



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
CURSO: MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

ROMÁRIO DA SILVA SANTANA

**PRODUÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS COM AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE COGUMELOS
COMESTÍVEIS**

Manaus – AM
2022

ROMÁRIO DA SILVA SANTANA

**PRODUÇÃO, PRÉ-PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE
ENZIMAS PROTEOLÍTICAS COM AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE COGUMELOS
COMESTÍVEIS**

Dissertação elaborado no curso de mestrado em Biotecnologia e apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM), como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologias para a saúde.

Linha de pesquisa: Controle de doenças de impacto social na Amazônia.

Orientadora: Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Co-Orientadora: Dra. Waldireny Rocha Gomes

Manaus – AM
2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

S232p Santana, Romário da Silva
Produção, pré-purificação e caracterização bioquímica de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de cogumelos comestíveis / Romário da Silva Santana . 2022
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Rosany Piccolotto Carvalho
Coorientadora: Waldireny Rocha Gomes
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cogumelos. 2. Fermentação submersa. 3. Enzimas. 4. Fibrinolítica. 5. Trombose. I. Carvalho, Rosany Piccolotto. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

Produção, pré-purificação e caracterização bioquímica de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de cogumelos comestíveis

Dissertação elaborado no curso: Mestrado em Biotecnologia e apresentado ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM), como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 15 de dezembro de 2022.

BANCA AVALIADORA

Romário da Silva Santana
Discente

Prof.^a. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
1º Avaliador (a)

Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Orientadora

Prof.^a. Dra. Enedina Nogueira de Assunção
2º Avaliador (a)

Dra. Waldireny Rocha Gomes
Co-Orientadora

Prof.^a. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira
3º Avaliador (a)

Prof.^a. Dra. Rosany Piccolotto Carvalho
Coordenadora
(Portaria Nº 1303/GR)
Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em
Biotecnologia

Manaus – AM
2022

A mim, pela **DETERMINAÇÃO** e **FOCO**. As **CONQUISTAS** adquiridas durante minha jornada como representação discente, fazendo valer e cumprir as minhas funções nas longas reuniões de colegiado.

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTO

Primeiramente a **DEUS**, pelos cuidados e proteção a mim concedida. Pela força, pela fé e pelas bênçãos conquistadas durante a árdua trajetória que tive no mestrado.

Ao grande apoio que obtive da minha **FAMÍLIA**, pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis e ensinamentos para enfrentar e superar as barreiras vivenciadas.

A todas as pessoas; amigos e colegas de pesquisa, que de alguma maneira contribuíram com as ideias, palavras de ânimo e encorajamento nesse processo da Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC-UFAM), pelas experiências adquiridas no campo da pesquisa científica.

As minhas orientadoras: Dra. **ROSANY PICCOLOTTO CARVALHO** e Dra. **WALDIRENY ROCHA GOMES**, por toda parceria durante o mestrado.

Agradeço, as secretárias **JACQUELINE**, **NUBIANE** e **ELZIMAR** por toda orientação e apoio realizado.

Agradeço, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por fomentar minha pesquisa.

Agradeço, aos professores, técnicos e demais colaboradores do PPGBIOTEC.

A todos (as), minha eterna **GRATIDÃO**.

“Ei, dor! Eu não te escuto mais, você não me leva a nada. Ei, medo! Eu não te escuto mais, você não me leva a nada. E se quiser saber para onde eu vou, para onde tenha sol, é para lá que eu vou.”

Trecho da música: O Sol – Banda: Jota Quest.

RESUMO

SANTANA, Romário da Silva, M.Sc., Universidade Federal do Amazonas, dezembro de 2022. **Produção, pré-purificação e caracterização bioquímica de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de cogumelos comestíveis.** Orientadora: Rosany Piccolotto Carvalho. Co-Orientadora: Waldireny Rocha Gomes.

