogumelos, Liu *et al.* (2014) e Choi *et al.* (2017), Santana *et al.* (2023) verificaram que *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus ferulae*, *Pleurotus eryngii* apresentaram potencial na síntese de enzimas fibrinolíticas. Esses macrofungos podem ser alternativas potenciais no tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao sistema circulatório, como a trombose.

O custo do processo de produção enzimático é o principal obstáculo à aplicação bem-sucedida a proteases fibrinolíticas na indústria. Nesse sentido, pesquisas vêm sendo realizadas para melhorar a expressão da enzima fibrinolítica, incluindo a seleção de um meio de cultura ideal, otimização das condições ambientais e entre outros parâmetros (Peng *et al.*, 2005; Diwan *et al.*, 2021).

2.5 Espécies de cogumelos com potencial biotecnológico

2.5.1 *Pleurotus ostreatoroseus* Singer

Popularmente conhecidos como “cogumelo ostra” ou “shimeji”, as espécies de *Pleurotus* spp. (Agaricales) são cogumelos comestíveis e possuem abrangência mundial, podendo ser encontrados em florestas temperadas, tropicais e subtropicais. Apresentando diferença na forma, tamanho e coloração variando do branco puro, intermediando entre o creme, castanho, amarelo e rosa (Barh *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2022).

Dentre os cogumelos comestíveis, *Pleurotus ostreatoroseus* Singer., se apresenta na natureza com basidioma carnoso de coloração rosa quando jovem e esbranquiçada ou amarelada após o envelhecimento. Como características morfológicas apresenta: véu ausente, lamelas não intervenosas e decurrentes, camada cortical de píleo com elementos de parede lisa, estipe excêntrica e lamelas decorrentes (Figura 3) (Putzke *et al.*, 2018).

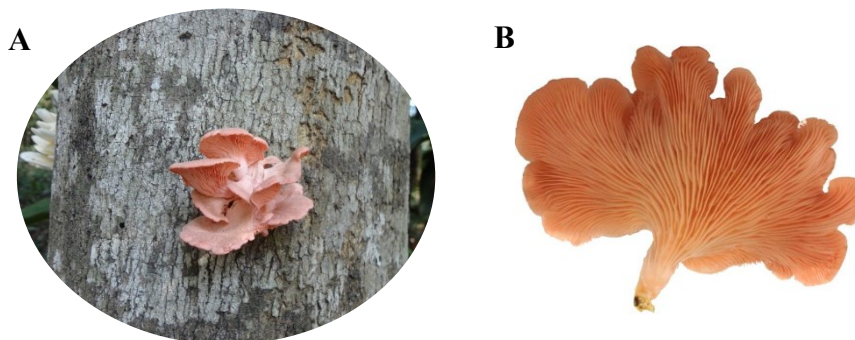


Figura 3 – (A) Conjunto de basidiomas de *P. ostreatoroseus* em tronco de árvore. (B) Basidioma sem presença de véu e lamelas decorrentes. Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke.

Popularmente reconhecido como “shimeji rosa” ou cogumelos ostra salmão, *P. ostreatoroseus* pode ser encontrado em florestas subtropicais, sob temperaturas superiores a 20°C. Singer descreveu pela primeira vez essa espécie a partir do material coletado no Parque Estadual de dois Irmãos (Mata Atlântica Brasileira), Recife, PE, Brasil (Salmones, 2017). Essa espécie é aceita como uma variedade de *Pleurotus djamor* por Lechner *et al.* (2004).

O cogumelo ostra salmão está sendo reconhecido por sua facilidade de crescimento em diferentes condições, por apresentar alta capacidade de produção de bioativos e ótimo sabor de corpo de frutificação (Barbosa *et al.*, 2020). Apresenta valiosas características nutricionais, sendo rico em proteínas, fibras, e baixo teor de lipídeos (Fonseca *et al.*, 2015; Machado *et al.*, 2017). Além disso, tem demonstrado ser uma excelente fonte biotecnológica de enzimas de alto valor econômico (Coelho *et al.*, 2021; Barbosa *et al.*, 2023).

Nos últimos anos, o interesse por verificar o potencial biotecnológico de *P. ostreatoroseus* têm ganhado notoriedade, devido as suas características fisiológicas. Foi

demonstrado por Machado *et al.*, (2017) e Barbosa *et al.* (2020) que este cogumelo pode ser promissor na síntese de enzimas proteolíticas, característica biotecnológica que pode favorecer o desenvolvimento de novos bioprodutos de valor agregado.

2.6 Fermentação em estado sólido

Enzimas com ação fibrinolítica podem ser produzidas por Fermentação semissólida ou Fermentação em Estado Sólido (FES) (Ali *et al.*, 2020). Neste bioprocessos o crescimento de microrganismos ocorre na superfície de substratos sólidos, apresentando a capacidade de se desenvolver na ausência ou pouca quantidade de água livre (Sadh *et al.*, 2018; Oiza *et al.*, 2022).

Essa tecnologia fermentativa permite o aproveitamento de resíduos orgânicos sólidos como substratos que apresentam características semelhantes ao ambiente natural para o desenvolvimento de microrganismos, principalmente devido a composição rica em açúcares fermentáveis e nutrientes que garantem a conversão em diversos produtos enzimáticos. Além disso, apresentam baixo requisito de energia e concentração de água (Cerdeira *et al.*, 2019; Vandenberghe *et al.*, 2021).

Outra aplicação da FES consiste na utilização de resíduos sólidos, principalmente devido à crescente produção de bioprodutos fortificados com microrganismos, proporcionando a conversão em produtos de valor agregado, garantindo ser um método financeiramente sustentável. Estes resíduos podem ser rentáveis, uma vez que são fontes ricas de nitrogênio e carbono (Sharma *et al.*, 2021; Chilakamarthy *et al.*, 2022).

Essa técnica garante alta capacidade de produção enzimática, apresentando maior estabilidade de enzimas às variações de pH e temperatura. A variedade de famílias de enzimas produzidas por FES geralmente são as proteases, lipases, celulasas entre outras. A produção dessas enzimas através da FES está em crescente expansão, com uma taxa média anual de crescimento de 4-5% (Sadh *et al.*, 2018; Oiza *et al.*, 2022; Chilakamarthy *et al.*, 2022).

Desse modo, a FES oferece oportunidades para uma maior eficiência de fermentação, com maiores concentrações e estabilidade do produto, redução da supressão catabólica, cultivo em substratos insolúveis em água, e agricultura combinada aos microrganismos, a exemplo dos fungos (Vandenberghe *et al.*, 2021).

2.7 Tubérculos – Plantas alimentícias não convencionais (PANCS)

Os tubérculos comestíveis ganharam notoriedade, sendo denominados como Plantas alimentícias não convencionais (PANCs). Kinupp (2006) denomina as PANCs como plantas

que apresentam uma ou mais partes que podem ser utilizadas na alimentação. A maioria dessas plantas se desenvolvem naturalmente no ambiente, não havendo a necessidade de manutenção agrícola para o sucesso do cultivo (Camargo *et al.*, 2023).

2.7.1 *Dioscorea alata* L. (Inhame roxo)

Entre os tubérculos comestíveis, os pertencentes ao gênero *Dioscorea* também denominadas de inhame, estão em destaque por apresentarem ótima composição nutricional, por serem alimentos versáteis disponíveis desde congelados, em pó ou como purês. Este gênero pertence à família Dioscoreaceae, que compreende as plantas trepadeiras tropicais que produzem tubérculos comestíveis de diferentes formas e tamanhos. Podem ser encontrados em regiões tropicais e subtropicais (Kaur *et al.*, 2021).

Nos últimos anos diversos estudos investigaram estes tubérculos de inhame, que demonstraram ter atividade antioxidante, anti-inflamatória, hipoglicêmica e antitumoral, auxiliando no tratamento de doenças cardíacas, (Padhan *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2023). Além disso, apresentaram outras funções incluindo o efeito de melhoria da memória e da cognição, o efeito prebiótico, neuroproteção e atividade imunomoduladora, e atividade farmacológica de largo espectro (Ma *et al.*, 2021; Lebot *et al.*, 2023).

Dioscorea alata L. é uma planta herbácea popularmente chamada de Inhame roxo que é cultivada no mundo todo, crescendo em solo com terras quentes ou úmidas. O Inhame roxo apresenta como características morfológicas a cor púrpura no seu interior com aparência de polpa densa e roxa, externamente áspera, apresentando variações de tamanho (Figura 4).

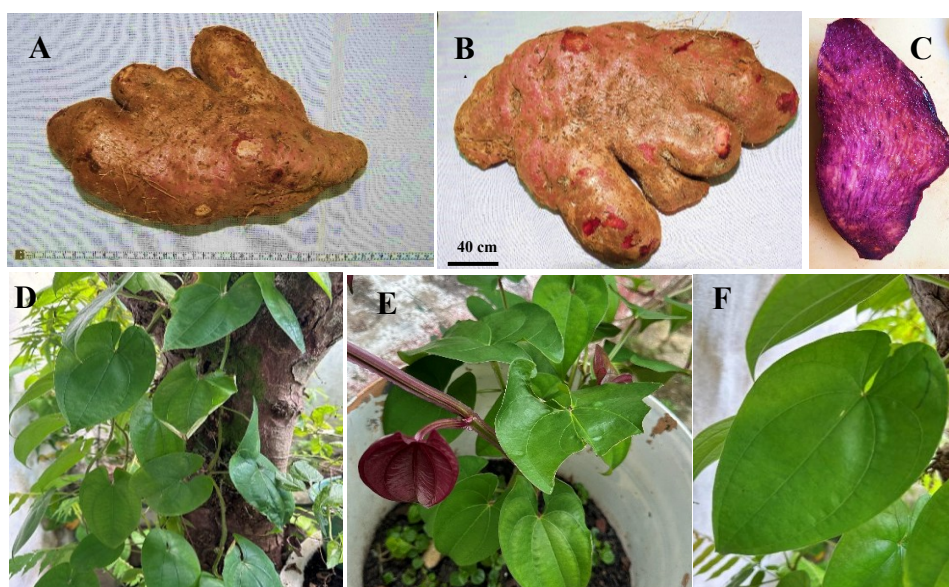


Figura 4 – Características morfológicas dos tubérculos (Imagem A, B, C) e, folhas (Imagem D, E, F) de *Dioscorea alata*. Fonte: próprio autor.

O sabor é ligeiramente doce, com sutis tons terrosos, textura macia e ligeiramente fibrosa. Os caules da *D. alata* são alados arroxeados com pecíolos longos, folhas verdes brilhantes e flores branco-amareladas. Além disso, são alimentos ricos em amido, excelentes fontes de carbono, fibra alimentar, vitaminas e macro (Ca, P, K e Mg) e micro minerais (Fe, Cu, Zn, Se e Mn), essenciais para a saúde do homem (Silva *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2021; Pouya *et al.*, 2022).

O solo deve ser bem drenado para um melhor crescimento da planta, mas por vezes também pode crescer em condições de seca independentemente das necessidades de água (Paramjeet *et al.*, 2018). O pH ótimo necessário para o crescimento máximo é de 6,2 a 7,0 (Pouya *et al.*, 2022).

A temperatura necessária para o crescimento de *Dioscorea* spp é de 25 °C a 30 °C. O tempo necessário para a para a formação de tubérculos é de 8 a 9 meses (Malaurie *et al.*, 1995), sendo a colheita é efetuada após 9 a 10 meses, quando a *Dioscorea alata* está completamente madura (Hochu *et al.*, 2006; Darkwa *et al.*, 2020).

2.7.2 *Goeppertia allouia* (Aubl.) Borchs. & S. Suárez (Ariá)

Goeppertia allouia (Aubl.) Borchs. & S. Suárez (Ariá) popularmente conhecida como ariá ou araruta-da-guiné antigamente chamado de é originário da América tropical por muitos anos identificada como *Calathea allouia* [Aubl.] Lindl (Joly, 1976), espécie muito cultivada como subsistência por indígenas e populações da região amazônica e da América tropical. Pertencente à família Marantaceae, pode atingir até 1 m de altura, com raízes tuberosas ovóides ou cilíndricas, de 2 a 8 cm de comprimento e 2 a 4 cm de diâmetro (Figura 5) (Bueno e Weigel, 1983; Teixeira *et al.*, 2016).

O ariá é reconhecido por apresentar raízes semelhantes a tubérculos, que são comestíveis e podem ser usadas para extrair amido ou consumidas cozidas na forma de purês, pães, bolos e biscoitos. No entanto, devido à falta de conhecimento sobre esta espécie, sua cultura é pouco explorada (Barros *et al.*, 2021).

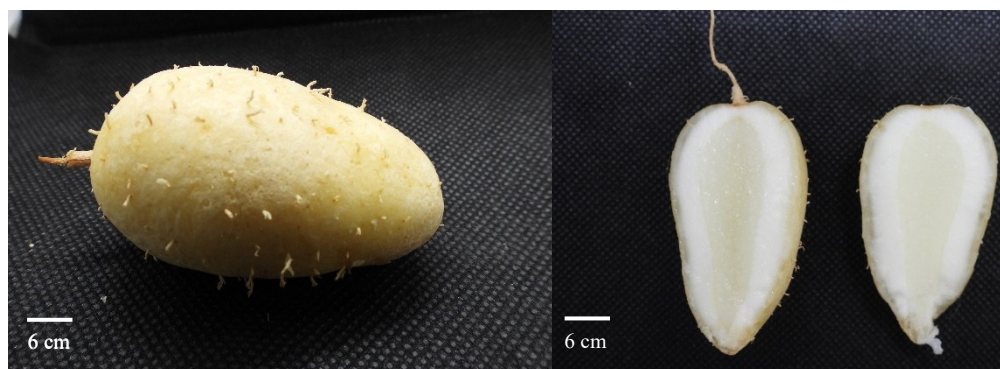


Figura 5 – Características morfológicas externas e internas de *Goeppertia allouia* (ariá). Fonte: próprio autor.

