UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTE
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL FIBRINOLÍTICO

JANUÁRIO GAMA DOS SANTOS

MANAUS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGBIOTE
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

JANUÁRIO GAMA DOS SANTOS

PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL FIBRINOLÍTICO

Tese apresentado no Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Orientadora: Prof[a] Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

Co-Orientadora: Prof[a] Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

MANAUS
2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Santos, Januário Gama dos

S237p Proteases produzidas por bactérias da Amazônia com potencial fibrinolítico / Januário Gama dos Santos. - Manaus: UFAM, 2009.
30 f.: il.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2009.
Orientadora: Profª. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
Co-orientadora: Profª Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

1. Enzimas – aplicações industriais 2. Protease 3. Enzimas hidrolíticas 4. Enzimas fibrinolíticas I. Teixeira, Maria Francisca Simas (Orient.) II. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 663.18(043.2)

JANUÁRIO GAMA DOS SANTOS

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PROTEOLITICAS NO SOLO DA AMAZÔNIA COM POTENCIAL FIBRINOLÍTICO

Tese apresentado no Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Saúde.

Aprovada em 04 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª. Maria Francisca Simas Teixeira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Profª Drª.Ana Lucia Figueiredo Porto. Membro
Universidade Feral Rual de Pernanbuco - UFRPE

Drª. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Membro
FIOCRUZ - Amazonas

Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Dra. Raquel Borges Moroni, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PPG-BIOTEC

60ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 06 de agosto de 2009 às 15:00 horas no Auditório da Química, Bloco "B"- Setor Sul – UFAM, **Januário Gama dos Santos** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada **"Caracterização de Proteases Produzidas por Bactérias da Amazônia com Potencial *Fibrinolítico*"**.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Maria Francisca Simas Teixeira (Orientadora)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Ana Lúcia Figueredo Porto – (UFRPE)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Ormezinda Celeste C. Fernandes – (FIOCRUZ)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Ila Maria de Aguiar Oliveira – (UFAM)	Aprovado (X) Reprovado ( )	
Dra. Raquel Borges Moroni – UFAM	Aprovado (X) Reprovado ( )	

Resultado Final: Aprovado (X)
Reprovado ( )

Manaus, 06 de agosto de 2009.

Coordenador do PPGBIOTEC

Obs: O Dr. Januário Gama dos Santos deverá realizar as correções sugeridas pela banca examinadora, incluindo a alteração do título da tese para "Proteases produzidas por bactérias da Amazônia com potencial fibrinolítico", no prazo máximo de 30 dias, a contar desta data.

Aos meus pais Miguel Gama dos Santos e Alice Alpino dos Santos *"in memorian"*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força invisível

A professora Drª Maria Francisca Simas Teixeira, pela orientação, incentivo, amizade e oportunidade que me proporcionou para realização deste trabalho.

A Professora Drª Ana Lucia Figueiredo Porto, pela Orientação amizade, paciência confiança e incentivo.

Aos meus familiares, Maria do Carmo, Jhana, Jhena e Jhoina por todo carinho e paciência, apoio e incentivos na realização deste trabalho.

Aos meus irmãos Serafim, Maria e Luzia Gama dos Santos pelo incentivo durante a realização dos meus estudos.

Ao Raimundo Felipe da Cruz Filho, meus agradecimentos especiais pela colaboração durante a realização das atividades práticas e preparação das publicações.

Aos Professores da disciplina de Microbiologia Paulo Cesar Carvalho Montenegro, Takeshi Matsuura, Raque Borges por todo Carinho paciência a mim dispensado durante todo desenvolvimento deste trabalho científico.

A todos os meus demais amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia Vicente Correa, Flavio Becker e Rogério Monteiro Rocha por toda ajuda, paciência e colaboração.

Ao Professor Dr. Fabio Marroni e a Dra. Ormezinda Celeste pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade da realização desta pesquisa.

Deus está aqui neste momento
Sua presença é real em meu viver
Entregue sua vida e seus problemas
Fale com Deus, ele vai ajudar você.
(Padre Reginaldo Manzotti)

RESUMO

As bactérias, entre os demais microrganismos, são fontes naturais de uma variedade de enzimas, inclusive de proteases do grupo fibrinolítico. Estas enzimas têm como principal função, catalisar a clivagem de ligações peptídicas de proteínas**,** são amplamente utilizadas em diversos segmentos industriais e processos biotecnológicos representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo. As proteases com atividades fibrinolíticas são capazes de lisar a fibrina prevenindo ou currando doenças trombóticas pela degradação de coágulos sanguíneos. Estas enzimas vêm ganhando importância na área médica, farmacêutica e de alimentos devido à eficácia da ação fibrinolítica e pela possível aplicação das mesmas no tratamento de distúrbios cardiovasculares. Neste trabalho trinta colônias de bactérias do gênero *Bacillus*, isoladas de amostra de solo da Amazônia contaminada com petróleo foram estudadas quanto seu potencial proteolítico e fibrinolítico. Nas análises do potencial proteolítico prevaleceu o *Bacillus subtilis* (21%) e *Bacillus circulans* (13%). Os trinta isolados foram submetidos à fermentação submersa por 24 horas e, do extrato enzimático produzido foi realizada a determinação da atividade proteolítica e da atividade fibrinolítica. O maior valor obtido para a atividade proteolítica foi de 7,073U/mL e para a atividade fibrinolítica ocorreu a formação de halos em placa de fibrina no *Bacillus* B 16 . Os resultados demonstraram o potencial de produção de proteases. A atividade fibrinolítica foi apresentada no *Bacillus* B16, selecionado para a caracterização das proteases que expressaram atividade numa ampla faixa de pH e em todas as temperaturas testadas (25^{o}C a 80^{o}C), exibindo ótima atividade em pH 8,4 e 45^{o}C, respectivamente.

Palavra-Chave: Solo, *Bacillus*, Protease, fibrinolítico

ABSTRACT

The bacteria, among other microorganisms, are natural sources of a variety of enzymes, including proteases of the fibrinolytic group. These enzymes are mainly responsible, catalyze the cleavage of peptide bonds of proteins, are widely used in various industries and biotechnological processes representing approximately 60% of the enzymes marketed worldwide. Proteases with fibrinolytic activity are capable of lysing fibrin preventing thrombotic diseases or corrals for the degradation of blood clots. These enzymes are gaining importance in medical, pharmaceutical and food due to the effectiveness of fibrinolytic action and the possible application of the same in the treatment of cardiovascular disorders. In this work thirty colonies of bacteria of the genus Bacillus, isolated from soil sample contaminated with oil in the Amazon. Were studied for their potential proteolytic and fibrinolityc. In the analysis of the potential fibrinolytic prevailed Bacillus subtilis (21%) and Bacillus circulans (13%). The thirty isolates were subjected to submerged fermentation for 24 hours, and the enzymatic extract produced was performed to determine the proteolytic activity and fibrinolytic activity. The highest value obtained for the proteolytic activity was 7.073 U / mL, and fibrinolytic activity occurred in the formation of halos in Bacillus fibrin plate B 16. The results demonstrated the potential of producing proteases. A fibrinolytic activity was shown in Bacillus B16, selected for the characterization of proteases expressed that activity in a wide pH range and at all temperatures tested (25oC to 80oC), showing optimal activity at pH 8.4 and 45oC, respectively.

Keyword: Soil, Bacillus protease, fibrinolytic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. *Bacillus* fibrinolíticos associados a alimentos fermentados comercializados em ..países Asiáticos. 21

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01: Determinação da atividade proteolítica qualitativa 23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 JUSTIFICATIVA 15
3 OBJETIVOS 17
3.1 Objetivo Geral 17
3.2 Objetivos Específicos 17
4 REVISÃO DE LITERATURA 18
5 METODOLOGIA 23
5.1 Isolamento e identificação de bactérias proteolíticas de amostras de solo 23
5.2 Determinação da atividade proteolítica em meio sólido 23
5.3 Produção de proteases em meio líquido 24
5.4 Determinação da atividade proteolítica 24
5.5 Determinações da atividade fibrinolítica em meio sólido 24
5.6 Efeito do pH na estabilidade e na atividade proteolítica 25
5.7 Efeito da temperatura na estabilidade e na atividade da protease 25
5.8 Analise estatística 26
6 REFERÊNCIAS 27

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos são fontes renováveis de biocatalisadores, todavia o custo de produção das enzimas e o processo de *downstream* são os obstáculos contra o sucesso da aplicação de proteases nos diversos ramos industriais (PENG et al., 2005). Contudo, nas últimas décadas diversas pesquisas estão em desenvolvimento a fim de analisar e isolar microrganismos para a produção, purificação e caracterização das proteases com atividade fibrinolítica (WANG et al., 2009).