Os fármacos empregados atualmente advêm de diversas fontes de produtos naturais, onde majoritariamente, são extraídas de animais, plantas, bactérias e fungos. E uma das formas de se extrair valor econômico, é com a utilização da biotecnologia por estratégias de bioprospecção desses recursos. Pois, sabe-se que a busca por enzimas fibrinolíticas com aplicações terapêuticas para o tratamento da trombose tem sido uma das grandes demandas da indústria farmacêutica nos últimos tempos. E entre os inúmeros organismos, os cogumelos se destacam pela facilidade de cultivo e alta eficiência na produção de enzimas proteolíticas extracelulares. Nesse sentido, esta pesquisa teve como objetivo, realizar a produção, pré-purificação e caracterização bioquímica, de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de cogumelos comestíveis. Como resultado desta dissertação, todos objetivos específicos foram atendidos e estão apresentados em três capítulos, em formato de artigos: o capítulo I, está caracterizado por estudo do tipo revisão sistemática onde concentra uma análise de um levantamento realizado nos últimos dez anos; o capítulo II, caracteriza-se como uma pesquisa *in vitro* onde a espécie *Pleurotus eryngii*, cogumelo comestível, foi cultivado em dois meios por fermentação submersa a fim de se obter extrato enzimático; e o capítulo III, também se caracteriza como uma pesquisa *in vitro* onde o extrato enzimático do cogumelo *P. eryngii* foi pré-purificado em sistemas de duas fases aquosas. Com base nestes dados, conclui-se que este estudo *in vitro*, demonstrou que a enzima do cogumelo comestível *Pleurotus eryngii*, tem potencial para o uso na aplicação farmacológica como agentes trombolíticos.

Palavras-chave: Cogumelos; Fermentação submersa; Enzimas; Fibrinolítica; Trombose.

ABSTRACT

SANTANA, Romário da Silva, M.Sc., Universidade Federal do Amazonas, dezembro de 2022. **Production, pre-purification and biochemical characterization of proteolytic enzymes with fibrinolytic action from edible mushrooms.** Adviser: Rosany Piccolotto Carvalho. Co-advisers: Waldireny Rocha Gomes.

The drugs currently used come from various sources of natural products that are mostly extracted from animals, plants, bacteria and fungi. One of the ways to extract economic value is with the use of biotechnology by bioprospecting strategies for these resources. Well, it is known that the search for fibrinolytic enzymes with therapeutic applications to treat thrombosis has been one of the greatest demands of the pharmaceutical industry in recent times. Among the numerous organisms, mushrooms stand out for their ease of cultivation and high efficiency in the production of extracellular proteolytic enzymes. In this sense, this research aimed to carry out the production, pre-purification and biochemical characterization of proteolytic enzymes with fibrinolytic action of edible mushrooms. As a result of this dissertation, all specific objectives were met and are presented in three chapters, in the form of articles: Chapter I is characterized by a systematic review study, which concentrates an analysis of a survey carried out in the last ten years; Chapter II is characterized as an in vitro research where the *Pleurotus eryngii* species, an edible mushroom, was cultivated in two media by submerged fermentation in order to obtain an enzymatic extract; and chapter III, which is also characterized as an in vitro research where the enzymatic extract of the *P. eryngii* mushroom was pre-purified in two-phase aqueous systems. Based on these data, it is concluded that this in vitro study demonstrated that the enzyme of the edible mushroom *Pleurotus eryngii* has potential for use in pharmacological application as thrombolytic agents.

Key words: Mushrooms; Submerged fermentation; Enzymes; Fibrinolytic; Thrombosis.

LISTA DE SIGLAS

DCV – Doenças Cardiovasculares;

AVC – Acidente Vascular Cerebral;

TEV – Tromboembolismo Venoso;

TVP – Tromboembolismo Venoso Profundo;

TVS – Tromboembolismo Venoso Superficial;

TEP – Embolia Pulmonar;

SBTH – Sociedade Brasileira de Trombose e Hemostasia;

FES – Enzimas Fibrinolíticas;

DPUA – Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas;

YM – Extrato de Malte / Yast Malt;

SB+YE – Sabouraud + extrato de levedura;

BDA – Ágar Batata Dextrose;

SAB – Sistemas de duas Fases Aquosas;

PEG – Polietilenoglicol;

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida;