Esta espécie tem ampla distribuição, fácil adaptabilidade as condições climáticas e agroflorestais, com capacidade de propagação principalmente pelas divisões dos rizomas. O ciclo de produção varia de 6 a 9 meses, podendo chegar até 10 meses. O plantio pode ser realizado em covas com espaçamento de 1,5 x 1,0 m, e pode render de 1 a 3 kg/planta (Martin e Cabanillas, 1976, Marques *et al.*, 2019).

Bueno e Weigel (1983) citaram as espécies de ariá como fontes de aminoácidos. Nos estudos de Teixeira *et al.* (2016) foi verificado que *G. allouia* demonstrou ação prebiótica em efeito *in vitro*, bem como foi eficiente para a produção de farinhas como fontes de carboidratos, tripofano e valina.

Estudos recentes sobre a caracterização física e química de clones de ariá evidenciaram que o carboidrato foi o elemento com maior amplitude de concentração nas suas raízes, sendo menos calóricos do que a batata inglesa, batata doce e cará roxo. Além disso, são excelentes fontes de potássio, cálcio e ferro (Marques *et al.*, 2019). Apesar do grande potencial nutricional e de cultivo destes tubérculos e raízes provenientes da Amazônia brasileira, estes têm sido pouco valorizados e estudados ao longo dos anos (Barros *et al.*, 2021).

2.8 Alimentos como fonte de enzimas fibrinolíticas

Os hábitos modernos estão contribuindo para o desenvolvimento crescente e a conscientização sobre o consumo de alimentos saudáveis. Alimentos nutracêuticos apresentam diversos benefícios à saúde, sendo constituídos por nutrientes que potencializam, combatem, ou modificam funções fisiológicas ou metabólicas do homem. Nos últimos anos, o mercado de alimentos nutracêuticos tem sido avaliado em cerca de US \$ 117 bilhões, com aumento crescente esperado para os próximos anos devido à necessidade do consumidor de adquirir produtos para a manutenção da saúde e redução do risco de doenças (Alencar e Moraes, 2021; Neto, 2021).

Em decorrência dos benefícios que enzimas fibrinolíticas podem agregar, é possível inclui-las também na dieta humana, através de alimentos fermentados que são capazes de induzir atividade fibrinolítica (Katrolia *et al.*, 2020; Ali *et al.*, 2020). Pesquisadores no mundo inteiro iniciaram estudos que investigam a ação dessas enzimas fibrinolíticas, pois estas têm se destacado como fontes promissoras na prevenção de doenças fisiopatológicas (Devaraj e Halami, 2021).

Diversos alimentos fermentados de origem asiática como *natto*, *tofu*, *douchi*, dentre outros, são produzidos através da fermentação por bactérias e fungos, esses produtos têm ganhado apreço do consumidor por terem múltiplos benefícios, pois possuem enzimas com atividade fibrinolítica que auxiliam no processo de coagulação sanguínea (Hu *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2020; Devaraj e Halami, 2021).

Dentre os organismos que dispõem destas enzimas, os fungos e bactérias tem sido consideradas fontes alternativas destes biocatalisadores por apresentar capacidade de produzir proteases com atividade fibrinolítica de forma extracelular, e atuar na ação antitrombótica em doenças cardiovasculares (Tabela 2).

Tabela 2 – Alimentos fermentados por microrganismos com atividade fibrinolítica.

Microrganismo	Alimento fermentado	Referência
<i>Flammulina velutipe</i> e <i>Roseofomes subflexibilis</i>	<i>Natto</i>	Okamura Matsui <i>et al.</i> (2003)
<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rice-koji</i>	Shirasaka <i>et al.</i> (2012)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Oncom</i> ,	Nailufar <i>et al.</i> (2016)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	<i>Oncom</i>	Kurnia <i>et al.</i> (2017)
<i>Bacillus subtilis</i> DC27	<i>Douchi</i>	Hu <i>et al.</i> (2019)
<i>Bacillus subtilis</i> G8	<i>Natto</i>	Pinontoan <i>et al.</i> (2020)
<i>Bacillus subtilis</i> GUTU09 (B9) e	<i>Natto</i>	Yang <i>et al.</i> (2021)
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BZ25		
<i>Rhizopus oryzae</i> FNCC 6078	<i>Tempeh</i>	Salim <i>et al.</i> (2021)
<i>Neurospora crassa</i>	Alimento fermentado (farelo de trigo e farinha de girassol)	Duan <i>et al.</i> (2022)

Fonte: próprio autor.

Os cogumelos também constituem uma fonte promissora para a avaliação do potencial fibrinolítico (Li *et al.*, 2021). Nos últimos anos, enzimas fibrinolíticas foram relatadas em corpos de frutificação e micélios de cogumelos medicinais e comestíveis, incluindo *P. ostretus*, *P. ferulae*, *P. eryngii* e em produtos alimentícios fermentados com *Fusarium* sp. (Ali *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). No entanto, dados de produção enzimática de cogumelos em alimentos fermentados são escassos.

Assim, alimentos fermentados podem ser fontes de enzimas fibrinolíticas, tendo em vista as atividades metabólicas dos microrganismos nestes alimentos, além de possuírem valor nutricional agregado, característica que traz benefícios à saúde humana (Sanlier *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2020). As enzimas de origem microbiana têm diversas aplicações nos vários

setores da indústria alimentar, incluindo os laticínios, a panificação, alimentação animal, os sumos de fruta e de vegetais, as bebidas e a confeitaria (Christensen *et al.*, 2022).

Ademais, as enzimas fibrinolíticas de fontes naturais, especialmente de alimentos fermentados, têm muitas vantagens porque a maioria delas tem a sua segurança verificada durante um longo período (Kim *et al.*, 2020). Embora existam vários estudos mostrando a introdução de cogumelo na forma de pó ou farinha, inexiste produtos advindos de alimentos fermentados produzidos por cogumelos que apresentem atividade fibrinolítica (Petraglia *et al.*, 2022; Okpara *et al.*, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um produto alimentício utilizando tubérculos nativos da Amazônia fortificado com massa micelial de cogumelo comestível como fonte de protease fibrinolítica para promoção da saúde humana.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de proteases fibrinolíticas em diferentes meios de cultura por *Pleurotus ostreatoroseus* biodiversidade amazônica;
- Desenvolver bioprodutos saudáveis formulados com polpa de tubérculos amazônicos (inhame-roxo ou ariá) fortificados com *P. ostreatoroseus*;
- Avaliar o efeito da idade do inóculo e de diferentes concentrações da polpa de tubérculos na síntese de enzimas fibrinolíticas por *P. ostreatoroseus*;
- Realizar a purificação das enzimas fibrinolíticas recuperadas do processo de fermentação em estado sólido e caracterizá-las bioquimicamente quanto ao pH, temperatura ótima, estabilidade ao pH, e ação de íons e inibidores;
- Determinar as características nutricionais e físico-químicas dos bioprodutos formulados com massa micelial de *P. ostreatoroseus*
- Determinar a ação hipocolesterolêmica e a ação prebiótica por fermentação no estado sólido utilizando polpa de tubérculos amazônicos fortificados com cogumelo comestível;
- Analisar a qualidade microbiológica do bioproduto alimentício obtido dos cultivos *P. ostreatoroseus* na polpa de tubérculos Amazônicos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e Manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus*

Para a realização desta pesquisa foi utilizado *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para obtenção de cultura pura, o cogumelo foi cultivado placas contendo ágar Batata Dextrose (BDA), com extrato de levedura 0,5 % (p/v). Os cultivos foram mantidos a 28 °C por oito dias, na ausência de luz e umidade à 60 %.

A espécie está implementada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional associado (SisGen) sob cadastro de Acesso nº AC60E82.

4.2 Preparação da Cultura Matriz

A cultura matriz foi preparada em ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), suplementados com extrato de levedura 0,5% (p/v), em placas de Petri de 90 mm x 12 mm. Os meios de culturas foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. As culturas foram mantidas a 25 °C, na ausência de luz, por oito dias, preparados em triplicata (Coelho *et al.*, 2021).

4.3 Fermentação Submersa

4.3.1 Preparação de meio líquido

Para a seleção do meio de cultura líquido foram preparados nos seguintes meios: GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), MGY (glicose, extrato de levedura e peptona) e Malte. Os meios foram suplementados com extrato de levedura 0,5 % (p/v) e esterilizados a 121 °C por 15 minutos, em triplicata.

4.3.2 Seleção de meio de cultivo líquido para produção de proteases fibrinolíticas

Para a realização da fermentação, em cada frasco de Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL dos meios líquidos foram transferidos, da cultura matriz (item 4.2), 15 discos miceliais de 8 mm de diâmetro. Os cultivos, em triplicata foram mantidos por oito dias, a 28 °C, 150 rpm (Barbosa *et al.*, 2020). A biomassa foi recuperada por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº 1. Os extratos enzimáticos obtidos nesta etapa foram submetidos a determinação da atividade fibrinolítica quali e quantitativa para seleção do meio de fermentação ideal para produção enzimática.

4.4 Fermentação no Estado Sólido utilizando polpas de tubérculos como substratos

4.4.1 Tratamento dos tubérculos Amazônicos

Os tubérculos de *Goeppertia allouia* (ariá) e *Dioscorea alata* (inhame roxo) foram obtidos em cultivo domiciliar localizado no bairro Planalto, na cidade de Manaus, Amazonas (3° 03' 58,0" S, 60° 03' 04,2" W). Após colheita, os tubérculos foram armazenados em caixas plásticas e conduzidos ao laboratório de Micologia Industrial e Médica, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os tubérculos sem danos físicos foram lavados em água corrente, submetidos à assepsia em solução de cloro 2% (v/v), pesados, descascados, cortados em cubos de 1x1 cm, estes foram submetidos a cocção por 5 min em água fervente. Em seguida, foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, e foram esterilizados a 121°C por 10 min para posteriormente serem utilizados nos experimentos subsequentes (Machado *et al.*, 2017).

4.4.2 Crescimento de *P. ostreatoroseus* em polpa de tubérculos Amazônicos

Para elaboração do bioproduto, *P. ostreatoroseus* foi cultivado na superfície de polpa de tubérculos de *Goeppertia allouia* (ariá) e *Dioscorea alata* (Inhame roxo), suplementados com farelo de arroz [FA] ou farelo de trigo [FT] em frascos de Erlenmeyer de 500 mL em diferentes proporções (Tabela 3). Como inóculo foi utilizado 10% da biomassa do cultivo obtido no item 4.3.2. Os cultivos foram mantidos a 25 °C, umidade ambiental 60%, na ausência de luz. O crescimento foi observado a cada 24 horas durante oito dias, sendo os experimentos realizados em triplicata (Pimenta *et al.*, 2021). Como padrão foi utilizado o tubérculo sem suplementação. Ao término da fermentação no estado sólido, em cada cultivo, foi determinada a atividade fibrinolítica em todas as misturas de substratos (item 4.10).

Tabela 3 – Misturas de substratos utilizados na fermentação em estado sólido.

Substrato	Proporção (g/g) (tubérculo:suplemento)	Substrato	Proporção (g/g) (tubérculo:suplemento)
DA	100:0	AR	100:0
DA+FA	90:10	AR+FA	90:10
DA+FA	80:20	AR+FA	80:20
DA+FA	70:30	AR+FA	70:30
DA+FT	90:10	AR+FT	90:10
DA+FT	80:20	AR+FT	80:20
DA+FT	70:30	AR+FT	70:30

DA: *Dioscorea alata*, AR: *Goeppertia allouia*, FA: Farelo de arroz, FT: Farelo de Trigo

4.4.3 Fermentação submersa: obtenção de massa micelial para utilização como inóculo

Para avaliar a influência da idade do inóculo na produção de proteases fibrinolíticas por *P. ostreatoroseus* foram utilizadas culturas com 6, 8, 10, 14, 20 dias de cultivo em meio sólido. De cada cultura foram retirados 15 discos miceliais de 8 mm e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio de cultura líquido, pH 5,6 (item 4.3.2). A fermentação submersa foi realizada a 28 °C, 150 rpm. A biomassa foi recuperada por filtração à vácuo utilizando papel de filtro Whatman n° 1.

4.4.4 Fermentação no estado sólido

4.4.4.1 Determinação do efeito da idade do inóculo na produção de enzimas fibrinolíticas por fermentação no estado sólido

Após oito dias a biomassa obtida na fermentação líquida (item 4.4.3) foi transferida para a polpa de tubérculos esterilizados de *Dioscorea alata* (DA) e *Goeppertia allouia* (GA), na proporção 100:10 [base úmida (polpa de batata: massa micelial %)]. Em cada frasco de Erlenmeyer de 500 mL contendo 100g de polpa de cada tubérculo foi utilizada biomassa recuperada da fermentação submersa. A fermentação em estado sólido foi conduzida a 28°C, oito dias, em estado estacionário. Ao término da fermentação, o extrato enzimático foi extraído conforme o item 4.5.