Proteases de origem microbiana são enzimas hidrolíticas, que não só desempenham papel importante no metabolismo celular, mas também ganharam importância em setores industriais. Na atividade fibrinolítica vem ganhando importância na área médica e farmacêutica, devido a eficácia dos agentes fibrinolíticos aplicados no tratamento de distúrbios cardiovasculares (PENG et al., 2005). A agregação de fibrina, uma proteína primária componente dos coágulos sanguíneos é responsável pelo aparecimento destes distúrbios. A trombina (EC 3.4.21.5) é dissolvida pela enzima fibrinolítica, plasmina (EC 3.4.21.7), que mantém o fluxo sanguíneo em sítios de lesão vascular e é um importante componente da resposta hemostática normal (CHOI; KIM, 2000).

Existem mais de vinte enzimas no corpo que contribuem com a coagulação do sangue enquanto que apenas uma, a plasmina, pode quebrar e remover o coágulo (AGREBI et al, 2009).

Agentes fibrinolíticos que estão disponíveis para uso clínico são ativadores de plasminogênio, como a uroquinase e o ativador bacteriano do plasminogênio, estreptoquinase. Apesar de sua ampla utilização, estes agentes fibrinolíticos apresentam desvantagens como meia-vida curta, altos custos, riscos de reações alérgicas e complicações hemorrágicas. Assim, a investigação de agentes fibrinolíticos de outras fontes continua (OMURA et al, 2005) As enzimas fibrinolíticas foram descobertas em veneno de cobra (HE et al., 2007), insetos (AHN

et al., 2003), criaturas marinhas (WANG et al, 2007) e em alimentos fermentados por *Bacillus subtilis natto* (OMURA et al, 2005), além de processos fermentativos envolvendo diversos microorganismos, principalmente bactérias do gênero *Bacillus*, que tem sido amplamente estudados devido seu potencial em produzir proteases fibrinolíticas

As proteases fibrinolíticas devido à eficiência na lise de coágulos dos vasos sanguíneos estão sendo estudadas para fins terapêuticos (WANG et al., 2009). De acordo com o mecanismo de ação, os agentes trombolíticos típicos de origem microbiana são classificados como ativador do plasminogênio do tipo tecidual e uroquinase, os demais são proteínas semelhantes à plasmina (nattoquinase e lumbroquinase) que degradam à fibrina nos coágulos sanguíneos, assim dissolvendo rápida e completamente os trombos (PENG et al., 2003).

Com relação às enzimas fibrinolíticas, muitas tentativas experimentais têm sido realizadas para melhorar a expressão dessas enzimas, incluindo a seleção de um meio de cultura ideal, a otimização das condições ambientais de cultivo e, através engenharia genética, para obtenção de estirpes com alta expressão da enzima (PENG et al., 2005).

As bactérias do gênero *Bacillus* spp., entre os demais microrganismos são fontes de uma variedade de enzimas fibrinolíticas do tipo intra e extracelular, a exemplo da natoquinase, protease produzida por *B. subtilis nato*, potencial candidata a um fármaco para o tratamento e prevenção de trombo (KO et al., 2004; SEO; LEE, 2004).

Falahatpshe et al. (2007) relata que a partir de 2005 houve o aumento de 1,0 a 1,2 bilhões de dólares na demanda mundial das enzimas proteolíticas devido a ampla aplicação dessas enzimas nos diversos segmentos industriais. Desta forma, tendo em vista que cerca de 20% da biodiversidade mundial está concentrada no Brasil, sobretudo na Floresta Amazônica, considerada fonte inestimável de matérias-primas (SOUZA et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

As enzimas desempenham papel fundamental no ciclo de nutrientes no solo e são originárias de diversos grupos microbianos. Essas atividades são frequentemente usadas como índice de atividade microbiana uma vez que são importantes catalisadoras de uma rede de reações necessárias aos processos vitais dos microrganismos, decomposição de resíduos orgânicos, formação da matéria orgânica e estrutura do solo (BATISTA, 2007).

Em função dessa atividade realizada pelos microrganismos para o aproveitamento da matéria orgânica, tais seres vivos representam excelente fonte de enzimas para aplicação industrial, especialmente devido à facilidade de manipulação genética e a ampla diversidade bioquímica (GODFREY; WEST, 1996).

Um clássico exemplo dessas enzimas são as proteases fibrinolíticas usadas no tratamento de patologia cardiovasculares. O relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) demonstra que anualmente 17 milhões de pessoas morrem de doenças cardiovasculares (DCV). Nesse contexto, uma das principais causas, entre a variedade de DCV vem sendo a trombose, isto é, formação de coágulo de sangue, cujo principal componente protéico desses coágulos - a fibrina - é formada a partir de fibrinogênio via proteólise pela trombina (PENG et al., 2005; SEO; LEE, 2004).

Entretanto, os coágulos de fibrina podem ser hidrolisados por proteases fibrinolíticas evitando a trombose que ocorre oriundo de transtornos orgânicos. No processo de degradação de espécies homeotérmicas, a fibra de fibrina insolúvel é hidrolisada pela plasmina formada a partir de plasminogênio, por ativadores plasminogênio, como ativador do plasminogênio tissular (t-PA), ativador do plasminogênio vascular, ativador plasminogênio do sangue, uroquinase, fator Hagemano e complexo plasminogênio streptoquinase (KIM et al., 2008).

Atualmente, a natoquinase uma enzima trombolítica, sintetizada a partir do *Bacillus subtilis natto*, está disponível comercialmente em vários alimentos fermentados com a

finalidade de combater trombose, processo que conduz ao infarto do miocárdio e a outras doenças cardiovasculares. As enzimas fibrinolíticas microbianas são empregadas nas terapias afins, predominantemente, em função dos baixos custos e por não apresentarem efeitos colaterais indesejáveis (PENG et al., 2005).

Devido às propriedades proteolíticas dos microrganismos, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para descobertas, especialmente de *Bacillus* produtores dessas enzimas que também podem retardar o envelhecimento, removendo as proteínas danificadas pelos radicais livres que auxiliam no desenvolvimento de doenças como o câncer, diabetes, aterosclerose e outras doenças degenerativas (FUJITA et al., 1993).

Considerando a importância medicinal das proteases e a necessidade da descoberta de novas fontes fibrinolíticas, esta pesquisa se justifica devido ao grande potencial microbiológico da Amazônia e à ampla utilização dessas enzimas no âmbito biotecnológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar bactérias produtores de enzimas proteolíticas de amostra de solo contaminado com petróleo, no Estado do Amazonas, para selecionar e caracterizar uma enzima com potencial fibrinolítico.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e identificar bactérias produtoras de enzimas proteolíticas;
- ✓ Selecionar uma espécie com potencial fibrinolítico entre os bacilos produtores de proteases;
- ✓Caracterizar as proteases dos bacilos isolados quanto ao pH e a temperatura e pH ótima

4 REVISÃO DE LITERATURA

Entre as fontes naturais de proteases, os microrganismos representam um recurso renovável atrativo por que podem ser cultivados por métodos fermentativos, em larga escala, em tempo relativamente curto. Além disso, proteínas microbianas têm longo prazo de validade e podem ser armazenadas em condições ideais por longo período, sem perda significativa da atividade (GUPTA et al., 2002; UYAR; BAYSAL, 2004).

Apesar da longa lista de microorganismos produtores de protease, apenas determinadas espécies são consideradas adequadas para a exploração comercial, classificados como seguros (*Generally recognized as safe* - GRAS), não-tóxicos e não-patogênicos (GUPTA et al., 2002; NELSON; COX, 2000).

Leveduras, fungos filamentosos, actinomicetos e outras bactérias são fontes especiais de enzimas proteolíticas, com predominância das proteases do tipo alcalina e serina. Entre as bactérias, os *Bacillus* constituem um dos principais grupos proteolíticos microbianos que predominam nos diversos ecossistemas, sendo que a maioria produz protease alcalina, como *B. licheniformis, B. subtilis, B. amyloliquifaciens, B. mojavensis,* (DUTTA; et al., 2005; GUPTA; et al., 2002; NELSON; COX, 2000; WANG et al., 2006).

Em geral, a síntese de protease em *Bacillus* é constitutiva ou parcialmente induzível e controlada por mecanismos complexos, transitoriamente, entre o crescimento exponencial e a fase estacionária. Todavia está comprovado que as condições de luminosidade, pH e aeração influenciam no rendimento dessas enzimas durante o processo de produção "*in vitro"*. (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Entre outras enzimas, as proteases constituem um dos grupos comercialmente de alto valor, com, têm extensa aplicação em produtos e processos industriais, incluindo detergentes, alimentos, farmacêuticos, couro, seda e recuperação de prata dos filmes fotográficos e raio-X (ABIDI et al., 2008; SILVA NEVES et al., 2006; NELSON; COX, 2000).