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01:** Characterization of the main characteristics of the eight selected papers: a descriptive analysis (Capítulo I).....**30**
- Tabela 02:** List of mushroom species and biochemical characterization of enzymes synthesized under different growing conditions (Capítulo I)**36**
- Tabela 1:** Efeito dos Íons metálicos e inibidores na atividade das proteases de *P. eryngii* DPUA 1816 (Capítulo II)..**48**
- Tabela 1:** Avaliação do percentual de atividade antioxidante do radical em ABTS e DPPH dos extratos dos cogumelos comestíveis (Capítulo III)..**56**
- Tabela 2:** Resultados do planejamento fatorial de 12 sistemas por fermentação extrativa, utilizando sistema bifásico aquoso (PEG/SAL) para extração e particionamento de protease fibrinolítica produzida por *Pleurotus eryngii* DPUA 1816 (Capítulo II).....**58**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01:** Imagem ilustrando um Cladograma mostrando as relações filogenéticas dos Reinos (1) entre os filos (2) evidenciando que ainda existem incertezas (linha pontilhada) e os dois filos mais numerosos quanto a espécies descritas (3)... 16
- Figura 02:** Imagem ilustrando aspectos de estruturas esporulantes e ciclo de vida dos ascomicetos..... 17
- Figura 3:** Estruturas somáticas ilustradas do fungo *Hexagonia tenuis* com ilustrações do Basidioma (A), himênio (B), Hifas generativas com a presença de fíbula destacada em vermelho (C), esquelética (D) e ligadora (E)..... 17
- Figura 04:** Imagem ilustrando aspectos de estruturas esporulantes conforme suas origens e ciclo de vida dos basidiomicetos..... 18
- Figura 05:** imagem ilustrando alguns cogumelos do gênero *Pleurotus*: *P. ostreatus* (A); *P. eryngii* (B); *P. citrinopileatus* (C); *P. ostreatusroseus* (D); *P. pulmonarius* (E); e *P. albidus* (F)..... 20
- Figura 01:** Flow diagram of literature search and selection criteria (Capítulo I)..... 28
- Figura 02:** Graph illustrating numbers of papers selected from the databases, according to the criteria (Capítulo I) 29
- Figura 03:** Representation with schematic edits adapted to better understand the fibrinogen molecule (A), the interaction of soluble (B) and insoluble fibrin polymers (C). Scheme C illustrates the three-dimensional structure of the fibrinogen molecule with its D domains, at the ends, and E domain in the center interacting with the A α and B β chains with FpA and FpB in the central node and the beginning of the α C regions. (Capítulo I)..... 33
- Figura 04:** Schematic representation of enzyme classes and the catalytic mechanism. A) Soluble serine proteases (EC 3.4.21; A in the image)), the mechanism of cysteine proteases (EC3.4.22; B in the image), the aspartyl proteases (EC 3.4.23; C in the image) Metalloproteases (EC 3.4.24; D in the image). B) Schematic representation of the catalytic mechanism of serine proteases. <http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/> (Capítulo I) 33
- Figura 05:** Illustration of the methods for determining fibrinolytic activity via the fibrin plate method (A) and artificial thrombi formation (B) (Capítulo I)..... 35
- Figura 01:** Influência dos meios de cultivo na atividade proteolítica de *P. eryngii* DPUA 1816 (Capítulo II)..... 46
- Figura 02:** Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *P. eryngii* DPUA 1816 (Capítulo II) 46

| | |
|---|-----------|
| Figura 03: Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de <i>P. eryngii</i> DPUA (Capítulo II)..... | 46 |
| Figura 01: Gráfico representando a avaliação da citotoxicidade dos extratos em percentual, de <i>P. eryngii</i> (WRV04SBYE 80,7±0,2), <i>P. eryngii</i> (WRV04YMA 82,3±0,2), <i>P. ostreatus</i> (WRV01SBYE 84,1±4,8) e <i>P. ostreatus</i> (WRV01YMA 88,8±0,1) (Capítulo III)..... | 57 |
| Figura 02: Efeito simultâneo do fator de purificação, na concentração e massa molar do PEG, do planejamento fatorial, da protease fibrinolítica de <i>P. eryngii</i> DPUA 1816 por sistema bifásico aquoso (Capítulo III) | 59 |
| Figura 03: Gráfico de Pareto mostrando o efeito das variáveis sobre o coeficiente de partição (K) por sistema bifásico aquoso (Capítulo III)..... | 59 |
| Figura 04: Gráfico de Pareto ilustrando os efeitos das variáveis independentes por sistema bifásico aquoso. A) recuperação da enzima (Y_{SAL}); B) fator de purificação da enzima (FP_{SAL}) (Capítulo III)..... | 60 |
| Figura 05: Representação da eletroforese SDS-PAGE a 12% e zimograma do extrato bruto e do sistema pre-purificado. (A): 1-Marcador de massa molecular; 2-extrato bruto obtido por fermentação submersa em meio YM; (B): 3-Zimograma do extrato bruto; 4-Fase inferior do sistema 1; 5-Fase superior PEG 4000 do sistema 1 (Capítulo III)... | 60 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| ABSTRACT | 08 |
| LISTA DE SIGLAS | 09 |
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES | 11 |
| SUMÁRIO..... | 13 |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Geral..... | 15 |
| 2.2 Específicos | 15 |
| | |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 16 |
| 3.1 Fungos | 16 |
| 3.1.1 Cogumelos e seus benefícios | 19 |
| 3.1.2 Gênero <i>Pleurotus</i> | 20 |
| 3.2 Trombose | 22 |
| 3.2.1 Tratamentos | 23 |
| 3.2.2 Enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica..... | 24 |
| | |
| 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS..... | 26 |
| | |
| CAPÍTULO I: Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years | 27 |
| | |
| CAPÍTULO II: Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa | 46 |
| | |
| CAPÍTULO III: Atividade antioxidante, citotóxica e pré-purificação de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de extratos obtidos por fermentação submersa de cogumelos comestíveis | 53 |
| | |
| 5 CONCLUSÃO..... | 67 |
| | |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