4.5 Extração das enzimas fibrinolíticas do substrato

As enzimas provenientes do bioprocessamento citado no item 4.4.2 e 4.4.4.1 foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção 1:5 (tubérculo miceliado/mL de água destilada esterilizada) em frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram mantidos em agitador orbital por 30 minutos a 180 rpm, a 28°C. Ao término desta etapa, os extratos brutos foram recuperados por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n° 1, seguido de filtração em membrana de polietersulfônica (0,22µm), centrifugados a 4000xg para obtenção do extrato bruto e para determinação das atividades enzimáticas subsequentes (Machado *et al.*, 2017).

4.6 Diálise do extrato bruto

Para realizar o processo de diálise, o extrato bruto foi transferido para o interior de uma membrana semipermeável em água deionizada e submetido a agitação. O extrato bruto

(10 mL) foi transferido para saco de diálise de 33 x 21 mm com porosidade de 25 Å, INLAB®. O extrato enzimático armazenado no saco de diálise foi imerso em 250 mL de tampão Tris-HCL, em Becker de 500 mL e mantido a 4 °C sob agitação em agitador orbital. Nesse experimento foram realizadas três trocas de tampão a cada 4 horas (Nascimento *et al.*, 2016). O extrato dialisado foi utilizado nos demais experimentos.

4.7 Determinação da Atividade Quantitativa das Proteases

Para determinação quantitativa das proteases foram adicionados 250 µL de solução de azocaseína 1 % (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2 em 150 µL de extrato bruto. Os tubos de reação foram incubados por 1 hora a 25 °C em câmara escura. Para a interrupção da reação foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v). Em seguida, foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 4000xg, a 4 °C. Posteriormente, de cada sobrenadante foram retirados 0,8 mL e transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. Como branco foi utilizada solução de azocaseína 1 % (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2 (Machado *et al.*, 2017). A leitura das amostras foi realizada a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora.

4.8 Determinação de Proteínas totais

O teor total de proteínas obtidas nos extratos enzimáticos foi estimado de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando Comassie brilliant blue G-250 e albumina de soro bovino albumina sérica bovina (BSA) como solução padrão. Nos ensaios foram utilizados 100 µL do extrato enzimático, adicionados a 2,5mL de reagente de Bradford, mantidos em câmara escura durante 60 minutos. A concentração de proteínas foi determinada com base numa curva padrão de BSA (Sigma-Aldrich®). Os testes foram efetuados em triplicata. A leitura das amostras foi realizada a 595 nm (Santana *et al.*, 2023).

4.9 Determinação da atividade fibrinolítica qualitativa em placa de fibrina

A atividade fibrinolítica da protease foi determinada qualitativamente de acordo com método da placa de fibrina descrito por Astrup e Mullertz (1952). As placas de fibrina foram preparadas contendo 0,015 mg de solução de trombina de plasma bovino (Sigma-Aldrich®) 101 NIH (U/mg), sendo 100 U/mL diluído em NaCl 10 mM. A solução de fibrinogênio foi preparada utilizando 0,025mg diluída em 2,5 mL de Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, essa

solução foi incubada a 37°C, em banho maria, por 10 minutos. A solução de agarose foi diluída em Tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. As soluções das reações foram misturadas e adicionadas em placas de Petri de poliestireno (90 x 15 mm). Após a polimerização da fibrina, foram perfurados quatro poços de 8 mm de diâmetro, em seguida adicionados 100 µL do extrato enzimático, estes foram incubados a 37°C por 18 horas. Para o controle positivo foi utilizado a Plasmina (Sigma-Aldrich®) diluída em tampão tris-HCl NaCl 0,1 M, pH 7,8. O controle negativo foi a solução de NaCl 0,15 M. Os resultados foram expressos a partir da formação de halos translúcidos de degradação, na formação de círculos líticos ao redor dos poços, em caso de atividade fibrinolítica positiva (Jeong *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2017).

4.10 Determinação da atividade fibrinolítica quantitativa

A atividade fibrinolítica quantitativa foi avaliada de acordo com o método de Wang *et al.* (2011), que se baseia na formação de um coágulo sanguíneo artificial em microtubos do tipo Eppendorf (Figura 6). A atividade fibrinolítica foi determinada através da degradação de fibrina. Para a preparação do trombo artificial foi utilizado 500µL da solução de fibrinogênio adicionados a 100 µL de trombina a 20 U/mL. Após a formação do coágulo, foram adicionados 100 µL do extrato enzimático, e mantidos a 37°C em banho-maria, durante 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 700 µL de ácido tricloroacético (10%) e esta solução foi centrifugada a 15.000 xg durante 10 min. O sobrenadante dos ensaios foi submetido à leitura em espectrofotômetro a 275 nm. Deste modo, 1 unidade de atividade fibrinolítica (FU) foi definida como a quantidade de enzima responsável por um aumento de 0,01 na absorbância por minuto.

4.11 Caracterização bioquímica das proteases fibrinolíticas

4.11.1 Efeito do pH e da Temperatura na atividade de Protease Fibrinolítica

Para a determinação do efeito do pH ótimo da enzima foi utilizado diferentes tampões a citar: acetato de sódio (pH 4,0-5,0), fosfato de sódio (pH 6,0-7,0), Tris-HCl (pH 8,0-9,0) e Carbonato-Bicarbonato (pH 10,0) durante 60 min. O efeito da temperatura foi determinado na faixa de 30 °C a 80 °C por 60 minutos. Ao término do tempo de incubação foi determinada a atividade enzimática fibrinolítica conforme descrito no item 4.10.

4.11.2 Efeito do pH e da Temperatura na Estabilidade da Protease Fibrinolítica

Para verificar da estabilidade ao pH, a enzima foi incubada nos tampões supracitados conforme o item 4.11.1, por 60 minutos, e sua atividade enzimática residual analisada. O efeito da temperatura na estabilidade da enzima foi avaliado por incubação do extrato enzimático em temperaturas variadas entre 30°C à 80°C. Para esta finalidade, alíquotas foram retiradas a cada 30 minutos em um período de 180 minutos e submetidas à determinação da atividade fibrinolítica (item 4.10).

4.11.3 Efeito de Íons e inibidores na atividade enzimática fibrinolítica

O efeito de diferentes íons metálicos na atividade enzimática foi avaliado em concentrações de íons equivalentes a 10,0 mM. A enzima foi incubada a 37°C durante 60 minutos com os seguintes sais: ZnSO₄, MgSO₄, CuSO₄, FeSO₄, CaCl₂, NaCl e KCl. Para a determinação do efeito de inibidores na atividade das proteases foi utilizado Etilenodiaminotetracético (EDTA 10,0 mM), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF 10,0 mM), ácido iodo acético 10,0 mM, pepstatina A 10,0 mM, e ácido iodoacético 10,0 mM. A enzima foi incubada durante 60 minutos a 37°C na presença dos inibidores. A mistura reacional, incluindo o controle, foi incubada durante 30 minutos nas condições ótimas de temperatura e pH. A atividade fibrinolítica foi mensurada como citado no item 4.10. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle incubado sem os inibidores ou íons metálicos, que correspondem a 100% de atividade (Martim *et al.*, 2017; Santana *et al.*, 2023). Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

4.12 Elaboração do bioproduto formulado com polpa de tubérculo fortificado com massa micelial de *P. ostreatoroseus*

4.12.1 Matéria-prima

Os bioprodutos foram originários da miceliação de *P. ostreatoroseus* nos tubérculos em *Dioscorea alata* L. e *Goepertia allouia* [Aubl.] Lindl suplementados com farelo de trigo (80:20). Sendo as siglas, PGT [Farinha de Biomassa *P. ostratoroseus* + *Goepertia allouia* (ariá) + Farelo de trigo (80:20 p/p)] ou PDT [Farinha de Biomassa *P. ostratoroseus* + *D. alata* (Inhame roxo) + Farelo de trigo (80:20)] (Tabela 4).

Como padrão foram utilizadas para fins de comparação com o bioproduto a farinha sem a adição do cogumelo investigado, sendo: Padrão [GT] - Tubérculo *Goeppertia allouia* (Ariá) e Farelo de trigo, Padrão [DT] - Tubérculo *D.alata* (Inhame roxo) e Farelo de trigo (Tabela 4).

Tabela 4 – Componentes do bioproduto Padrão e da Farinha nutracêutica a base de biomassa de Cogumelo *P. ostreatoroseus* e tubérculos amazônicos suplementados com farelo de trigo.

Bioproduto (Farinha nutracêutica)	Componentes	Quantidade
Padrão [GT]	Tubérculo <i>Goeppertia allouia</i> (Ariá)	80g
	Suplemento Farelo de trigo	20g
Padrão [DT]	Tubérculo <i>D.alata</i> (Inhame roxo)	80g
	Suplemento farelo de trigo	20g
PGT	Biomassa de <i>P.ostreatoroseus</i>	10g
	Tubérculo <i>Goeppertia allouia</i> (Ariá)	80g
	Suplemento Farelo de trigo	20g
PDT	Biomassa <i>P. ostreatoroseus</i>	10g
	Tubérculo <i>D. alata</i> (Inhame roxo)	80g
	Suplemento farelo de trigo	20g

GT: *Goeppertia allouia* (ariá) + Farelo de trigo (80:20); DT: *D. alata* + Farelo de trigo (80:20); PGT: Farinha de Biomassa de *P. ostratoroseus* + *Goeppertia allouia* (ariá) + Farelo de trigo (80:20); PDT: Farinha de Biomassa *P. ostreatoroseus* + *D. alata* + Farelo de trigo (80:20).

Os produtos fermentados foram acondicionados em placas de Petri 140 mm X 15 mm, para serem desidratados a 40°C por 24 horas, em desidratadora com controle de temperatura e circulação de ar forçado. Cada produto foi triturado em processador de alimentos para padronização da granulometria em peneira de alumínio de 60 mesh.

4.13 Caracterização do bioproduto

4.13.1 Determinação da Atividade de água (aW) do bioproduto

A determinação da atividade de água (aW) foi realizada em cada amostra do produto, em duplicata, no equipamento AQUALAB CX-2 T Braseq. A amostra a ser analisada foi disposta em uma cápsula circular de polietileno, cobrindo toda superfície. A atividade de água foi determinada pela leitura direta do equipamento após minutos do rastreamento de toda a amostra.

4.13.2 Determinação do índice de absorção de água e índice de solubilidade em água.

Os índices de absorção de água e solubilidade em água foram determinados de acordo com metodologia descrita por Beuchat *et al.* (1977) e Ruiz *et al.* (2006). Em tubo do tipo

Falcon, de peso conhecido, contendo uma grama de biomassa desidratada em pó foi misturado com 10 mL de água destilada, incubadas a 25 °C por 30 minutos. Seguida de centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos. O precipitado foi recuperado para determinação do peso da massa úmida e, o líquido sobrenadante recuperado transferido cuidadosamente para placa de Petri, pré-pesada, e evaporado em banho-maria a 100°C, e secagem em estufa a 105°C por três horas. O índice de absorção e de solubilidade foi determinado de acordo com a equação I e II, respectivamente:

$$\text{Equação I. Índice de Absorção de Água(g/g)} = \frac{\text{Peso do precipitado (g)}}{\text{Peso da biomassa desidratada (g)}}$$

$$\text{Equação II. Índice de Solubilidade em água (\%)} = \frac{\text{Peso dos sólidos dissolvidos no sobrenadante (g)}}{\text{Peso da biomassa desidratada (g)}} \times 100$$

4.13.3 Determinação da capacidade de Intumescimento

A capacidade de inchamento das farinhas, ou seja, a habilidade de absorver água e expandir quando aquecida foi determinada de acordo com o método descrito por Leach *et al.* (1959). Em cada tubo de ensaio foi adicionado um grama da amostra e 10 mL de água destilada. Esta mistura foi mantida a 80 °C por 30 minutos, sob agitação. Após atingir a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o peso da amostra aferido (pasta). O poder de intumescimento foi determinado conforme a equação III.

Equação III. Capacidade de inchamento (g/g) =

$$\frac{\text{Peso da pasta (g)}}{\text{Peso da biomassa desidratada (g)}}$$

4.14 Caracterização nutricional e físico-química

4.14.1 Determinação da composição centesimal do bioproduto

As análises de composição centesimal do cogumelo foram realizadas no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, Brasil, citadas a seguir:

Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar 105 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2005).

Proteína total: determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro Kjeldahl e aplicando o fator de conversão 4,28 [valor adotado para a determinação da

porcentagem de proteína para cogumelo, pois é admitido que apenas 70 % dos compostos nitrogenados existentes nesses fungos sejam digeríveis pelo organismo humano ($0,70 \times 6,25 = 4,38$) (Furlani *et al.*, 2007).

Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550 °C-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2005).

Lipídios: determinado de acordo com o método descrito por Bligh and Dyer (1959).

Fibras totais: A fibra bruta foi determinada através de digestão ácido-básica, segundo método de Weende estabelecido pela A.O.A.C (1997).

Carboidratos totais: estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, proteína, lipídios, cinzas (Latinfoods, 2002; NEPA, 2006).

Energia: a energia total metabolizável = (4 kcal/g de proteína) + (4 kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídeos), preconizados pelo Latinfoods, (2002) e Taco (2006).

4.14.2 Determinação de macro e micro minerais

A determinação dos minerais foi realizada conforme os métodos propostos pela Embrapa (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida desidratadas e submetidas a digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (3:1). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio; cálcio, magnésio, potássio, sódio cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de macronutrientes (Ca, P, Mg, K) foram calculados em g.kg⁻¹ e os dos micros (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg⁻¹.