Kumar e Takagi (1999) citam que filme de raio-X contém aproximadamente 1,5 a 2,0% de prata nas camadas de gelatina. Na prática, esses filmes são queimados para recuperação da prata, processo que provoca um grande problema de poluição ambiental. Assim, a hidrólise enzimática das camadas de gelatina do filme permite a reciclagem da prata e do poliéster.

Outras aplicações de enzimas proteolíticas são na formulação de biofármacos, como aditivo em produto para limpeza de lente de contato e solução esfoliante (ANWAR; SALEEMUDDIN, 2000). Todavia, para uso terapêutico, pancreatina, asparaginase, colagenases, estreptoquinase, estafiloquinase, uroquinase, glutaminase e hialuronidase são as que têm destaque nas aplicações biomédicas (CHANG et al., 2000).

Como agentes terapêuticos, as proteases têm um mercado significativo associado a excelentes possibilidades de expansão a partir de novas informações científicas que possam explicar o mecanismo de ação e os efeitos desses biocatalisadores nos processos clínicos (CHANG et al., 2000).

Ainda para fins medicinais, têm aumentado as investigações a cerca das proteases fibrinolíticas, enzimas capazes de degradar diferentes tipos de coágulos sangüíneos por apresentar alta especificidade à plasmina que desempenha importante papel na coagulação. Estas enzimas encontradas no plasma são responsáveis pela conversão do plasminogênio em sua forma ativa à plasmina, por hidrólise. Normalmente são sintetizadas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, existindo em todos os organismos humanos, como artérias, veias e sistema linfático, à medida que o corpo envelhece diminui a síntese desta macromolécula. Dessa forma, a pouca produção dessas enzimas pode levar ao desenvolvimento de condições trombóticas em qualquer parte do corpo (CHANG et al., 2000).

O uso de enzimas fibrinolíticas no tratamento de doenças iniciou-se com o conhecimento de que a lise da fibrina pode ser efetuada "*in vivo"* através de um processo que envolve a conversão de plasminogênio à plasmina e, de que ativadores do plasminogênio podem produzir fibrinólise controlada. A partir dessas comprovações, os estudos para descoberta de novos produtos trombolíticos tem tido importância na área de saúde, essencialmente para tratamento de doenças cardiovasculares (PENG et al., 2005).

A primeira geração de agentes antitrombóticos inclui a estreptoquinase bacteriana e a uroquinase produzida a partir da urina humana. A crescente incidência de doenças tromboembólicas tem estimulado a busca de novos agentes, inclusive com utilização da tecnologia do DNA recombinante, capazes de estimular com maior especificidade os sistemas fibrinoliticos naturais (PIERARD; BOLLEN, 1990; BICKERSTAFF, 1987).

De acordo com citações de Gupta et al. (2002), as enzimas fibrinolíticas são também recomendadas no combate ao envelhecimento, removendo as proteínas danificadas pelos radicais livres que facilitam o desenvolvimento de doenças, como câncer, diabetes e outras doenças degenerativas. Além disso, as proteases colagenoliticas e fibrinolíticas tem grande aplicação como cicatrizantes, na forma de pomadas e cosméticos (PENG et. al., 2005).

Apesar da existência de outros agentes antitrombolíticos de uso corrente como uroquinase, alteplase, anistreplase, reteplase e asparaginase as enzimas fibrinolíticas de origem microbiana, influenciadas pelo seu baixo custo e, por não apresentar efeitos colaterais, estimula novas pesquisas que deve ser incentivadas com objetivo de isolar outras fontes de enzimas fibrinolíticas (DEWICK, 2002; WANG et al., 2006).

Nesse contexto, os microrganismos são importantes fontes de recursos para agentes antitrombolíticos. As estreptoquinase de *Streptococcus hemolíticos* e estafiloquinase de *Staphylococcus aureus* foram os primeiros agentes eficazes na terapêutica antitrombolitica (ZHANG, 2002). Ao longo dos anos, outras enzimas fibrinolíticas provenientes de diferentes

microrganismos foram descobertas a partir de *Bacillus* (CHOI; KIM 2000; PENG; ZHANG, 2002).

Peng et al. (2005) descrevem *B. subtilis* BK-17, *B. subtilis* A1, *B. subtilis* 168, *Actinomyces thermovulgaris*, *Streptomyces megasporus* SD5, *Streptomyces spheroids* M8-2 e *Streptomyces sp*. Y405, como bactérias produtoras das enzimas fibrinolíticas, cujas propriedades fisiológicas e químicas foram caracterizadas e sua eficácia comprovada como agente para tratamento na terapia antitrombolitica.

Enzimas fibrinolíticas pertencentes ao grupo das metaloproteases exigem íons metálicos bivalentes (Zn^{2+} e Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mg^{2+}, Co^{2+} e Hg^{2+}) para atividade. Têm pH ótimo entre 6,0 e 7,0, com exceção de certos grupos que tem ótimo pH na faixa de 10,5 (LEE et al., 2001; LIU et al., 2005; KIM et al., 1997).

Nas últimas décadas, na comunidade asiática, enzimas fibrinolíticas de origem microbiana são constituintes de alimentos fermentados a base de soja, peixe ou de molhos (Tabela 1), produtos que são consumidos com objetivo de prevenir as tromboses e outros acidentes cardiovasculares (PENG et al., 2005).

Microrganismos	Alimentos	Nome da Enzima
Bacillus subtilis natto	Natto (Japan)	Natoquinase, NK
Bacillu samyloliquefaciens DC-4	Douchi (China)	Subtilisin DFE
Bacillus sp. CK	Chungkook-jang (Korea)	CK
Bacillus sp. DJ-4	Doen-jang (Korea)	Subtilisin DJ-4
Bacillus sp. DJ-2	Doen-jang (Korea)	bpDJ-2
Bacillus sp. KA38	Jeot-gal (Korea)	Jeot-gal enzyme
B. subtilis QK02	Fermentedo de soja	QK-1 and QK-2
Bacillus firmus NA-1	Natto	Natoquinase
B. subtilis IMR-NK1	Natto	Natoquinase
Bacillus sp KDO-13	Molho de soja (Korea)	Natoquinase

Tabela 1. *Bacillus* fibrinolíticos associados a alimentos fermentados comercializados em países Asiáticos.Fonte: Peng et al., 2005

A natoquinase, protease fibrinolítica sintetizada a partir do *Bacillus natto* já está disponível comercialmente em vários alimentos fermentados, como aditivo alimentar, otimizados para prevenir a trombose (PENG; ZHANG, 2002).

De acordo com os seus mecanismos catalíticos as enzimas com propriedades fibrinolítica são classificadas em serina protease (NK, subtilisina PFED, e CK) e metaloproteases (Jeot-Gal enzima, AMMP, e Baciloquinase II). As enzimas fibrinolíticas do tipo serina proteases geralmente são ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima nos valores de pH entre 8,0 e 10; peso molecular com intervalo entre 27,7 e 44 kDa, A temperatura ótima tem uma vasta gama, entre 30 e 70 °C (KIM et al., 1996; KIM; CHOI, 2000), principalmente de cerca de 50°C. Quase todas as proteases serina fibrinolítica pertencem à subtilisina de *Bacillus* sp. Enquanto as enzimas fibrinolíticas do grupo metaloproteases expressam sua atividade na presença de íons metálicos bivalentes tais como Co^{+2} e Hg^{+2} para enzimas de *Bacillus* sp. e pH ótimo de atividade entre os valores 6,0 e 7,0. (PENG et al., 2005).

5 METODOLOGIA

5.1 Isolamento e identificação de bactérias proteolíticas de amostras de solo

Para o isolamento e identificação das bactérias proteolíticas foram analisadas 30 amostras de solo contaminado com petróleo, no Estado do Amazonas. Um grama de cada amostra de solo, adicionado em 9 mL de água peptonada 1% (p/v), em tubo de ensaio de 16,5 mm x 150 mm foi submetido a choque térmico (80°C) por 12 minutos, para eliminar as formas vegetativas de outras bactérias permanecendo somente bactérias esporuladas do gênero *Bacillus*, em seguida colocado em banho de gelo por cinco minutos (SARAIVA et al., 2007; SANTOS et al., 2007). Posterior a esse tratamento, 1000 µL desta solução, foi semeado em ágar gelatina-leite, pH 7,0, em placas de Petri de 100 x15 mm. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (PATEL et. al. 2006). Seguido ao processo de isolamento e purificação, as bactérias protease positiva foram identificadas segundo a metodologia recomendada por Barrow e Feltham (1999).