4.15 Caracterização funcional do bioproduto

4.15.1 Determinação da atividade de inibição de 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA redutase (HMGROs), Sigma-Aldrich®

Para a determinação da inibição de 3-hidroxi-3-metil-glutaril coa redutase (HMGROs), os produtos alimentícios foram desidratados, triturados em pó (50 mg/ml) e misturados com álcool etílico absoluto para análise [etanol/água (1:1, v/v) ou metanol, P.A.]. As misturas foram agitadas em Vortex durante 1 minuto e centrifugado à 12000 rpm, durante 2 minutos, de acordo com a recomendação do fabricante. Os sobrenadantes foram utilizados como fonte de inibidores de HMGCROs, Sigma-Aldrich®. A determinação da atividade do HMGCR foi medida utilizando HMG-CoA Reductase Assay, Sigma-Aldrich®. A redução da

absorção foi determinada em 340 nm, que representa a oxidação do NADPH pela subunidade catalítica do HMGCR, na presença do substrato HMG-CoA.

Como controle positivo foi utilizada a Pravastatina, Sigma-Aldrich®, e como controle negativo, a solução de NaCl 0,2M, os controles foram considerados como 100% de atividade. Os ensaios foram realizados em duplicata (Gil-ramírez *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018).

4.15.2 Efeito prebiótico *in vitro* do bioproduto

A triagem do efeito prebiótico foi realizada com os bioprodutos, em caldo MRS em diferentes concentrações de extrato 0,1%, 0,25%, 0,5% (p/v). *Lactobacillus acidophilus* comercial (Roval®, Recife, Brasil) 10^8 (células/mL) 1000 µL foi inoculado em caldo MRS. A inulina comercial (Duefiber®, Cifarma, Brasil) foi utilizada como controle positivo e, o MRS sem adições como controle negativo. As amostras foram incubadas a 37 °C por 24 h, em condições anaeróbicas. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. O crescimento foi determinado a 600 nm em espectrofotômetro (Teixeira *et al.*, 2016).

4.16 Caracterização microbiológica do bioproduto

4.16.1 Avaliação da qualidade microbiológica do bioproduto

A determinação de mesófilos, coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. do produto alimentício foi realizada pelo método de diluição sucessiva como citada por Massaguer (2005) e Ali *et al.* (2016). De cada amostra do bioproduto desidratada e triturada foi utilizado 25 g para ser homogeneizado com 225 ml de água peptonada (diluição 10^{-1}). Desta suspensão foram preparadas diluições sucessivas, transferindo 1000 µL para 9000 µL de água peptonada 0,1 % (p/v), até obtenção da diluição 10^{-3} . As diluições foram submetidas a agitação por dois minutos em agitador de tubo. De cada diluição foi transferido 100µL para superfície de SS ágar modificado, Mannitol Salt ágar e EMB Levine ágar (Kasvi®).

4.17 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráficos e os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p > 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software Minitab® versão 19.0.

CAPÍTULO 1

Revista: *Brazilian Journal of Biology*
DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.289933>
(Artigo publicado)

Original Article

Production and partial characterization of a new fibrinolytic protease from salmon oyster mushroom from Amazonia

Produção e caracterização parcial de uma nova protease fibrinolítica de cogumelo ostra salmão da Amazônia

E. E. P. Barbosa^{a*} , L. Pimenta^a , K. S. Araújo^a , A. K. P. Brito^a , S. C. P. Batista^a , S. R. Martim^b , W. R. Gomes^c  and M. F. S. Teixeira^d 

^aUniversidade Federal do Amazonas – UFAM, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, Grupo de Pesquisa Fungos de Interesse Industrial e Médico, Manaus, AM, Brasil

^bUniversidade Nilton Lins – UNL, Departamento de Graduação e Pós-graduação, Grupo de Pesquisa Fungos de Interesse Industrial e Médico, Manaus, AM, Brasil

^cUniversidade Federal do Amazonas – UFAM, Faculdade de Farmácia – FCF, Manaus, AM, Brasil

^dUniversidade Federal do Amazonas – UFAM, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC, Departamento de Parasitologia, Grupo de Pesquisa Fungos de Interesse Industrial e Médico, Manaus, AM, Brasil

Abstract

Edible mushrooms are excellent sources of enzymes, especially fibrinolytic proteases, which work to dissolve blood clots and can be obtained through different fermentative processes. This research evaluated the production of fibrinolytic protease from a specie of edible mushroom in different formulations of liquid cultures. *Pleurotus ostreatoroseus* was provided by the DPUA culture collection at the Federal University of Amazonas and cultivated on PDA agar supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract. Liquid fermentation was carried out in an Erlenmeyer flask in 50 mL of GYP, MGYP, or Malt medium under stirring at 150 rpm at 30 °C, eight days. The extracts were recovered and dialyzed, and the liquid culture medium was selected based on the activity of fibrinolytic enzymes. In the recovered extracts, qualitative activity (fibrin plate) and quantitative activity of fibrinolytic proteases were determined, and the effect of pH, temperature, stability, ions, and inhibitors on enzymatic activity was evaluated. *Pleurotus ostreatoroseus* excreted proteases in all culture media tested. However, the translucent halo (12.59 ± 0.7 mm) and significant activity of fibrinolytic enzymes (449.32 ± 0.01 U/mL) was determined in GYP. In the dialyzed extract, *P. ostreatoroseus* had an increase in the excretion of fibrinolytic proteases ($1,361.73 \pm 0.09$). Results indicated that in GYP extracts, proteases showed optimal activity at pH 8.0 and at 30 °C of the serine and metallo protease types. Thus, these biocatalysts have strong potential for use in the pharmaceutical, detergent sectors and food industries.

Keywords: proteases, submerged fermentation, fibrin, fibrinolytic, *Pleurotus*.

Resumo

Os cogumelos comestíveis são excelentes fontes de enzimas, especialmente proteases fibrinolíticas, que atuam na dissolução de coágulos sanguíneos e podem ser obtidas por meio de diferentes processos fermentativos. Esta pesquisa avaliou a produção e a caracterização da protease fibrinolítica de uma espécie de cogumelo comestível em diferentes formulações de cultivo líquido. *Pleurotus ostreatoroseus* foi fornecido pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas e cultivado em ágar PDA suplementado com 0,5% (p/v) de extrato de levedura. A fermentação líquida foi realizada em frascos Erlenmeyer em 50 mL de meio GYP, MGYP ou Malte sob agitação a 150 rpm a 30 °C, 8 dias. Os extratos foram recuperados e dialisados, e o meio de cultura líquido foi selecionado com base na atividade das enzimas fibrinolíticas. Nos extratos recuperados, foram determinadas a atividade qualitativa (placa de fibrina) e a atividade quantitativa das proteases fibrinolíticas, foi avaliado o efeito do pH, da temperatura, da estabilidade, dos íons e dos inibidores na atividade enzimática. *Pleurotus ostreatoroseus* excretou proteases em todos os meios de cultura testados. No entanto, o halo translúcido ($12,59 \pm 0,7$ mm) e a atividade significativa de enzimas fibrinolíticas ($449,32 \pm 0,01$ U/mL) foram determinados em GYP. No extrato dialisado, *P. ostreatoroseus* teve um aumento na excreção de proteases fibrinolíticas ($1361,73 \pm 0,09$). Os resultados indicaram que, nos extratos de GYP, as proteases apresentaram atividade ótima em pH 8,0 e a 30 °C dos tipos serina e metalo proteases. Assim, esses biocatalisadores têm grande potencial para utilização na indústria farmacêutica, setores de detergentes e indústria alimentícia.

Palavras-chave: proteases, fermentação submersa, fibrina, fibrinolítico, *Pleurotus*.

*e-mail: elliza.perrone01@gmail.com

Received: August 31, 2024 – Accepted: March 19, 2025



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Proteases are biocatalysts found in plants, animals, and microorganisms that have applications in various industrial, chemical, and biochemical sectors, with several advantages due to their high specificity and biodegradability (Naveed et al., 2021; Troncoso et al., 2022). Fibrinolytic proteases are specific biocatalysts that act in the biological system, mainly in blood coagulation, in the process of dissolving blood clots. This mechanism, known as fibrinolysis, triggers the activation of the fibrinolytic system, which is regulated by proteolytic enzymes with fibrinolytic action, such as serine proteases, metalloproteases, and protease inhibitors (Lin et al., 2020).

When the hemostatic system does not function as expected, hemostasis does not occur, and blood clots, or “thrombi” are formed by the accumulation of a serine protease, plasmin, in the blood. This enzyme blocks veins or arteries, limiting blood flow, causing swelling and pain in the region, and causing various vascular diseases (Hu et al., 2019; Roth et al., 2020; Sondag et al., 2023).

During the period of COVID-19 caused by the “Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2” (SARS-CoV-2), several patients were affected by different pathophysiologicals, particularly thrombosis. Resulting from this pathology, hypercoagulation and obstruction of blood vessels, inducing an imminent prothrombotic state, contribute significantly to the mortality and morbidity rate (Hanff et al., 2020; Mandel et al., 2022; Kim et al., 2022).

For the treatment of these pathophysiologicals, fibrinolytic enzymes are required due to their ability to lyse clots through the fibrinolysis of thrombi and are, therefore, fundamental compounds in the treatment of thrombosis, a disease responsible for 29% of total patient mortality (Silva et al., 2016; Kumar and Sabu, 2019; Ji et al., 2020). Globally, the commercialization of fibrinolytic proteases indicates that these enzymes are valued at US\$5.5 billion and, by 2023, US\$7.0 billion (Tarafdar et al., 2021).

Among the sources of fibrinolytic enzymes, fungi stand out due to their ability to synthesize extracellular enzymes. Due to this property, several species are being cultivated on different substrates to obtain environmentally friendly enzymes, many of which may have antithrombotic action in cardiovascular diseases (Salim et al., 2021; Barzee et al., 2021).

In studies with edible mushroom, the fibrinolytic activity of the complex of significant proteolytic enzymes was reported by *Flammulina velutipes*, which gave rise to research with other edible mushroom species. Thus, several studies have discovered fibrinolytic proteases in the fruiting bodies of mushrooms such as *Pleurotus djamor*, *Auricularia polytricha*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes* (Ali et al., 2018; Petraglia et al., 2022; Santana et al., 2024). In this context, studies with *Pleurotus* species revealed promising results regarding proteolytic activity; however, there is still a need for studies that verify the fibrinolytic enzymatic capacity of these organisms (Santana et al., 2024; Supit et al., 2024).

Among the mushroom species, *Pleurotus ostreatoroseus* Singer stands out in the synthesis of proteases in various cultivation media and substrates (Machado et al., 2017; Barbosa et al., 2020, 2023). However, there are no

current studies revealing the fibrinolytic potential of this mushroom. In this way, this research contains new discoveries regarding the enzymatic synthesis capacity of *P. ostreatoroseus*. Therefore, this study evaluated the production and characterization of fibrinolytic protease from a species of edible mushroom *P. ostreatoroseus* in cultures of different formulations for industrial purposes.

2. Materials and Methods

2.1. Mushroom cultivation and maintenance

In this research, *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 was used, provided by the DPUA Culture Collection from the Federal University of Amazonas-UFAM, Manaus, Amazonas, Brasil. To obtain a pure and viable culture, the mushroom was cultivated on Potato Dextrose agar (PDA) with 0.5% yeast extract (w/v). The cultures were maintained at 28 °C for eight days in the absence of light and 60% humidity. Species registered in the National Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge Management System (SisGen) under registration number AC60E82.

2.2. Preparation of the matrix culture

The matrix culture was prepared on GYP agar (glucose, yeast extract, and peptone), supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract, in 90 mm × 12 mm Petri dishes. The culture media were sterilized at 121 °C for 15 minutes. The cultures were maintained at 25 °C, in the absence of light, for eight days, prepared in triplicate (Coelho et al., 2021).

2.3. Submerged fermentation

2.3.1. Inoculum preparation in liquid medium

For the selection of the liquid culture medium, the inoculum culture was prepared in the following media: GYP (glucose, yeast extract, and peptone), MGYP (glucose, yeast extract, and peptone), and Malt, supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract. The culture media were sterilized at 121 °C for 15 minutes, in triplicate. The liquid media were maintained at 150 rpm for 8 days.

2.4. Recovery, filtration and partial purification of crude extract

The separation of the mycelial mass was carried out under vacuum on sterilized Whatman No. 1 filter paper. The recovered extracts were again vacuum filtered through a 0.45 µm Millipore filter. Subsequently, to eliminate interferents, the recovered extracts were subjected to dialysis. Every 10 mL of crude extract was transferred to a 33 × 21 mm dialysis bag with 25 Å porosity, INLAB®. Dialysis was carried out in 500 mL Tris-HCL-NaCl buffer, kept at 4 °C under agitation on an orbital shaker, with three changes of the buffer. After the last replacement, the enzyme extracts remained under the same conditions for four hours (Nascimento et al., 2016). After dialysis, the filtrates were placed in test tubes with screw caps and stored at 4 °C until enzymatic analysis.

2.5. Determination of quantitative activity of proteases

The quantitative activity of proteases was determined according to a quote from Machado et al. (2017). A volume of 150 μ L of crude extract was added to 250 μ L of 1% (w/v) azocasein solution in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2. The reaction tubes were kept for one hour at 25 °C in a dark chamber at room temperature. The reaction was stopped by adding 1.2 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid. The sample was then subjected to centrifugation for 10 minutes at 10000 rpm at 4 °C. Subsequently, 0.8 mL was removed from each supernatant and transferred to test tubes containing 1.4 mL of 1 M sodium hydroxide. A 1% (w/v) azocasein solution in Tris-HCl buffer 0 was used as a blank. 1 M, pH 7.2. The reading was performed at 440 nm. One unit of proteolytic activity was defined as the amount of enzyme capable of producing an increase in absorbance of 0.1 in one hour.