5.2 Determinação da atividade proteolítica em meio sólido

Para determinação da atividade proteolítica em meio sólido, as bactérias protease positiva foram cultivadas em ágar gelatina leite pH 7,0 (PATEL et. al. 2006) e a atividade foi monitorada (SIQUEIRA, 2007). A atividade enzimática (Pz) foi expressa conforme a expressão citada a seguir, considerando-se Pz = 1,0 (ausência de atividade); Pz < 1,0 (atividade proteolítica positiva).

$$Pz = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia x diâmetro do halo}}$$

Equação 01: Determinação da atividade proteolítica qualitativa

5.3 Produção de proteases em meio líquido

Os *Bacillus* que apresentaram atividade para produção de protease identificados no item 4.1 foram reativados em caldo nutritivo, a 37°C por 24 horas. Desses cultivos foi retirado 1000 µL para inoculação frasco de Erlenmeyer contendo 40 mL de Solução de Manachini [(g/l) KH2PO4 2g; (NH4)2SO4 1g; MgSO4 7H2O 0,1 g; Na2HPO4 2H2O 0,9 g; Extrato de Levedura 1 g; água destilada 1000 mL], pH 7,0, adicionada de gelatina 1% (SILVA NEVES et al., 2006) . A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 120 rpm, a 37°C por 24 horas. O sobrenadante foi separado da biomassa por filtração sob vácuo e submetido à determinação da atividade proteolítica. Como foi identificado *Bacillus* proteases positivo

5.4 Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica utilizou-se 150 µL do extrato bruto e como substrato 250 µL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A reação foi mantida em câmara escura e após 60 minutos, adicionou-se 1,2 mL de Ácido Tricloroacético 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4 °C por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 1,2 mL para ser adicionado a 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida por Leigton (1973), como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 1 em 60 minutos, sendo expressa em U/mL.

5.5 Determinações da atividade fibrinolítica em meio sólido

O ensaio enzimático para determinação da atividade fibrinolítica foi realizado em placas de Petri de 5,5 cm diâmetro contendo 2 mL de solução de fibrinogênio humano (50

mg/mL em solução tampão Tris HCl 20 mM pH 8,0) homogeneizado com 40 mL de ágar a 75% (p/v) em solução tampão Tris HCl 20 mM pH 8,0 adicionado de 0,15 M de Cloreto de sódio a 50 ºC (KO et. al., 2004). Posteriormente 8 ml desta solução foi adicionada a placa de Petri contendo 40 µL de solução de trombina (Sigma, St. Louis, MO USA) dissolvida em solução tampão Tris HCl (20 mM pH 8,0). Para formação do coágulo, as placas foram incubadas por 30 minutos a 25 ^{o}C. Em seguida foram feitos *cup-plate* com 3 mm de diâmetros na superfície do meio sólido, em placa de Petri . Em cada *cup-plate* foi adiciona 10 µL de extrato bruto, seguindo-se a incubação das placas a 37 ºC durante 15 horas. Como padrão foi utilizado a streptoquinase.

5.6 Efeito do pH na estabilidade e na atividade proteolítica

Para verificação do efeito do pH na estabilidade e na atividade das proteases o substrato foi obtido por dissolução em vários tampões: solução tampão citrato 0,2 M (pH de 4,0 a 6,0); solução tampão fosfato 0,2M (pH de 7,0 a 8,0) e solução tampão Tris HCl 0,2 M (7,2 a 9,0). Todos os testes foram incubados a 25 ^{o}C por 60 minutos. O tempo de incubação das amostras foi de 90 minutos para cada faixa de pH, determinando-se atividade enzimática a cada 15 minutos (CAVALCANTI et al., 2004).

5.7 Efeito da temperatura na estabilidade e na atividade da protease

Nos estudos de estabilidade a solução contendo a enzima foi incubadas em diferentes pHs, para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação foram incubados nas temperaturas de 25^{o}C a 80^{o}C por 60 minutos. Para os ensaios de estabilidade o extrato bruto foi incubado nas temperaturas de 25 ºC a 80 ºC e, o tempo de incubação das amostras foi de 90 minutos para cada temperatura, determinando-se atividade enzimática a cada 15 minutos (CAVALCANTI et al., 2004). Todos os experimentos foram realizados em

triplicata.

5.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e o Teste de Tuckey com nível de significância 5%, utilizando-se o *software* Minitab versão 14.0.

6 REFERÊNCIAS

ABIDI, F.; LIMAN, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. Pro. Biochem, v. 43, p. 1202-1208, 2008.

AGREBI, R; HADDAR, A; HAJJI, M; FRIKHA, F; MANNI, L; JELLOULI, K;NASRI, M. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium Bacillus subtilis A26: Purification, biochemical and molecular characterization. Process Biochemistry. v. 44, p. 1252–1259, 2009.

AHNA, M. Y.; HAHN, B.; RYU, K. S.; KIM, J. W.; KIM, I.; KIM, Y. S. Purification and characterization of a serine protease with fibrinolytic activity from the dung beetles, Catharsius molossus. Thrombosis Research. v. 112, p. 339– 347, 2003

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline protease from *Spilosoma obliqua*: potential applications in bio formulations. Biotechnology and Applied Biochemistry, v.31, p 85–89, 2000.

BARROW, G.I; FELTHAM, R. K. A; "In COWAN AND STEEL`S, .In Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge: Ed 3rd Edition, 1999.

BATISTA, S. B. 2007. Diversidade e atividades microbianas do solo da Floresta amazônica-brasil, submetida a estresse hídrico utilizando técnicas de biologia molecular, *Tese* (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 131p.

BICKERSTAFF. C. F. New studies in Biology. Enzymes in Industry and Medicine. Edward Arnold Publisher, London,WCIB 3DQ, p. 71-72, 1987.

CAVALCANTI, M.T.H.; TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardiopsis* sp. Bioresour. Technol. v. 93, p. 29–35, 2004.

CHANG, C.T.; FAN, M. H.; KUO, F. C.; SUNG, H. Y; Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. J Agric Food Chem. v.48, n. 8, p. 3210–3216, 2000.

CHANG, S. C.; CHENG, J. C.; KOU, Y. H.; KAO, C. H.; CHIU, C. H.; WU, H. Y.; CHANG, M. F. Roles of the AX(4)GKS and arginine-rich motifs of hepatitis C virus RNA helicase in ATP- and viral RNA-binding activity. J. Virol. v. 74, p. 9732–9737, 2000.

CHOI, N.S.; KIM, S.H. Two fibrin zymography methods for analysis of plasminogen activators on gels. Analytical Biochemistry. v. 281, p. 236–238, 2000.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products ed. John Wiley & Sons, Ltd . 2002

DUTTA, J. R.; DUTTA, P. K.; BANERJEE, R. Modeling and optimization of protease production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. using a genetic algorithm. Process Biochemistry. v. 40, p. 879-884, 2005.

FALAHATPISHE, H.; JALALI, M.; BADAMI, N.; MARDANI, N.; KHOSRAVI-DARANI, K. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. Short Communication. Iranian Journal of Biotechnology, v. 5, n. 2, 2007.

FUJITA, M; NOMURA, K; HONG, K; ITO, Y; ASADA, A; NISHIMURO, S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochem Biophys Res Commun *197*. v. 3, p. 1340–1347, 1993.

GODFREY, T.: WEST. S. I. Introduction to industrial enzymology. *In*: Godfrey, T. (Ed.). Industrial Enzymology. 2 ed., Macmillan Press, London, p. 120-138, 1996.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial Alkaline Protease: Molecular approaches and industrial application. Appl. Microbial. Biotechnol. v.59, p.15-32, 2002.

HE, J.; CHEN, S.; GU, J. Identification and characterization of Harobin, a novel fibrino (geno) lytic serine protease from a sea snake (Lapemis hardwickii) FEBS Letters. v. 581, p. 2965–2973, 2007.

KIM, H. K.; KIM, G. T.; KIM, D. K.; CHOI, W. A.; PARK, S. H.; JEONG, Y. K.; KONG, I. S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. J Ferment Bioeng. v.84, n. 4, p. 307–312. 1997.

KIM, J.S.; KIM, J.E.; CHOI, B.S.; PARK, S.E.; SAPKOTA, K.; KIM, S.; LEE, H.H.; KIM, C,S.; PARK, Y.; KIM, M.K.; KIM, Y.S.; KIM, S.J. Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from Perenniporia fraxinea mycelia, Mycological Research, v. 112, n. 8, p. 990-998, 2008.

KIM, S. H; CHOI, N. S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. Biosci. Biotechnol Biochem. v. 64, p. 1722–1725, 2000.

KIM, W.;CHO,I K.; KIM, Y.; PARK, H.; CHOI, J.; LEE, Y.; OH, H.; KWON, I.; LEE, S. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl Environ Microbiol. v. 62, n. 7, p.1488–2482. 1996.

KO, J. H.; YAN, J. P.; ZHU, L.; QI, Y. P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from Bacillus subtilis QK02. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. v. 137, p. 65–74, 2004.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Research review paper microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. Biotechnology Advanced. v. 17, n. 4, p. 561-594, 1999.