2.6. Determination of total proteins

The total protein content obtained in the enzyme extracts was estimated according to the method described by Bradford (1976), using Coomassie brilliant blue G-250 and bovine serum albumin (BSA) as standard solutions. In the tests, 100 μ L of the enzyme extract was used, added to 2.5 mL of Bradford reagent, and kept in a dark chamber for 10 minutes. Protein concentration was determined based on the BSA standard curve (Sigma-Aldrich®). The tests were carried out in triplicate. Samples were read at 595 nm (Santana et al., 2024).

2.7. Determination of qualitative fibrinolytic activity in fibrin plate

Fibrinolytic activity was determined according to the method cited by Santos et al. (2016), with modifications. Modifications consist of using solutions in different concentrations. In each 60 mm $\times$ 15 mm Fibrin Petri dish was added: **(a)** 0.025 mg of 0.01% (w/v) bovine plasma fibrinogen solution (Sigma-Aldrich®) in 0.1 Phosphate Buffer M, pH 7.4; **(b)** 0.015 mM NaCl solution; **(c)** 0.074 mg of 0.01% (w/v) agarose solution in 7.4 mL of 0.1 M Phosphate Buffer, pH 7.4; These solutions were homogenized, and then **(d)** 100 μ L of thrombin 101 NIH aqueous solution (100 U/mL) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA® was added. The plates were left to rest for 60 minutes for fibrin polymerization, and 100 μ L of the dialyzed enzymatic extract was added to each eight-millimeter-diameter pit on the surface of the Fibrin Plate. The plates were kept at 37 °C for 18 hours. Activity was assessed by halo diameter in millimeters (Petraglia et al., 2022).

2.8. Determination of quantitative fibrinolytic activity

Quantitative fibrinolytic activity was evaluated according to the method of Wang et al. (2011), the formation of an artificial blood clot in an Eppendorf-type tube, and fibrin degradation in the presence of fibrinolytic protease. To prepare the artificial clot, 500 μ L of fibrinogen solution (w/v) was added to 100 μ L of thrombin, 20 U/mL. After clot formation, 100 μ L of dialyzed enzyme extract was added. The reaction was maintained at 37 °C in a water

bath for 60 minutes. The reaction was stopped by adding 700 μ L of Trichloroacetic Acid (0.2 M at 10%). The samples were centrifuged at 15,000 xg for 10 minutes at 4 °C. All samples were prepared in triplicate. The supernatant from each assay was read on an ultraviolet-visible (UV-Vis) spectrophotometer at 275 nm. One unit of fibrinolytic activity (FU) was defined as the amount of enzyme responsible for a 0.01 increase in absorbance per minute.

2.9. Biochemical characterization of fibrinolytic proteases

2.9.1. Effect of pH and fibrinolytic protease temperature

To determine the enzyme's optimal pH, different buffers were used in a pH range between 4.0 and 10.0, namely: sodium acetate (pH 4.0-5.0), sodium phosphate (pH 6.0-7.0), Tris-HCl (pH 8.0-9.0), and Carbonate-Bicarbonate (pH 10.0). The effect of temperature was determined in the range of 30 °C to 80 °C for 60 minutes. At the end of the incubation time, fibrinolytic enzyme activity was determined as described in the previously mentioned items (Cardoso et al., 2022).

2.9.2. Effect of pH and temperature on the stability of fibrinolytic protease

To check pH stability, the enzyme was incubated in the buffers mentioned in the previous items for 120 minutes and 24 hours, and its residual enzymatic activity was analyzed. The effect of temperature on enzyme stability was evaluated by incubating the enzyme extract at temperatures ranging from 10 °C to 70 °C. For this purpose, aliquots were removed every 30 minutes over a period of 180 minutes and subjected to determination of fibrinolytic activity (Cardoso et al., 2022).

2.9.3. Effect of ions and inhibitors on fibrinolytic enzyme activity

The effect of different metal ions on enzymatic activity was evaluated at ion concentrations equivalent to 10.0 mM. The dialyzed enzyme extract was incubated at 37 °C for 60 minutes with the following salts: ZnSO₄, MgSO₄, CuSO₄, FeSO₄, CaCl₂, NaCl and KCl. To determine the effect of inhibitors on protease activity, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 10.0 mM), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF 10.0 mM), 10.0 mM iodine acetic acid, 10 mM pepstatin A, and 10.0 mM iodoacetic acid were used. The reaction was maintained for 60 minutes at 37 °C in the presence of inhibitors. The reaction mixture, including the control, was incubated for 30 minutes at optimal temperature and pH conditions. Fibrinolytic activity was measured as mentioned in the previous items. All samples were prepared in triplicate. The residual enzymatic activity was compared with the control incubated without inhibitors or metal ions, which corresponds to 100% activity (Martim et al., 2017).

2.10. Statistical analysis

The data were subjected to descriptive mean statistical analysis, standard deviation, graphs, and enzymatic activity calculations ($R^2 \geq 95\%$) by analysis of variance (Anova) and Tukey test ($p > 0.05$) to compare means using the Minitab® software version 19.0.

3. Results

3.1. Qualitative fibrinolytic activity in fibrin plate

In this research, it was observed that *P. ostreatoroseus* synthesized fibrinolytic enzymes. Table 1 demonstrates the activity of fibrinolytic proteases synthesized by *P. ostreatoroseus*. In the fibrin plate, the translucent halo of significant value was determined in GYP (12.59 ± 0.70 mm). In the other fermentation media, Malt and MGY, halo values varied from 8.98 ± 0.51 mm to 10.00 ± 0.30 mm, respectively (Table 1). Malt extract was added into the different fermentation media formulations to evaluate the enzyme excretion, as malt provides the carbon, protein and nitrogen necessary for the growth of organisms. In addition, recent research with fungi has obtained promising results when malt was added to liquid culture media, increasing the excretion of fibrinolytic enzymes (Sharma et al., 2021; Acosta et al., 2022). However, in this study, the presence of malt did not have influence in the increase in fibrinolytic synthesis of *P. ostreatoroseus*.

3.2. Determination of quantitative fibrinolytic activity

The specific proteolytic and fibrinolytic activity of *P. ostreatoroseus* proteases determined in different culture media is represented in Table 1. Under the conditions tested, *P. ostreatoroseus* excreted fibrinolytic proteases in all culture media. The significant value of proteolytic activity ($1,361.73 \pm 0.09$ U/mL) and specific fibrinolytic activity (449.32 ± 0.01 U/mL) of *Pleurotus ostreatoroseus* was observed in GYP medium, a value 80.75% higher than those obtained in MGY extract (Table 1). The activity of fibrinolytic enzymes in Malt (348.52 ± 0.05 U/mL) was 30% lower than that determined in GYP. Therefore, of the culture media evaluated in this research, GYP was promising for the synthesis of fibrinolytic enzymes. In purified GYP extracts, total protein activity was 0.04 ± 0.05 U/mL, and specific fibrinolytic and proteolytic activity were equivalent to 611.12 ± 0.04 U/mL and $2,302.41 \pm 0.06$ U/mL, respectively. Data reveals a significant increase of 41% in the activity of proteases, followed by the production of fibrinolytic enzymes by 22.39%.

3.3. Biochemical characterization of fibrinolytic proteases

Figure 1 shows the effect of pH and temperature on the activity of *P. ostreatoroseus* proteases determined in

the dialyzed GYP extract. The results showed the activity of proteases at all pH and temperatures tested. However, optimal activity was observed at pH 8.0 (158.61 ± 0.13 U/mL), followed by a decrease in activity at higher pH values, with a maximum reduction (53.72%) at alkaline pH. The effect of temperature on the activity of *P. ostreatoroseus* fibrinolytic proteases was observed at all temperatures tested (Figure 1), with maximum activity at 30 °C and a reduction at the other temperatures evaluated (40 °C to 80 °C). Figure 2 shows the effect of pH and temperature stability on the activity of *P. ostreatoroseus* fibrinolytic proteases determined in GYP extracts. *P. ostreatoroseus* proteases showed high stability, retaining significant activity from pH 5.0 to pH 8.0. With a decrease in activity of 66.08% and 71.22% at pH 9.0 and pH 10.0, respectively. Regarding temperature, fibrinolytic proteases exhibited greater stability at temperatures between 30 °C and 60 °C. At temperatures of 70 °C and 80 °C, with a marked decrease in catalytic action, the enzyme retained only 32.68% of its activity. The results regarding the effect of metal ions on the activity of fibrinolytic proteases are shown in Table 2. Mn^{+2} ions completely inhibited enzymatic activity. Zn^{+2} and Cu^{+2} reduced the catalytic action by 90.38% and 97.38%, respectively. The effect of inhibitory substances and metal ions on the activity of fibrinolytic proteases in *P. ostreatoroseus* is shown in Table 2. In the stability test against inhibitors, it was found that the serine protease inhibitor (PMSF) and metalloprotease (EDTA) caused a reduction in activity of 80.15% and 92.45%, respectively. Proteases were not affected by Pepstatin and iodoacetic acid; in this condition, activity retention was greater than 70%.

4. Discussion

In the scientific literature, little research has been done on the synthesis of fibrinolytic enzymes by *P. ostreatoroseus*. Although mushrooms are considered the most valuable resources to produce fibrinolytic enzymes, studies on the fibrinolytic potential of edible mushrooms are still scarce (Santana et al., 2024). In studies with *Pleurotus* species carried out by Petraglia et al. (2022), similar results were obtained with basidiome extracts of *P. eryngii* and *P. ostreatus*,

Table 1. Qualitative and quantitative activity of fibrinolytic proteases from *P. ostreatoroseus* produced by submerged fermentation in different culture media.

Culture media	Halo degradation Fibrin Plate (halo in mm²)	Total protein (mg)	Specific Fibrinolytic Activity (U/mL)	Specific Proteolytic Activity (U/mL)
GYP	12.59 ± 0.70 ^a	0.04 ± 0.04 ^a	499.32 ± 0.01 ^a	1,361.73± 0.09 ^a
MGYP	8.98 ± 0.51 ^b	0.03 ± 0.07 ^b	386.00 ± 0.06 ^b	262.02± 0.07 ^c
MALT	10.00 ± 0.30 ^c	0.03 ± 0.12 ^b	348.52 ± 0.05 ^c	382.32± 0.12 ^b

GYP (Glucose, peptone and yeast extract), MGY (Malt, glucose, peptone and yeast extract). Equal letters in the same column do not differ statistically using the Tukey method (p>0.05).

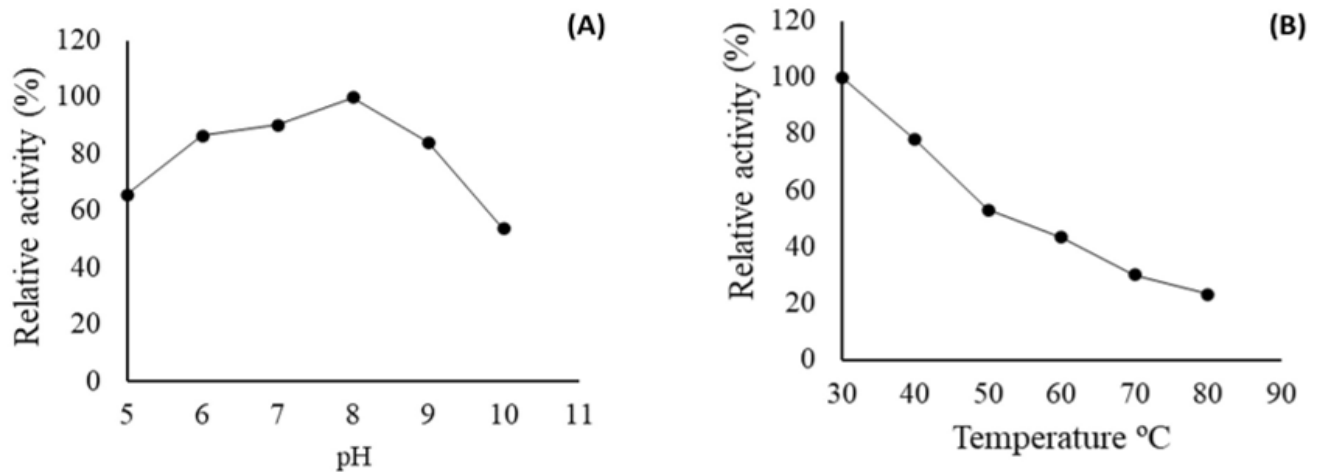


Figure 1. Effect of pH (A) and temperature (B) on the fibrinolytic activity of *P. ostreatoroseus* in GYP medium.