LEE S.K.; BAE, D.H.; KWON, T.J.; LEE, S.B.; LEE, H.H.; PARK, J.H.; HEO, S.; JOHNSON, M.G. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Bacillus sp. KDO-13 isolated from soybean paste. J Microbiol Biotechnol. v. 11, n. 5, p.845–852, 2001.

LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis.* Journal Molecular Biology, v. 76, p. 103-122. 1973.

LIU J.G.; XING, J.M.; CHANG, T.;MA, Z.Y.; LIU, H.Z. Optimization of nutritional conditions for nattokinase production by Bacillus natto NLSSE using statistical experimental methods. Process. Biochem. v.40, p. 2757–2762, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzymes. In Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York. p. 243–292, 2000.

OMURA, K.; HITOSUGI, M.; ZHU, X.; IKEDA, M.; , MAEDA, H.; TOKUDOME, S. A Newly Derived Protein From Bacillus subtilis natto With Both Antithrombotic and Fibrinolytic Effects. J Pharmacol Sci. v. 99, p. 247 – 251, 2005.

PATEL, R. K.; DODIA, M. S.; JOSHI, R. H.; SINGH, S. P. Production of extracellular halo-alkaline protease from a newly isolared Haloalkaliphylic Bacillus sp. Isolated from seawater in Wastern India. World J. Microbiol Biotechnol. v.22, p.375-382, 2006.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Appl. Microbiol. and Biotechnol. v. 69, n. 2, p. 126-132, 2005.

PENG, Y.; ZHANG, Y. Z. Isolation and characterization of fibrinolytic producing strain DC-4 from Chinese douche and primary analysis of the enzyme property. Chin High Technol Lett. v. 12, p. 30–34, 2002.

PENG, Y; HUANG, Q; ZHANG, R; ZHANG, Y., Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional Chinese soybean food. Comparative Biochemistry and Physiology. v. 134, p 45-52, 2003.

PIERARD, E.; BOLLEN, A. Development of new thrombolytic agents using recombinant DNA technology. J Biotechnology. 1990.

SANTOS, J. G.; GOMES, D. S; BRITO, E. N; CRUZ FILHO, R. F; FERNANDES, O. C. C; TEIXEIRA, M. F. S. Caracterização da atividade proteolítica de *Bacillus* sp. da Amazônia.(2007), *Anais*: Sinaferm. Curitiba – PR In: *SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS. 2007, XVI SINAFERM*: Curitiba: UFPR. Trab. PEN0651.

SARAIVA, M.; PRAÇA, L.B.; FALCÃO, R.; MONNERAT, R. Isolamento de novas estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti*.*Embrapa*. Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Comunicado Técnico, 164) 2007.

SEO, J.; LEE, S. Production of Fibrinolytic Enzyme from Soybean Grits Fermented by Bacillus firmus NA-1. Journal of Medicinal Food.v.7, n. 4, p. 442–449, 2004.

SILVA NEVES, K. C., PORTO, A. L. F., TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. Acta Amazônica. v. 36, p. 299-306. 2006.

SIQUEIRA, A. B. S. (2007) Perfil enzimático de dermatófitos e avaliação da atividade antifúngica de própolis e lectinas. 179p. *Tese de Doutorado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco – Recife – PE.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: Palicourea longiflora (aubl.) rich e Strychnos cogens bentham. Acta Amazônica. v. 34, n. 2, p. 185 – 195, 2004.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation, Process Biochemistry. v. 39, p. 1893–1898, 2004.

WANG, C.T.; JI, B.P.; NOUT, R.; LI, P.L.; JI, H.; CHEN, L.F.,. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. J. Ind. Microbial. Biotechnol. v. 33, p.750–758. 2006.

WANG, S. H.; ZHANG,C.; YANG, Y. L.;DIAO, M.; BAI, M. F.Screening of a high fibrinolytic enzyme producing strain and characterization of the fibrinolytic enzyme produced from Bacillus subtilis LD-8547. World J Microbiol Biotechnol. DOI 10.1007/s11274-007-9496-2. 2007

WANG, S.; CHEN, H.; LIANG, T.; LIN, Y. A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. Process Biochemistry. v. 44, p. 70-76, 2009.

ZHANG, W. F. Medical disinfection. Military Medicine Science Press, Beijing, 2002.

ANEXO

NIT

UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

UFAM 100 anos

D E C L A R A Ç Ã O

DECLARAMOS para os devidos fins que o pesquisador/professor **Januário Gama dos Santos** da Universidade Federal do Amazonas, deu entrada de averiguação de pedido de patente, neste Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT, documento datado de 02/09/2011, encaminhando para apreciação, análise e futura elaboração de relatório descritivo, para cumprimento do Pedido de patente, a pesquisa tem como titulo inicial de: **"PRODUTO COM PROPRIEDADE FIBRINOLÍTICA".**

Manaus, 12 de setembro de 2011

Maria do P. Socorro de Lima Verde Coelho
Coord. Operacional NIT - UFAM

RELATÓRIO DESCRITIVO

PRODUTO COM PROPRIEDADE FIBRINOLÍTICA

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção relata o processo de produção e a atividade fibrinolítica de protease produzida por *Bacillus stearothermophilus*, isolado de solo da Região Amazônica e mantido na Coleção de Bactérias do Laboratório de Microbiologia sob o número B16, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Entre as fontes naturais de proteases, os microrganismos representam um recurso renovável atrativo por que podem ser cultivados por métodos fermentativos, inclusive em larga escala, em tempo relativamente curto. Além disso, enzimas microbianas têm longo prazo de validade e podem ser armazenadas em condições ideais por longoperíodo, sem perda significativa da atividade (GUPTA et al., 2002; UYAR; BAYSAL, 2004).

Leveduras, fungos filamentosos, actinomicetos e outras bactérias são fontes especiais de enzimas, incluindo as proteases que constituem um dos grupos comercialmente de alto valor, assim como, têm extensa aplicação em produtos e processos industriais, incluindo detergentes, alimentos, farmacêuticos, couro, seda e recuperação de prata dos filmes fotográficos e raio-X (ABIDI et al., 2008; SILVA NEVES et al., 2006; NELSON; COX, 2003).

Outras aplicações de enzimas proteolíticasincluema formulação de biofármacos, como aditivo em produto para limpeza de lente de contato e solução esfoliante (ANWAR; SALEEMUDDIN, 2000). Todavia, para uso terapêutico, pancreatina, asparaginase,

colagenases, glutaminase e hialuronidase são as que têm aplicações biomédicas (CHANG et al., 2000). Além destas, tem destaque as proteases fibrinolíticas, como estreptoquinase, estafiloquinase e uroquinase que são comercialmente disponíveis para o tratamento de patologias trombolíticas.

Enzimas fibrinolíticas têm atividade proteolítica direta no coágulo sanguíneo (fibrina) ou indireta, como ativador do plasminogênio. Quando os coágulos de fibrina não são lisados, eles se acumulam nos vasos sanguíneos e causam trombose, levando a doenças cardiovasculares. Estas doenças, incluindo infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica do coração, doença cardíaca valvular, doença vascular periférica, arritmias, pressão arterial alta e derrame, são as principais causas de morte em todo o mundo (KIM et al, 2011).

O uso de enzimas fibrinolíticas no tratamento de doenças iniciou-se com o conhecimento de que a lise da fibrina pode ser efetuada "*in vivo"* através de um processo que envolve a conversão de plasminogênio à plasmina e, de que ativadores do plasminogênio podem produzir fibrinólise controlada. A partir dessas comprovações, os estudos para descoberta de novos produtos trombolíticos tem tido importância na área de saúde, essencialmente para tratamento de doenças cardiovasculares (PENG et al., 2005).

Atualmente na terapia fibrinolítica tem sido empregado principalmente os ativadores de plasminogênio, como estreptoquinase, uroquinase, embora sua baixa especificidade e seu alto culto. Outro agente comumente utilizado é o ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) que tem maior eficácia e tem maior afinidade pela fibrina (AGREBI et al, 2009).

De acordo com citações de Gupta et al. (2002), as enzimas fibrinolíticas são também recomendadas no combate ao envelhecimento, removendo as proteínas danificadas pelos radicais livres que facilitam o desenvolvimento de doenças, como

câncer, diabetes e outras doenças degenerativas. Além disso, tem aplicação como cicatrizantes, na forma de pomadas e cosméticos (PENG et al., 2005).

Apesar da longa lista de microorganismos produtores de protease, apenas determinadas espécies são consideradas adequadas para a exploração comercial, classificados como seguros (*Generally recognized as safe* - GRAS), não-tóxicos e não-patogênicos (GUPTA et al., 2002; NELSON; COX, 2003).

Entre as bactérias, os *Bacillus* constituem um dos principais grupos proteolíticos microbianos que predominam nos diversos ecossistemas, como *B. licheniformis, B. subtilis, B. amyloliquifaciens, B. mojavensis, Pseudomonas* sp. E *Streptomyces* (DUTTA; et al., 2005; GUPTA; et al., 2002; NELSON; COX, 2003; WANG et al., 2006).

Apesar da existência de outros agentes antitrombolíticos de uso corrente, as enzimas fibrinolíticas de origem microbiana, influenciadas pelo seu baixo custo e, por não apresentar efeitos colaterais, estimula novas pesquisas que devem ser incentivadas com objetivo de isolar outras fontes de enzimas fibrinolíticas (WANG et al., 2006).

Nesse contexto, os microrganismos são importantes fontes de recursos para agentes antitrombolíticos. As estreptoquinase de *Streptococcus hemolíticos* e estafiloquinase de *Staphylococcus aureus* foram os primeiros agentes eficazes na terapêutica antitrombolitica (PENG; ZHANG, 2002). Ao longo dos anos, outras enzimas fibrinolíticas provenientes de diferentes microrganismos foram descobertas a partir de *Bacillus*(KIM; CHOI, 2000; PENG; ZHANG, 2002).

Peng et al. (2005) descrevem *B. subtilis* BK-17, *B. subtilis* A1, *B. subtilis* 168, *Actinomyces thermovulgaris*, *Streptomyces megasporus* SD5, *Streptomyces spheroids* M8-2 e *Streptomyces sp*. Y405, como bactérias produtoras das enzimas fibrinolíticas, cujas propriedades fisiológicas e químicas foram caracterizadas e sua eficácia comprovada como agente para tratamento na terapia antitrombolitica.

Nas últimas décadas, na comunidade asiática, enzimas fibrinolíticas de origem microbiana são constituintes de alimentos fermentados a base de soja, peixe ou de molhos (Tabela 1), produtos que são consumidos com objetivo de prevenir as tromboses e outros acidentes cardiovasculares (PENG et al., 2005).

Tabela 1. *Bacillus* fibrinolíticos associados a alimentos fermentados comercializados em países Asiáticos.

Microorganism	Alimento	Nome da Enzima
Bacillussubtilisnatto	Natto (Japan)	Natoquinase, NK
*Bacillusamyloliquefaciens*DC-4	Douchi (China)	Subtilisin DFE
Bacillus sp. CK	Chungkook-jang (Korea)	CK
Bacillus sp. DJ-4	Doen-jang (Korea)	Subtilisin DJ-4
Bacillus sp. DJ-2	Doen-jang (Korea)	bpDJ-2
Bacillus sp. KA38	Jeot-gal (Korea)	Jeot-gal enzyme
B. subtilis QK02	Fermentedo de soja	QK-1 and QK-2
Bacillus firmus NA-1	Natto	Natoquinase
B. subtilis IMR-NK1	Natto	Natoquinase
Bacillus sp KDO-13	Molho de soja (Korea)	Natoquinase

Fonte: Peng et al., 2005

A nattoquinase, protease fibrinolítica sintetizada a partir do *Bacillusnatto* já está disponível comercialmente em vários alimentos fermentados, como aditivo alimentar, e esses alimentos são consumidos para prevenir trombose (PENG; ZHANG, 2002).

De acordo com os seus mecanismos catalíticos as enzimas com propriedades fibrinolitica são classificadas em serina protease (NK, subtilisina PFED, e CK) e metaloproteases (Jeot-Gal enzima, AMMP, e Baciloquinase II). As enzimas fibrinolíticas do tipo serina proteases geralmente são ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima nos valores de pH entre 8,0 e 10; peso molecular com intervalo entre 27,7 e 44 kDa, A temperatura ótima tem uma vasta gama, entre 30 e 70 °C (KIM et al., 1996; KIM; CHOI, 2000), principalmente de cerca de 50°C. Quase todas as proteases serina fibrinolítica pertencem à subtilisina de *Bacillus* sp. Enquanto as enzimas fibrinolíticas do grupo metaloproteases expressam sua atividade na presença de íons metálicos bivalentes tais

como Co^{+2} e Hg^{+2} para enzimas de *Bacillus* sp. e pH ótimo de atividade entre os valores 6,0 e 7,0 (PENG et al., 2005).

DETALHES DA INVENÇÃO

Microrganismo

Bacillus stearothermophilus B16, uma espécie isolado do solo contaminado com petróleo, na Região Amazônica foi o microrganismo investigado como fonte de protease fibrinolítica.

Produção de proteases fibrinolítica por fermentação submersa

A produção de protease fibrinolítica foi realizada por fermentação em meio líquido [Fermentação Submersa (FS)], utilizando como inóculo cultura preparada em caldo nutritivo,em tubo de ensaio, a 37°C por 24 horas.Destes culturas foi retirado 1000 µL para inoculação em frasco Erlenmeyer contendo 40 mL de meio de cultura líquido (Solução de Manachini) adicionado de substrato indutor [gelatinas (1%pv)], pH 7,0 (SILVA NEVES et al., 2006). A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 120 rpm, a 37°C por 24 horas. O extrato bruto foi separado da biomassa por filtração sob vácuo para determinação da atividade proteolítica.

Determinação da atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica utilizou-se 150 µL do extrato bruto e como substrato 250 µL azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl0,2 M, pH 7,0. A reação foi mantida em câmara escura e após 60 minutos, adicionou-se 1,2 mL de Ácido Tricloroacético 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4°C por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 1,2 mL para ser adicionado a 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de

enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 1 em 60 minutos e expressa em U/mL (LEIGTON, 1973).

Determinações da atividade fibrinolítica *in vitro*

O ensaio enzimático para determinação da atividade fibrinolítica foi realizado em placas de Petri de 5,5 cm diâmetro contendo 2mL de solução de fibrinogênio humano (50 mg/mL em solução tampão Tris HCl20 mM pH 8,0) homogeneizado com 40 mL de ágar a 75% (p/v) em solução tampão Tris HCl20 mM pH 8,0 adicionado de 0,15 M de Cloreto de sódio a 50ºC (KO et. al., 2004). Posteriormente 8 ml desta solução foi adicionada a placa de Petri contendo 40 µL de solução de trombina (100NIH/ml, Sigma) dissolvida em solução tampão Tris HCl20 mM pH 8,0]. Para formação do coágulo, as placas foram incubadas por 30 minutos a 25 ^{o}C para formação de coágulos de fibrina. Em seguida foram feitos *cup-plate*com 3 mm de diâmetros na superfície do meio sólido, em placa de Petri . Em cada *cup-plate* foi adiciona10 µL de extrato bruto, seguindo-se a incubação das placas a 37 ºC durante 15 horas. Como padrão foi utilizado heparina e streptoquinase.

Caracterização parcial das proteases de *Bacillus stearothermophilus*

Efeito do pH na atividade e estabilidade

Para a determinação do efeito do pH sobre a atividade da protease na faixa de pH4,0 a 12,0 foi selecionado o isolado B16. Para o preparo do substrato [azocaseina 1% (p/v)] foi utilizado solução tampão citrato 0,2 M(pH de 4,0 a 6,0); solução tampão fosfato 0,2M (pH de 7,0 a 8,0) e solução tampão Tris HCl0,2 M (7.2 a 9,0). A estabilidade ao pH foi avaliada durante 90 minutos, medindo a atividade enzimática relativa a cada 15 minutos para cada faixa de pH (4,0-12.0), a 45 ^{o}C (CAVALCANTI et al., 2004).