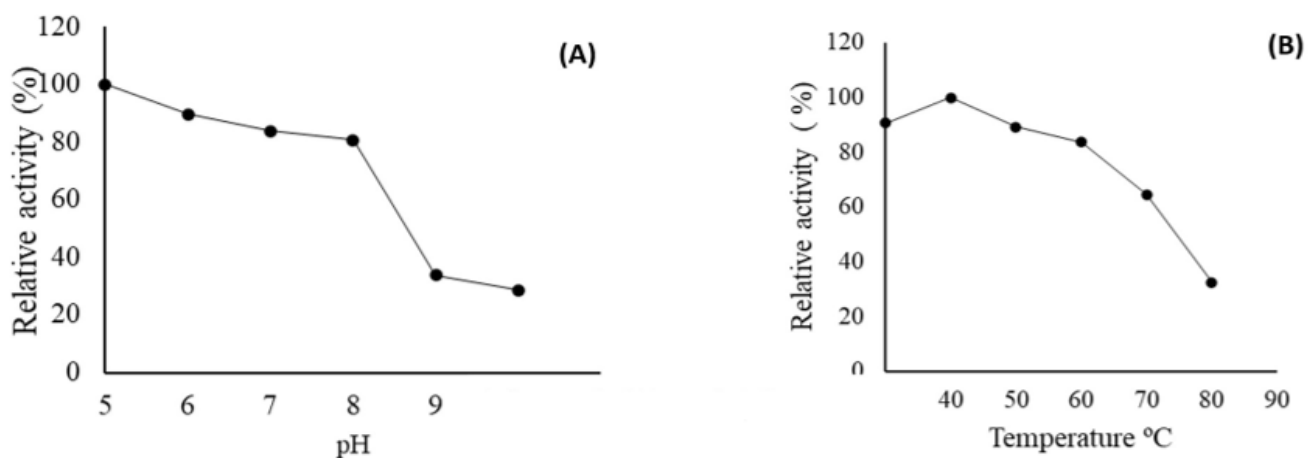


Figure 2. Effect of pH (A) and temperature (B) stability on the fibrinolytic activity of *P. ostreatoroseus* in GYP medium.

which showed degradation halos of 4.91 cm and 6.15 cm, respectively. Liu et al. (2014) and Choi et al. (2017) verified enzymatic action in fibrin plates of *P. ostreatus* and *P. ferulae* when cultivated in PDA medium added with glucose. In crude extracts of *Lentinus edodes*, Ali et al. (2018) obtained lithic degradation halo of 19 mm, data that corroborates the current research.

In studies by Ali et al. (2018), evaluating the extract extracted from 10 basidiomas of mushroom species, it was observed that fibrinolytic proteases were active in all of them, highlighting the highest fibrinolytic activity (48.06 U/mL) in extracts from the basidiomas of *L. edodes*; however, in the other species of mushrooms evaluated, this activity varied from 9.0 to 17.0 U/mL.

Research focusing on *Pleurotus* species developed by Petraglia et al. (2022) verified the fibrinolytic activity of extracts from the basidiomes of *P. ostreatus* and *P. eryngii*, with a significant value of 39.14 ± 1.01 U/mL and 35.09 ± 0.40 U/mL, respectively. In other studies, with *P. eryngii* and *P. ostreatus*, the significant activity of fibrinolytic enzymes in submerged fermentation media [Malt (226.47 ± 7.26 U/mL) and Sabouraud (100.14 ± 0.28 U/mL)] showed promise regarding the fibrinolytic activity of the mushrooms evaluated by Santana et al. (2024), respectively.

Table 2. Effect of metal ions and inhibitor substances on the activity of fibrinolytic proteases of *P. ostreatoroseus*.

Inhibitors	Residual Activity (%)
Ions (10 mM)	
Control	100
CaCl ₂	20.43 ± 0.4
KCl	40.44 ± 0.1
NaCl	47.73 ± 0.1
CuSO ₄	2.62 ± 0.4
FeSO ₄	26.82 ± 0.1
MgSO ₄	47.78 ± 0.2
MnSO ₄	00.00 ± 0.1
ZnSO ₄	9.62 ± 0.4
Substances	
EDTA (10 mM)	7.55 ± 0.4
PMSF (10 mM)	19.85 ± 0.2
Iodoacetic Acid (10 mM)	77.87 ± 0.9
Pepstatin (1 mM)	88.30 ± 0.3

Control: without inhibitors or metal ions.

Fibrinolytic enzymes act in the degradation of fibrin; however, the synthesis of these biocatalysts by microorganisms depends on several factors, such as the quality of nutrients in the fermentation medium, sources of carbon and nitrogen, the time and age of the inoculum, the genetic characteristics of the species, agitation, pH, and temperature. In this way, each organism can achieve maximum enzyme production under specific conditions, according to the physiological needs of each microorganism (Gimenes et al., 2021; Cardoso et al., 2022; Pessoa et al., 2023).

Understanding the biochemical characteristics of proteases is an important factor in verifying the viability of commercial applications of these biocatalysts (Barzkar et al., 2022). Fungi can produce acidic, neutral, and alkaline proteases. Proteases that exhibit optimal catalytic activity at pH 5 to 8 have applications in various industrial segments, such as the food, textile, pharmaceutical, and detergent industries (Barzee et al., 2021; Petraglia et al., 2022).

Similar data about effect of pH were obtained by Braga et al. (2020), Petraglia et al. (2022), and Santana et al. (2024), whose maximum protease activity was observed at pH 7.0 to 8.0 when analyzing species of *P. eryngii*, *L. villosus*, and *P. ostreatus*, respectively. The study of the effect of pH is one of the important parameters in processes determining the optimal conditions for enzyme synthesis, as it directly influences the activity of biocatalysts essential for the transport of nutrients as well as the growth and maintenance of the morphological structure of filamentous fungi (Brito et al., 2019; Pimenta et al., 2021).

The data obtained on the optimum temperature are in accordance with those reported by Machado et al. (2017), Barbosa et al. (2020) and Petraglia et al. (2022) in studies with *P. ostreatoroseus* and *P. ostreatus*, respectively. Most fibrinolytic enzymes have an optimum temperature between 35 °C and 50 °C (Cardoso et al., 2022). In addition, the data on pH stability were similar with the studies by Pimenta et al. (2021) and Santana et al. (2022) found that *P. albidus* and *P. eryngii* had reduced protease activity at pH 8.0 to 10.0. Pimenta et al. (2021) described a similar stability regarding temperature to *P. albidus* proteases.

In other words, extremely high temperatures can cause the enzyme to denature and stop working. Each enzyme has an optimum pH range, changing the pH to a value outside this range will cause enzyme activity to decrease. Consequently, extreme pH values can cause enzymes to denature. Conventional and statistical optimization of nutritional components and physicochemical parameters, such as pH and temperature, are fundamental approaches for the significant fermentative production of fibrinolytic enzymes, as these parameters enable their efficient use in catalytic action (Sharma et al., 2021).

In the presence of other ions, peptidase retained a catalytic action greater than 40%. Barbosa et al. (2020) reported that Zn^{+2} and Cu^{+2} reduced enzymatic action by 59.32% and 52.0%, respectively. Machado et al. (2017) reported that Cu^{+2} and Zn^{+2} caused a 95% reduction in the proteolytic activity of *P. ostreatoroseus*. Pimenta et al. (2021) found that Zn^{+2} reduced the activity of *P. albidus* proteases by 87.37%, data that corroborates those obtained in this research.

Ions and inhibitors can affect protease activity mainly by binding to the enzyme's active site, thus preventing binding to the substrate, or by binding to another site on the enzyme so that catalysis of the enzyme's reaction is blocked, thus inhibiting the process of substrate binding to the active site (Nelson et al., 2022).

Abdel-Rahman (2018) stated that protease inhibitors are used to identify the group in the active site of the enzyme. The results suggest that in the fibrinolytic proteases of the extracts obtained from *P. ostreatoroseus*, there is a predominance of metalloproteases and serine proteases (Table 2). Barbosa et al. (2020), Pimenta et al. (2021) and Santana et al. (2022) verified the significant production of serine and metalloproteases by *P. ostreatoroseus*, *P. albidus*, and *P. eryngii*, respectively. Meshram et al. (2016) studies with endophytic fungus *Xylaria curta* was reported that a metalloprotease (with 8.0 pH optima) produced appreciable fibrinolytic properties and thus has the potential of being used for therapeutic purposes.

Alkaline serine and metalloproteases are economical sources for hydrolyzing different types of proteins in various industrial applications. The detergent sector consumes the most alkaline proteases, which are generally serine proteases with an alkaline pH range. These properties of alkaline proteases make them suitable for use in the detergent industry (Razzaq et al., 2019; Gurumalles et al., 2019; Miranda et al., 2022).

In the food industry, commercial alkaline serine proteases are mainly involved in the hydrolysis of proteins to prepare hydrolysates with high nutritional value. The protein hydrolysates produced are widely used in the fortification of baby food formulations, dietary products, and processed foods. In the pharmaceutical industry, they are used to treat thrombosis (urokinase, fibrinolytic), hemophilia (factor VIIa), and other pathologies (Matkawala et al., 2021; Solanki et al., 2021).

5. Conclusion

Pleurotus ostreatoroseus, an edible mushroom, synthesizes fibrinolytic enzymes under submerged cultivation conditions, showing significant fibrinolytic protease activity in fibrin plate and in the crude extract from fermentation in GYP (liquid), demonstrating optimal activity at alkaline pH and at 30 °C, of the serine type and metalloproteases. These biocatalysts have strong potential for use in the pharmaceutical, detergent sectors, and food industries. Therefore, this research has produced promising and innovative results about the enzymatic synthesis capacity of fibrinolytic enzymes from *P. ostreatoroseus*.

Acknowledgements

To Federal University of Amazonas (UFAM) for technical and scientific support. To the Culture Collection DPUA/UFAM. To the Postgraduate Program in Biotechnology – PPGBIOTEC/UFAM. To fellow Masters and Doctors collaborators. To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – CAPES for the financial support.

References

- ABDEL-RAHMAN, T.M., 2018. Biological and chemical sciences purification and characterization of milk -clotting enzyme from the edible mushroom *Pleurotus albidus*. *Research Journal of Pharmaceutical*, vol. 9, no. 49, pp. 49-63.
- ACOSTA, G.A., FONSECA, M.I., FARIÑA, J.I. and ZAPATA, P.D., 2022. Exploring Agaricomycetes from the Paranaense rainforest (Misiones, Argentina) as an unconventional source of fibrinolytic enzymes. *Mycologia*, vol. 114, no. 2, pp. 242-253. <http://doi.org/10.1080/00275514.2022.2035148>. PMID:35394849.
- ALI, S.M., RAMAN, J., LAKSHMANAN, H., LING, T.C., PHAN, C.-W., TAN, Y.S. and SABARATNAM, V., 2018. Surface decoration of selenium nanoparticles by proteins from the culinary-medicinal shiitake mushroom, *Lentinus edodes* (Agaricomycetes), for enhanced fibrinolytic activity. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, vol. 20, no. 11, pp. 1021-1030. <http://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2018028307>.
- BARBOSA, E., PIMENTA, L., BRITO, A.K., BATISTA, S., MARTIM, S. and TEIXEIRA, M., 2023. Salmon oyster mushroom: growth characteristics and protease production on a laboratory scale. *Concilium*, vol. 23, no. 2, pp. 367-379. <http://doi.org/10.53660/CLM-801-23A54>.
- BARBOSA, E.E.P., PIMENTA, L., BRITO, A.K.P., MARTIM, S.R. and TEIXEIRA, M.F.S., 2020. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, no. 11, pp. 92475-92485. <http://doi.org/10.34117/bjdv6n11-598>.
- BARZEE, T.J., CAO, L., PAN, Z. and ZHANG, R., 2021. Fungi for future foods. *Journal of Future Foods*, vol. 1, no. 1, pp. 25-37. <http://doi.org/10.1016/j.jfutfo.2021.09.002>.
- BARZKAR, N., JAHROMI, S.T. and VIANELLO, F., 2022. Marine microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, biochemical properties and thrombolytic activity. *Marine Drugs*, vol. 20, no. 1, pp. 56. <http://doi.org/10.3390/md20010046>. PMID:35049901.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). PMID:942051.
- BRAGA, R.S., BRITO, É.C.M., SOUZA, R.Á.T., TEIXEIRA, M.F.S. and MARTIM, S.R., 2020. *Lentinus Villosum* Klotzsch (1833) Am 169: a natural and renewable source of alkaline protease. *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, no. 11, pp. 85867-85883. <http://doi.org/10.34117/bjdv6n11-127>.
- BRITO, E.C.D.M., BRAGA, R.D.S., TEIXEIRA, M.F.S. and MARTIM, S.R., 2019. Produção e caracterização parcial de proteases aspárticas sintetizadas por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 (Polyporaceae). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, vol. 14, no. 3, pp. 463-472. <http://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.232>.
- CARDOSO, K.B.B., NASCIMENTO, M.C., BATISTA, A.C., OLIVEIRA, V.M., NASCIMENTO, T.P., BATISTA, J.M.S., COSTA, R.M.P.B., PASTRANA, L. and PORTO, A.L.F., 2022. View of systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. *Research, Society and Development*, vol. 11, no. 2, e13611225449. <http://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25449>.
- CHOI, J.H., KIM, D.W., KIM, S. and KIM, S.J., 2017. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 47, no. 6, pp. 539-546. <http://doi.org/10.1080/10826068.2016.1181083>. PMID:27136080.
- COELHO, M.P.S.L.V., BARBOSA, E.E.P., PIMENTA, L., BATISTA, S.C.P., PRADO, F.B., MARTIM, S.R., CRUZ FILHO, R.F. and TEIXEIRA, M.F.S., 2021. Alternativa fontes nutricionais para desenvolvimento da fase micelial e produção de hidrolases por cogumelo comestível de floresta tropical. *Brazilian Journal of Development*, vol. 7, no. 3, pp. 22890-22907. <http://doi.org/10.34117/bjdv7n3-145>.
- GIMENES, N.C., SILVEIRA, E. and TAMBOURGI, E.B., 2021. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. *Separation and Purification Reviews*, vol. 50, no. 3, pp. 223-243. <http://doi.org/10.1080/15422119.2019.1677249>.
- GURUMALLESH, P., ALAGU, K., RAMAKRISHNAN, B. and MUTHUSAMY, S., 2019. A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 128, pp. 254-267. <http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>. PMID:30664968.
- HANFF, T.C., MOHAREB, A.M., GIRI, J., COHEN, J.B. and CHIRINOS, J.A., 2020. Thrombosis in COVID-19. *American Journal of Hematology*, vol. 95, no. 12, pp. 1578-1589. <http://doi.org/10.1002/ajh.25982>. PMID:32857878.
- HU, Y., YU, D., WANG, Z., HOU, J., TYAGI, R., LIANG, Y. and HU, Y., 2019. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* DC27 screened from Douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 9235. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-45686-y>. PMID:31239529.
- Ji, H.L., ZHAO, R., MATALON, S. and MATTHAY, M.A., 2020. Elevated plasmin (Ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiological Reviews*, vol. 100, no. 3, pp. 1065-1075. <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2020>. PMID:32216698.
- KIM, A.Y., WOO, W., YON, D.K., LEE, S.W., YANG, J.W., KIM, J.H., PARK, S., KOYANAGI, A., KIM, M.S., LEE, S., SHIN, J.I. and SMITH, L., 2022. Thrombosis patterns and clinical outcome of COVID-19 vaccine-induced immune thrombotic thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 119, pp. 130-139. <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.03.034>. PMID:35339716.
- KUMAR, S.S. and SABU, A., 2019. Fibrinolytic enzymes for thrombolytic therapy. therapeutic enzymes: function and clinical implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 1148, pp. 345-381. http://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_15.
- LIN, H., XU, L., YU, S., HONG, W., HUANG, M. and XU, P., 2020. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Experimental & Molecular Medicine*, vol. 52, no. 3, pp. 367-379. <http://doi.org/10.1038/s12276-020-0397-x>. PMID:32152451.
- LIU, X.L., ZHENG, X.Q., QIAN, P.Z., KOPPARAPU, N.K., DENG, Y.P., NONAKA, M. and HARADA, N., 2014. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 24, no. 2, pp. 245-253. <http://doi.org/10.4014/jmb.1307.07063>. PMID:24248089.
- MACHADO, A.G.M., MARTIM, S.R., ALECRIM, M.M. and TEIXEIRA, M.F.S., et al., 2017. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. *African Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 46, pp. 2160-2166. <http://doi.org/10.5897/AJB2017.16154>.
- MANDEL, J., CASARI, M., STEPANYAN, M., MARTYANOV, A. and DEPPERMAN, C., 2022. Beyond hemostasis: platelet innate immune interactions and thromboinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 7, pp. 3868. <http://doi.org/10.3390/ijms23073868>. PMID:35409226.
- MARTIM, S.R., SILVA, L.S.C., ALECRIM, M.M., SOUZA, B.C., OLIVEIRA, I.M.D.A. and TEIXEIRA, M.F.S., 2017. Proteases ácidas de cogumelo

- comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais*, vol. 12, no. 3, pp. 353-362. <http://doi.org/10.46357/bcnaturais.v12i3.86>.
- MATKAWALA, F., NIGHOJKAR, S., KUMAR, A. and NIGHOJKAR, A., 2021. Microbial alkaline serine proteases: production, properties and applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, vol. 37, no. 4, pp. 63. <http://doi.org/10.1007/s11274-021-03036-z>. PMID:33730214.
- MESHAM, V., SAXENA, S. and PAUL, K., 2016. Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 31, no. 6, pp. 1502-1511. <http://doi.org/10.3109/14756366.2016.1151013>. PMID:27033431.
- MIRANDA, V.M.A.M., BARBOSA FILHO, J.P.M., COSTA, R.M.P.B., LEITE, A.C.L., OLIVEIRA, V.M., BATISTA, J.M.S., PASTRANA, L., NASCIMENTO, T.P. and PORTO, A.L.F., 2022. Evaluation of partial thromboplastin time, thrombin time and prothrombin time over treated plasma using a fibrinolytic protease. *Research, Society and Development*, vol. 11, no. 2, e15311225439. <http://doi.org/10.33448/rsd-v11i2.25439>.
- NASCIMENTO, T.P., SALES, A.E., PORTO, C.S., BRANDÃO, R.M., CAMPOS-TAKAKI, G.M., TEIXEIRA, J.A., PORTO, T.S., PORTO, A.L. and CONVERTI, A., 2016. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *Journal of Chromatography. A*, vol. 1025, pp. 16-24. PMID:27183214.
- NAVEED, M., NADEEM, F., MEHMOOD, T., BILAL, M., ANWAR, Z. and AMJAD, F., 2021. Protease: a versatile and ecofriendly biocatalyst with multi-industrial applications: an updated review. *Catalysis Letters*, vol. 151, no. 2, pp. 307-323. <http://doi.org/10.1007/s10562-020-03316-7>.
- NELSON, D.L., COX, M.M. and HOSKINS, A.A., 2022. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 8ª ed. Porto Alegre: ArtMed, pp. 183-187.
- PESSOA, V.A., SOARES, L.B.N., SILVA, G.L., VASCONCELOS, A.S., SILVA, J.F., FARIÑA, J.I., OLIVEIRA-JUNIOR, S.D., SALES-CAMPOS, C. and CHEVREUIL, L.R., 2023. Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, vol. 83, e270316. <http://doi.org/10.1590/1519-6984.270316>. PMID:37162094.
- PETRAGLIA, T., LATRONICO, T., LIUZZI, G.M., FANIGLIULO, A., CRESCENZI, A. and ROSSANO, R., 2022. Edible mushrooms as source of fibrin(ogen)olytic enzymes: comparison between four cultivated species. *Molecules*, vol. 27, no. 23, pp. 8145. <http://doi.org/10.3390/molecules27238145>. PMID:36500238.
- PIMENTA, L., BARBOSA, E.E.P., BRITO, A.K.P., MARTIM, S.R. and TEIXEIRA, M.F.S., 2021. Processo Eco-amigável para selecionar substrato lignocelulósico para produção de peptidases ácidas. *Brazilian Journal of Development*, vol. 7, no. 1, pp. 3469-3479. <http://doi.org/10.34117/bjdv7n1-234>.
- RAZZAQ, A., SHAMSI, S., ALI, A., ALI, Q., SAJJAD, M., MALIK, A. and ASHRAF, M., 2019. Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, pp. 110. PMID:31263696.
- ROTH, G.A., MENSAH, G.A., JOHNSON, C.O., ADDOLORATO, G., AMMIRATI, E., BADDOUR, L.M., BARENGO, N.C., BEATON, A.Z., BENJAMIN, E.J., BENZIGER, C.P., BONNY, A., BRAUER, M., BRODMANN, M., CAHILL, T.J., CARAPETIS, J., CATAPANO, A.L., CHUGH, S.S., COOPER, L.T., CORESH, J., CRIQUI, M., DECLEENE, N., EAGLE, K.A., EMMONS-BELL, S., FEIGIN, V.L., FERNÁNDEZ-SOLÁ, J., FOWKES, G., GAKIDOU, E., GRUNDY, S.M., HE, F.J., HOWARD, G., HU, F., INKER, L., KARTHIKEYAN, G., KASSEBAUM, N., KOROSHETZ, W., LAVIE, C., LLOYD-JONES, D., LU, H.S., MIRIJELLO, A., TEMESGEN, A.M., MOKDAD, A., MORAN, A.E., MUNTNER, P., NARULA, J., NEAL, B., NTSEKHE, M., MORAES DE OLIVEIRA, G., OTTO, C., OWOLABI, M., PRATT, M., RAJAGOPALAN, S., REITSMA, M., RIBEIRO, A.L.P., RIGOTTI, N., RODGERS, A., SABLE, C., SHAKIL, S., SLIWA-HAHNLE, K., STARK, B., SUNDSTRÖM, J., TIMPEL, P., TLEYJEH, I.M., VALGIMIGLI, M., VOS, T., WHELTON, P.K., YACOB, M., ZUHLKE, L., MURRAY, C., FUSTER, V., ROTH, G.A., MENSAH, G.A., JOHNSON, C.O., ADDOLORATO, G., AMMIRATI, E., BADDOUR, L.M., BARENGO, N.C., BEATON, A., BENJAMIN, E.J., BENZIGER, C.P., BONNY, A., BRAUER, M., BRODMANN, M., CAHILL, T.J., CARAPETIS, J.R., CATAPANO, A.L., CHUGH, S., COOPER, L.T., CORESH, J., CRIQUI, M.H., DECLEENE, N.K., EAGLE, K.A., EMMONS-BELL, S., FEIGIN, V.L., FERNÁNDEZ-SOLÁ, J., FOWKES, F.G.R., GAKIDOU, E., GRUNDY, S.M., HE, F.J., HOWARD, G., HU, F., INKER, L., KARTHIKEYAN, G., KASSEBAUM, N.J., KOROSHETZ, W.J., LAVIE, C., LLOYD-JONES, D., LU, H.S., MIRIJELLO, A., MISGANAW, A.T., MOKDAD, A.H., MORAN, A.E., MUNTNER, P., NARULA, J., NEAL, B., NTSEKHE, M., OLIVEIRA, G.M.M., OTTO, C.M., OWOLABI, M.O., PRATT, M., RAJAGOPALAN, S., REITSMA, M.B., RIBEIRO, A.L.P., RIGOTTI, N.A., RODGERS, A., SABLE, C.A., SHAKIL, S.S., SLIWA, K., STARK, B.A., SUNDSTRÖM, J., TIMPEL, P., TLEYJEH, I.I., VALGIMIGLI, M., VOS, T., WHELTON, P.K., YACOB, M., ZUHLKE, L.J., ABBASI-KANGEVARI, M., ABDI, A., ABEDI, A., ABOYANS, V., ABRHA, W.A., ABU-GHARBIEH, E., ABUSHOUK, A.I., ACHARYA, D., ADAIR, T., ADEBAYO, O.M., ADEMI, Z., ADVANI, S.M., AFSHARI, K., AFSHIN, A., AGARWAL, G., AGASTHI, P., AHMAD, S., AHMADI, S., AHMED, M.B., AJI, B., AKALU, Y., AKANDE-SHOLABI, W., AKLILU, A., AKUNNA, C.J., ALAHDAB, F., AL-EYADHY, A., ALHABIB, K.F., ALIF, S.M., ALIPOUR, V., ALJUNID, S.M., ALLA, F., ALMASI-HASHIANI, A., ALMUSTANYIR, S., AL-RADDADI, R.M., AMEGAH, A.K., AMINI, S., AMINORROAYA, A., AMU, H., AMUGSI, D.A., ANCUCANU, R., ANDERLINI, D., ANDREI, T., ANDREI, C.L., ANSARI-MOGHADDAM, A., ANTENEH, Z.A., ANTONAZZO, I.C., ANTONY, B., ANWER, R., APPIAH, L.T., ARABLOO, J., ÄRNLÖV, J., ARTANTI, K.D., ATARO, Z., AUSLOOS, M., AVILA-BURGOS, L., AWAN, A.T., AWOKE, M.A., AYELE, H.T., AYZA, M.A., AZARI, S., B, D.B., BAHEIRAEI, N., BAIG, A.A., BAKHTIARI, A., BANACH, M., BANIK, P.C., BAPTISTA, E.A., BARBOZA, M.A., BARUA, L., BASU, S., BEDI, N., BÉJOT, Y., BENNETT, D.A., BENSENOR, I.M., BERMAN, A.E., BEZABIH, Y.M., BHAGAVATHULA, A.S., BHASKAR, S., BHATTACHARYYA, K., BIJANI, A., BIKBOV, B., BIRHANU, M.M., BOLOOR, A., BRANT, L.C., BRENNER, H., BRIKO, N.I., BUTT, Z.A., CAETANO DOS SANTOS, F.L., CAHILL, L.E., CAHUANA-HURTADO, L., CÁMERA, L.A., CAMPOS-NONATO, I.R., CANTU-BRITO, C., CAR, J., CARRERO, J.J., CARVALHO, F., CASTAÑEDA-ORJUELA, C.A., CATALÁ-LÓPEZ, F., CERIN, E., CHARAN, J., CHATTU, V.K., CHEN, S., CHIN, K.L., CHOI, J.-Y.J., CHU, D.-T., CHUNG, S.-C., CIRILLO, M., COFFEY, S., CONTI, S., COSTA, V.M., CUNDIFF, D.K., DADRAS, O., DAGNEW, B., DAI, X., DAMASCENO, A.A.M., DANDONA, L., DANDONA, R., DAVLETOV, K., DE LA CRUZ-GÓNGORA, V., DE LA HOZ, F.P., DE NEVE, J.-W., DENOVA-GUTIÉRREZ, E., DERBEW MOLLA, M., DERSEH, B.T., DESAI, R., DEUSCHL, G., DHARMARATNE, S.D., DHIMAL, M., DHUNGANA, R.R., DIANATINASAB, M., DIAZ, D., DJALALINIA, S., DOKOVA, K., DOUIRI, A., DUNCAN, B.B., DURAES, A.R., EAGAN, A.W., EBTEHAJ, S., EFTEKHARI, A., EFTEKHARZADEH, S., EKHOLUENETALE, M., EL NAHAS, N., ELGENDY, I.Y., ELHADI, M., EL-JAAFARY, S.I., ESTEGHAMATI, S., ETISSO, A.E., EYAWO, O., FADHIL, I., FARAON, E.J.A., FARIS, P.S., FARWATI, M., FARZADFAR, F., FERNANDES, E., FERNANDEZ PRENDES, C., FERRARA, P., FILIP, I., FISCHER, F., FLOOD, D., FUKUMOTO, T., GAD, M.M., GAIDHANE, S., GANJI, M., GARG, J., GEBRE, A.K., GEBREGIORGIS, B.G., GEBREGZABIHER, K.Z., GEBREMESKEL, G.G., GETACHER, L., OBSA, A.G., GHAJAR, A., GHASHGHAE, A., GHITH, N., GIAMPAOLI, S., GILANI, S.A., GILL, P.S., GILLUM, R.F., GLUSHKOVA, E.V., GNEDOVSKAYA, E.V., GOLECHHA, M., GONFA, K.B., GOUDARZIAN, A.H., GOULART, A.C., GUADAMUZ, J.S., GUHA, A., GUO, Y., GUPTA,