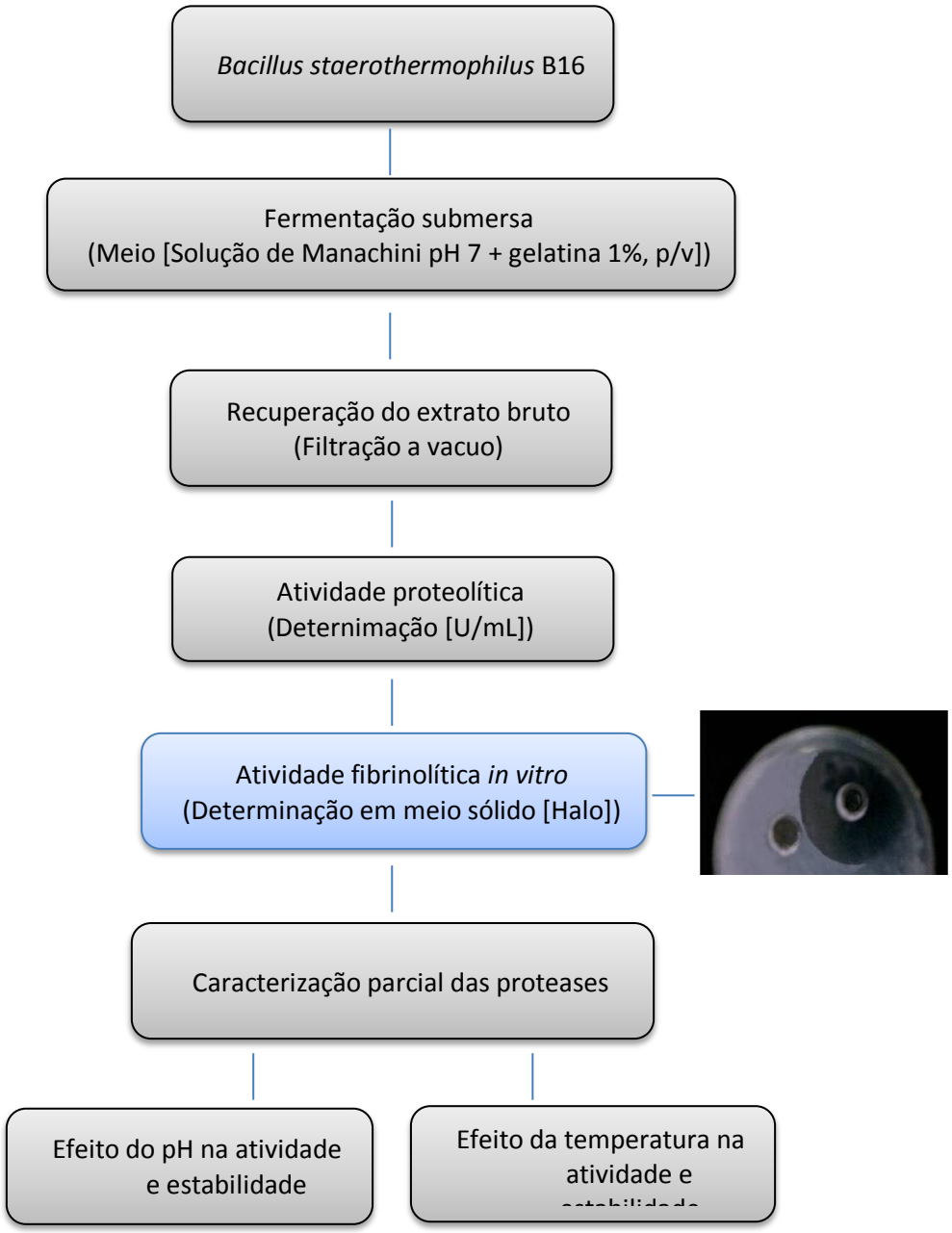
Efeito da temperatura naatividade e estabilidade

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram realizados em triplicata, utilizando-se azocaseina 1% (p/v) em tampão Tris HCl0,2 M, pH 8,4, nas temperaturas de 25^{o}C a 80^{o}C por 90 minutos. A estabilidade das enzimas foi determinadadurante 90 minutos medindo-se a atividade relativa a cada 15 minutos na faixa de 25 ºC - 80 ºC (CAVALCANTI et al., 2004).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e o Teste de Tuckey com nível de significância 5%, utilizando-se o *software* Minitab versão 16,0.

Fluxograma do processo de produção e determinação da atividade da protease fibrinolítica



Atividade proteolítica por fermentação submersa

Nas condições de fermentação, as análise revelaram que atividade proteolítica de *Bacillus stearothermophilus* B16 foi igual a 5,766 U/mL. Estas enzimas se mostraram estáveis em pH ácido e alcalino, com atividade na faixa de 20% a 43%, em pH 4,0 a 7,8. Nos demais, pH8,0 a 9,0 verificou-se que a atividade foi superior a 60%, conduto, a maior estabilidade foi demonstrada em pH 8,6 e 9,0 durante 90 minutos (Figura 01).

Embora as proteases tenham sido ativas em uma ampla faixa de pH, a máxima atividade foi determinada em pH 8,4 (Figura 02). Em outros estudos realizados com proteases microbianas, os autores reportaram que a atividade proteolítica máxima foi determinada em diversos valores de pH, *Bacillus* sp. [pH 8,0 (NASCIMENTO; MARTINS, 2004)]; *Bacillus stearothermophilus* TLS33 [pH 8,5, 7,5 e 7,0 das proteases S, N e B, respectivamente (SOOKKHEO et al., 2000)], assim como Haddar et al. (2009) determinou dois pH ótimo (8,0 e 10,0) da proteases BMI de *Bacillus mojavensis* A21.

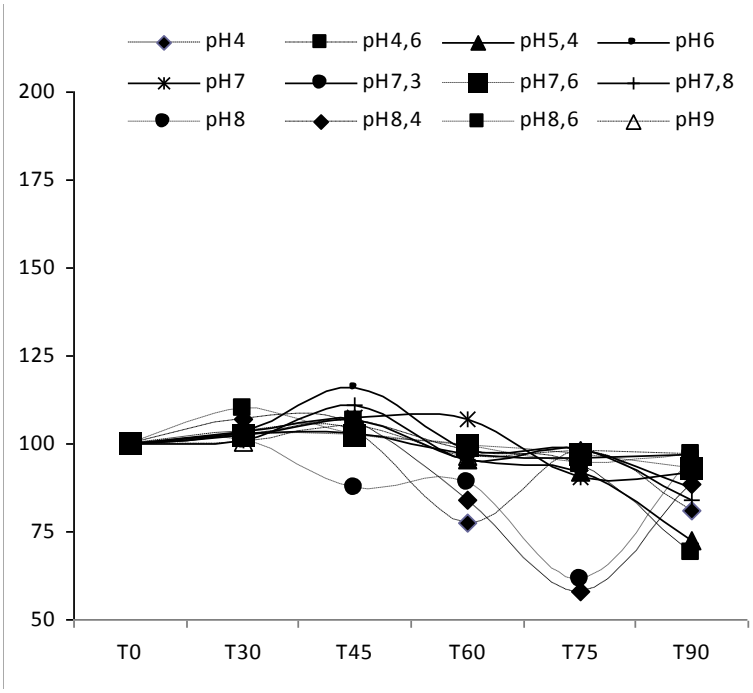


Figura 1. Efeito do pH na atividade e estabilidade de proteases secretadas por *Bacillus*sp.isolado de solo petrolífero da Amazônia.

Os resultados desta pesquisa referentes ao pH ótimo das proteases de *Bacillus stearothermophilus* B16 corroboram com os dados descritos na literatura, assim pode-se inferir que por tratar-se de uma alcalina protease, tem potencial aplicação na indústria farmacêutica, de detergentes e para recuperação de prata do filme de raio X. (GENÇKAL, 2004).

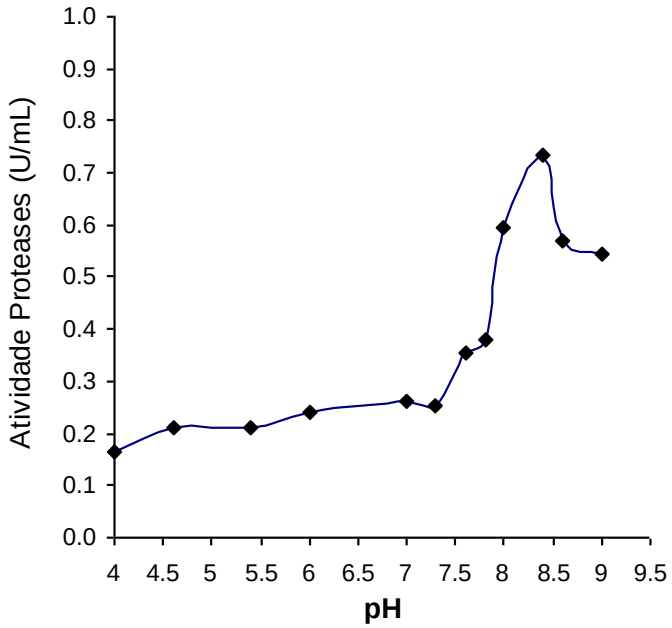


Figura 2: Efeito do pH na atividade da protease de *Bacillus stearothermophilus*

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease de *Bacillus stearothermophilus* B16

Efeito da temperatura na atividade proteolítica e estabilidade

A figura 3 mostra que a protease expressou atividade em todas as temperaturas testadas (25 ^{o}C a 80 ^{o}C), determinando-se os maiores valores de atividade proteolítica entre 40 ^{o}C a 50 ^{o}C,exibindo ótima atividade a 45 ^{o}C . Enquanto as menores atividades foram detectadas a partir de 55 ^{o}C até a máxima temperatura testada (80 ^{o}C). Os resultados da figura 4 demonstram também que as protease apresentaram estabilidade

de 75% e 73% durante 30 minutos de incubação nas temperaturas 45 °C e 50°C, respectivamente.

Esses resultados divergem dos valores de temperatura ótima (60 °C e 65 °C) encontrados para o gênero *Bacillus* descrito por diversos autores (AKEL et al, 2009; HADDAR et al, 2009; NASCIMENTO; MARTINS, 2004).

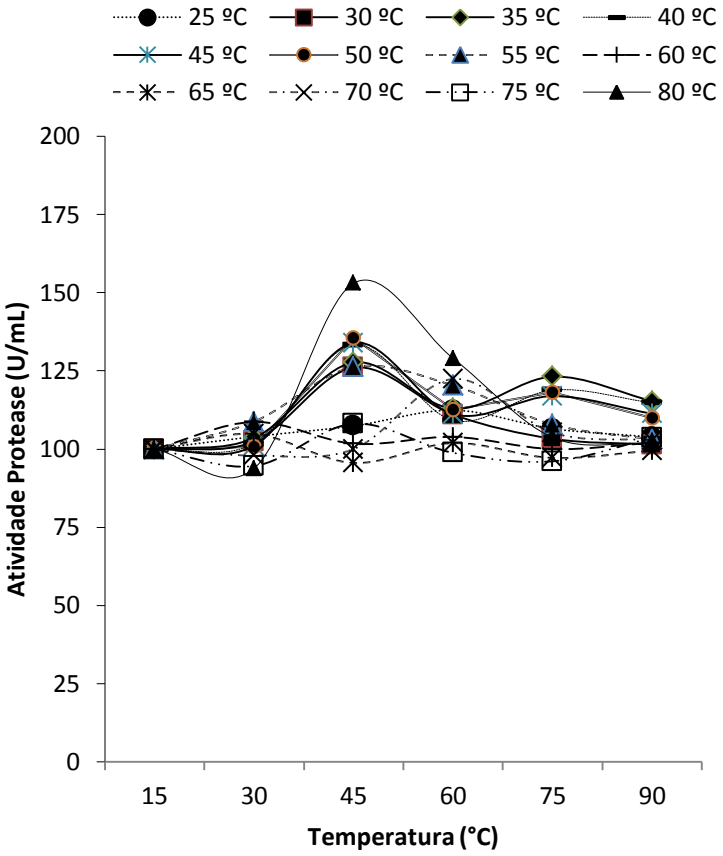


Figura 3. Efeito da temperatura na estabilidade de proteases secretadas por *Bacillusstearothermophilus*B16

Atividade fibrinolítica *in vitro* (Método da Placa de Fibrina)

A atividade fibrinolítica determina em meio sólido, nas condições experimentais está apresentada na figura. 4 *Bacillus stearothermophilus* B16 expressou a atividade fibrinolítica, determinando-se halo de 34 mm. Estes dados confirmam a potencialidade de

bactérias do gênero *Bacillus* na produção de proteases fibrinolíticas, biopcomposto que tem emprego na indústria de medicamentos para aplicação medicinal no tratamento de patologias trombolíticas. Estes resultados são pioneiros e descrevem uma bactéria originária de substrato orgânico da Amazônia.

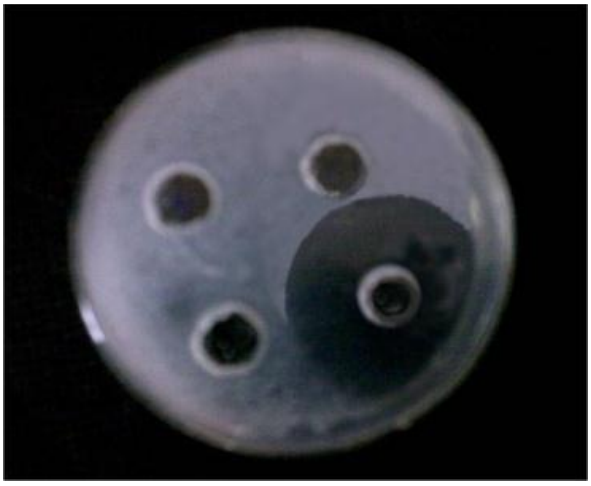


Figura 4. Foto ilustrativa do halo produzido pela atividade fibrinolítica de *Bacillus stearothermophilus*B16 pelo método da placa de fibrina.

B. stearothermophilus B16, cresce *in vitro* e produz protease fibrinolítica que degrada o coágulo de fibrina. As enzimas dessa espécie apresentam as seguintes características, pH e temperatura ótimo de atividade 8,4 e 45 ^{o}C, respectivamente. Com base nesses dados, este invento revela a descoberta de uma bactéria do ecossistema Amazônico como fonte de biomoléculas com atividade medicinal para aplicação no desenvolvimento fármaco pelo setor bioindustrial.

Referencias Bibliográficas

ABIDI, F.; LIMAMB, F.; NEJIB, M.M.Production of alkaline proteases by Botrytis cinerea using economic raw materials: Assay as biodetergent. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1202–1208, 2008.

AGREBI, R.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; JELLOULI, K.; MANNI, L.; NASRI, M. BSF1 fibrinolytic enzyme from a marine bacterium Bacillus subtilis A26: Purification, biochemical and molecular characterization. Process Biochemistry, v. 44, n. 11, p. 1252-1259, November, 2009.

AKEL, H.; AL-QUADAN, F.; YOUSEF, T. K. Characterization of a Purified Thermostable Protease from Hyperthermophilic Bacillus Strain HUTBS71. *European Journal of Scientific ResearchI*. v. 31, n. 2, p.280-288, 2009.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline protease from Spilosoma oblique: potential applications in bio- formulations. Biotechnol. Appl. Bioc., v.31, p.85-89, 2000.

CAVALCANTI, M.T.H.; TEIXEIRA, M.F.S.; LIMA FILHO, J.L.; PORTO, A.L.F. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by Nocardiopsis sp. *Bioresour. Technol*. v. 93, p. 29–35. 2004.

CHANG CT, FAN MH, KUO FC, SUNG HY Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agric Food Chem*., v, 48, n. 8, p.3210–3216, 2000.

DUTTA, J. R.; DUTTA, P. K.; BANERJEE, R. Modeling and optimization of protease production by a newly isolated Pseudomonas sp. using a genetic algorithm. *Process Biochemistry,*v. 40, p. 879-884, 2005.

GENÇKAL Hande. (2004). Studies on Alkaline Protease Production from Bacillus sp. İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey.

GUPTA, R. et al. Bacterial Alkaline Protease: Molecular approaches and industrial application. *Appl. Microbial. Biotechnol*. v.59. 15-32 p. 2002.

HADDAR A, BOUGATEF A, AGREBI R, SELLAMI-KAMOUN A, NASRI M. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated Bacillus mojavensis A21. Purification and characterization. *Process Biochem*. V. 44, p. 29-35. 2009.

KIM W, CHOI K, KIM Y, PARK H, CHOI J, LEE Y, OH H, KWON I, LEE S (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl Environ Microbiol 62(7):1488–2482.

KIM, H. C.; CHOI, B.; SAPKOTA, K.; KIM, S.; LEE, H. J.; YOO, J. C.; KIMA, S. Purification and characterization of a novel, highly potent fibrinolytic enzyme from Paecilomyces tenuipes. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1545–1553, 2011.

KIM, S. H; CHOI, N. S. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp strain DJ-4 screened from Doen-Jang. Biosci Biotechnol Biochem. V. 64, p.1722–1725, 2000.

KO, J.H; YAN, J.P.; ZHU, L.; QI, Y.P. Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, v. 137, p. 65-74, 2004.

LEIGTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J. E KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis.* Journal Molecular Biology, v. 76, p. 103-122. 1973.

NASCIMENTO WCA, MARTINS MLL. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic Bacillus sp. *Braz. J. Microbiol*., v. 35, p. 1-2, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M.; LEHNINGER, A. G. Princípios de Bioquímica. 3ª ed. São Paulo, Sarvier, 839 p. 2003.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Y.Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. Appl Microbiol Biotechnol., v. 69, p.126-132, October, 2005.

PENG, Y; ZHANG, Y. Z. Optimization of fermentation conditions of douche fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4. Chin Food Ferment Ind 28:19–23, 2002.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F.; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. Acta Amazônica, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

SOOKKHEO, B.; SINCHAIKUL, S.; PHUTRAKUL, S. CHEN, S.T. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from Bacillus stearothermophilus TLS 33. *Protl. Exp. Pur*: v. 20, p.142-151. 2000.

UYAR, F.; BAYSAL, Z. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated Bacillus sp under solid state fermentation. Process Biochemistry, Oxford, v. 39, n. 12, p1893-1898, Oct. 2004.

WANG, S.L., KAO,D.Y.,WANG, C.L., YEN, Y.H., CHERN,M.K., CHEN, Y.H. Asolvent stablemetalloprotease produced by Bacillus sp TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for beta-chitin preparation. *Enzyme and Microbial Technology*. v.39, p. 724–731. 2006.