- R., HACHINSKI, V., HAFEZI-NEJAD, N., HAILE, T.G., HAMADEH, R.R., HAMIDI, S., HANKEY, G.J., HARGONO, A., HARTONO, R.K., HASHEMIAN, M., HASHI, A., HASSAN, S., HASSEN, H.Y., HAYMOELLER, R.J., HAY, S.I., HAYAT, K., HEIDARI, G., HERTELIU, C., HOLLA, R., HOSSEINI, M., HOSSEINZADEH, M., HOSTIUC, M., HOSTIUC, S., HOUSEH, M., HUANG, J., HUMAYUN, A., IAVICOLI, I., IBENEME, C.U., IBITOYE, S.E., ILESANMI, O.S., ILIC, I.M., ILIC, M.D., IQBAL, U., IRVANI, S.S.N., ISLAM, S.M.S., ISLAM, R.M., ISO, H., IWAGAMI, M., JAIN, V., JAVAHARI, T., JAYAPAL, S.K., JAYARAM, S., JAYAWARDENA, R., JEEMON, P., JHA, R.P., JONAS, J.B., JONNAGADDALA, J., JOUKAR, F., JOZWIAK, J.J., JÜRISSE, M., KABIR, A., KAHLO, T., KALANI, R., KALHOR, R., KAMATH, A., KAMEL, I., KANDEL, H., KANDEL, A., KARCH, A., KASA, A.S., KATOTO, P.D.M.C., KAYODE, G.A., KHADER, Y.S., KHAMMARNIA, M., KHAN, M.S., KHAN, M.N., KHAN, M., KHAN, E.A., KHATAB, K., KIBRIA, G.M.A., KIM, Y.J., KIM, G.R., KIMOKOTI, R.W., KISA, S., KISA, A., KIVIMÄKI, M., KOLTE, D., KOOLIVAND, A., KORSHUNOV, V.A., KOULMANE LAXMINARAYANA, S.L., KOYANAGI, A., KRISHAN, K., KRISHNAMOORTHY, V., KUATE DEFO, B., KUCUK BICER, B., KULKARNI, V., KUMAR, G.A., KUMAR, N., KURMI, O.P., KUSUMA, D., KWAN, G.F., LA VECCHIA, C., LACEY, B., LALLUKKA, T., LAN, Q., LASRADO, S., LASSI, Z.S., LAURIOLA, P., LAWRENCE, W.R., LAXMAIAH, A., LEGRAND, K.E., LI, M.-C., LI, B., LI, S., LIM, S.S., LIM, L.-L., LIN, H., LIN, Z., LIN, R.-T., LIU, X., LOPEZ, A.D., LORKOWSKI, S., LOTUFO, P.A., LUGO, A., M, N.K., MADOTTO, F., MAHMOUDI, M., MAJEED, A., MALEKZADEH, R., MALIK, A.A., MAMUN, A.A., MANAFI, N., MANSOURNIA, M.A., MANTOVANI, L.G., MARTINI, S., MATHUR, M.R., MAZZAGLIA, G., MEHATA, S., MEHNDIRATTA, M.M., MEIER, T., MENEZES, R.G., MERETOJA, A., MESTROVIC, T., MIAZGOWSKI, B., MIAZGOWSKI, T., MICHALEK, I.M., MILLER, T.R., MIRRAKHIMOV, E.M., MIRZAEI, H., MOAZEN, B., MOGHADASZADEH, M., MOHAMMAD, Y., MOHAMMAD, D.K., MOHAMMED, S., MOHAMMED, M.A., MOKHAYERI, Y., MOLOKHIA, M., MONTASIR, A.A., MORADI, G., MORADZADEH, R., MORAGA, P., MORAWSKA, L., MORENO VELÁSQUEZ, I., MORZE, J., MUBARIK, S., MURUET, W., MUSA, K.I., NAGARAJAN, A.J., NALINI, M., NANGIA, V., NAQVI, A.A., NARASIMHA SWAMY, S., NASCIMENTO, B.R., NAYAK, V.C., NAZARI, J., NAZARZADEH, M., NEGOI, R.I., NEUPANE KANDEL, S., NGUYEN, H.L.T., NIXON, M.R., NORRIVING, B., NOUBIAP, J.J., NOUTHE, B.E., NOWAK, C., ODUKOYA, O.O., OGBO, F.A., OLAGUNJU, A.T., ORRU, H., ORTIZ, A., OSTROFF, S.M., PADUBIDRI, J.R., PALLADINO, R., PANA, A., PANDA-JONAS, S., PAREKH, U., PARK, E.-C., PARVIZI, M., PASHAZADEH KAN, F., PATEL, U.K., PATHAK, M., PAUDEL, R., PEPITO, V.C.F., PERIANAYAGAM, A., PERICO, N., PHAM, H.Q., PILGRIM, T., PIRADOV, M.A., PISHGAR, F., PODDER, V., POLIBIN, R.V., POURSHAMS, A., PRIBADI, D.R.A., RABIEE, N., RABIEE, M., RADFAR, A., RAFIEI, A., RAHIM, F., RAHIMI-MOVAGHAR, V., UR RAHMAN, M.H., RAHMAN, M.A., RAHMANI, A.M., RAKOVAC, I., RAM, P., RAMALINGAM, S., RANA, J., RANASINGHE, P., RAO, S.J., RATHI, P., RAWAL, L., RAWASIA, W.F., RAWASSIZADEH, R., REMUZZI, G., RENZALO, A.M.N., REZAPOUR, A., RIAHI, S.M., ROBERTS-THOMSON, R.L., ROEVER, L., ROHLOFF, P., ROMOLI, M., ROSHANDEL, G., RWEGERERA, G.M., SAADATAGAH, S., SABER-AYAD, M.M., SABOUR, S., SACCO, S., SADEGHI, M., SAEEDI MOGHADDAM, S., SAFARI, S., SAHEBKAR, A., SALEHI, S., SALIMZADEH, H., SAMEI, M., SAMY, A.M., SANTOS, I.S., SANTRIC-MILICEVIC, M.M., SARRAFZADEGAN, N., SARVEAZAD, A., SATHISH, T., SAWHNEY, M., SAYLAN, M., SCHMIDT, M.I., SCHUTTE, A.E., SENTHILKUMARAN, S., SEPANLOU, S.G., SHA, F., SHAHABI, S., SHAHID, I., SHAIKH, M.A., SHAMALI, M., SHAMSIZADEH, M., SHAWON, M.S.R., SHEIKH, A., SHIGEMATSU, M., SHIN, M.-J., SHIN, J.I., SHIRI, R., SHIUE, I., SHUVAL, K., SIABANI, S., SIDDIQI, T.J., SILVA, D.A.S., SINGH, J.A., MTECH, A.S., SKRYABIN, V.Y., SKRYABINA, A.A., SOHEILI, A., SPURLOCK, E.E., STOCKFELT, L., STORTECKY, S., STRANGES, S., SULIANKATCHI ABDULKADER, R., TADBIRI, H., TADESSE, E.G., TADESSE, D.B., TAJDINI, M., TARIQUJJAMAN, M., TEKLEHAIMANOT, B.F., TEMSAH, M.-H., TESEMA, A.K., THAKUR, B., THANKAPPAN, K.R., THAPAR, R., THRIFT, A.G., TIMALSINA, B., TONELLI, M., TOUVIER, M., TOVANI-PALONE, M.R., TRIPATHI, A., TRIPATHY, J.P., TRUELSEN, T.C., TSEGAY, G.M., TSEGAYE, G.W., TSILIMPARIS, N., TUSA, B.S., TYROVOLAS, S., UMAPATHI, K.K., UNIM, B., UNNIKRIISHNAN, B., USMAN, M.S., VADUGANATHAN, M., VALDEZ, P.R., VASANKARI, T.J., VELAZQUEZ, D.Z., VENKETASUBRAMANIAN, N., VU, G.T., VUJCIC, I.S., WAHEED, Y., WANG, Y., WANG, F., WEI, J., WEINTRAUB, R.G., WELDEMARIAM, A.H., WESTERMAN, R., WINKLER, A.S., WIYSONGE, C.S., WOLFE, C.D.A., WUBISHET, B.L., XU, G., YADOLLAHPOUR, A., YAMAGISHI, K., YAN, L.L., YANDRAPALLI, S., YANO, Y., YATSUYA, H., YEHEYIS, T.Y., YESHAW, Y., YILGWAN, C.S., YONEMOTO, N., YU, C., YUSEFZADEH, H., ZACHARIAH, G., ZAMAN, S.B., ZAMAN, M.S., ZAMANI, M., ZAND, R., ZANDIFAR, A., ZARGHI, A., ZASTROZHIN, M.S., ZASTROZHINA, A., ZHANG, Z.-J., ZHANG, Y., ZHANG, W., ZHONG, C., ZOU, Z., ZUNIGA, Y.M.H., MURRAY, C.J.L. and FUSTER, V., 2020. Global Burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: update from the GBD 2019 study. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 76, no. 25, pp. 2982-3021. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>. PMID:33309175.
- SALIM, N.N., POERNOMO, A.T. and SUDJARWOET, 2021. Activity of fibrinolytic enzyme from red bean tempeh (*Vigna angularis*) fermented by *Rhizopus orizae* FNCC 6078. *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, vol. 18, pp. 353-358.
- SANTANA, R.S., MENDES, F.S., PAULA DA SILVA, B.J., LIMA, E.S., NASCIMENTO, T.P., CARNEIRO DA CUNHA, M.N., PORTO, A.L.F., TEIXEIRA, M.F.S., CARVALHO, R.P. and GOMES, W.R., 2024. Recovery and partial purification of fibrinolytic protease from *Pleurotus ostreatus* and *P. eryngii* and cytotoxic and antioxidant activity of their extracts. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, vol. 54, no. 4, pp. 545. PMID:37667995.
- SANTANA, R.S.S., BATISTA, S.C.P.B., ASSUNÇÃO, E.N.A., MARTIM, S.R.M., TEIXEIRA, M.F.S.T., GOMES, W.R.G. and CARVALHO, R.P.C., 2022. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa. *Concilium*, vol. 22, no. 6, pp. 987-995. <http://doi.org/10.53660/CLM-573-650>.
- SANTOS, J.G., CRUZ FILHO, R.F. and TEIXEIRA, M.F.S., 2016. Produção e caracterização de proteases de Bacilos da Amazônia com potencial fibrinolítico. *Scientia Amazonia*, vol. 5, no. 1, pp. 15-21.
- SHARMA, C., OSMOLOVSKIY, A. and SINGH, R., 2021. Microbial fibrinolytic enzymes as anti-thrombotics: production, characterisation and prodigious biopharmaceutical applications. *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 11, pp. 1880. <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111880>. PMID:34834294.
- SILVA, G.M., BEZERRA, R.P., TEIXEIRA, J.A., SILVA, F.O., CORREIA, J.M., PORTO, T.S., LIMA-FILHO, J.L. and PORTO, A.L.F., 2016. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. *Acta Amazonica*, vol. 46, no. 3, pp. 323-332. <http://doi.org/10.1590/1809-4392201600022>.
- SOLANKI, P., PUTATUNDA, C., KUMAR, A., BHATIA, R. and WALIA, A., 2021. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. *3 Biotech*, vol. 11, no. 10, pp. 428. <http://doi.org/10.1007/s13205-021-02928-z>. PMID:34513551.
- SONDAG, D., VERHOEVEN, S., LÖWIK, D.W.P.M., VAN GEFFEN, M., VEER, C.V., VAN HEERDE, W.L., BOLTJE, T.J. and RUTJES, F.P.J.T., 2023. Activity sensing of coagulation and fibrinolytic proteases. *Chemistry*, vol. 29, no. 18, e202203473. <http://doi.org/10.1002/chem.202203473>. PMID:36484562.

- SUPIT, A., LUSINANTO, A., ARIYANI, T. and GUNARTI, D.R., 2024. Systematic review: how to obtain fibrinolytic enzymes from fungi. *World Journal of Biology Pharmacy and Health Sciences*, vol. 18, no. 2, pp. 394–402. <http://doi.org/10.30574/wjbphs.2024.18.2.0303>.
- TARAFDAR, A., SIROHI, R., GAUR, V.K., KUMAR, S., SHARMA, P., VARJANI, S., PANDEY, H.O., SINDHU, R., MADHAVAN, A., RAJASEKHARAN, R. and SIM, S.J., 2021. Engineering interventions in enzyme production: lab to industrial scale. *Bioresource Technology*, vol. 326, pp. 124771. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124771>. PMID:33550211.
- TRONCOSO, D.F., SÁNCHEZ, A.D. and FERREIRA, L.F., 2022. Production of plant proteases and new biotechnological applications: an updated review. *ChemistryOpen*, vol. 11, no. 3, e202200017. <http://doi.org/10.1002/open.202200017>. PMID:35286022.
- WANG, S.L., WU, Y.Y. and LIANG, T.W., 2011. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. *New Biotechnology*, vol. 28, no. 2, pp. 196–202. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.09.003>. PMID:20849993.