1. INTRODUÇÃO

Os fármacos empregados atualmente advêm de fontes direta ou indiretamente de produtos naturais, onde majoritariamente, são extraídas de plantas, bactérias e fungos. Frente esta biodiversidade, o Brasil tem destaque, podendo se tornar um modelo de desenvolvimento econômico, com intenção de incentivar seu crescimento a partir da utilização sustentável de nossos recursos naturais (AGUILAR, 2019).

E uma das formas de se extrair valor econômico presente nessa biodiversidade, é com a utilização da biotecnologia por estratégias de bioprospecção desses recursos. Pois, para Amaral et al. (2020), a biotecnologia configura-se como uma atividade que beneficia o conhecimento, visando a adesão de vias tecnológicas relacionadas a seres vivos ou proveniente deles para dar origem a produtos e/ou processos com o intuito de solucionar possíveis problemas.

A bioprospecção, compreende-se como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral (coletivamente chamados de recursos genéticos) que possam, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto (JUNIOR, 2012).

Entre os inúmeros organismos, os fungos se destacam pela facilidade de cultivo e alta eficiência na produção de enzimas extracelulares (GUIMARÃES et al., 2006). Dentre eles, os cogumelos comestíveis, têm sido considerados fortes produtores de diferentes substâncias como enzimas proteolíticas (YAMAÇ; BILGILI, 2006).

Dos cogumelos mais estudados, o gênero *Pleurotus* têm se destacado como fonte produtora de proteases, por exemplo: *Pleurotus ostreatusroseus*, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus citrinus*, (BARBOSA et al., 2020; PIMENTA et al., 2021; BRITO et al., 2021; COELHO et al., 2022). E de acordo Teixeira et al. (2011), o interesse está em expansão devido à simplicidade do processo de isolamento a partir das condições de cultivo.

Diante do exposto, esta dissertação apresenta dados parciais sobre caracterização bioquímica de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica, extraídas de cogumelos comestíveis a fim de propor, para a indústria farmacêutica, uma alternativa para o tratamento da trombose.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar bioquimicamente as enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica por fermentação submersa de *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus ostreatus*, que possam ser utilizadas na terapia trombolítica.

2.2 Específicos

- Preparar as condições mais adequadas de cultivo dos cogumelos, por fermentação submersa;
- Determinar proteínas totais, atividades proteolítica e fibrinolítica dos extratos obtidos;
- Caracterizar bioquimicamente a enzima no efeito e na atividade proteolítica dos cogumelos;
- Determinar atividade do efeito antioxidantes e citotóxica dos cogumelos;
- Pré-purificar a enzima proteolítica com ação fibrinolítica, por sistema de duas fases aquosas;
- Caracterizar a massa molecular da protease fibrinolítica por eletroforese e zimograma.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Esta dissertação está fundamentada com mais de 80 teóricos referenciados, dos quais foram obtidas de artigos publicados em revistas indexadas, livros físicos online, dissertações e teses dos bancos de dados das universidades federais do Brasil.

Na seção seguinte, buscou-se descrever alguns conceitos acerca da temática proposta, como a própria arte da minha pesquisa, compreendendo e analisando tudo sobre os fungos, classificação taxinômica, formas de reprodução, enzimas de cogumelos e sua aplicação para uso e tratamento da trombose.

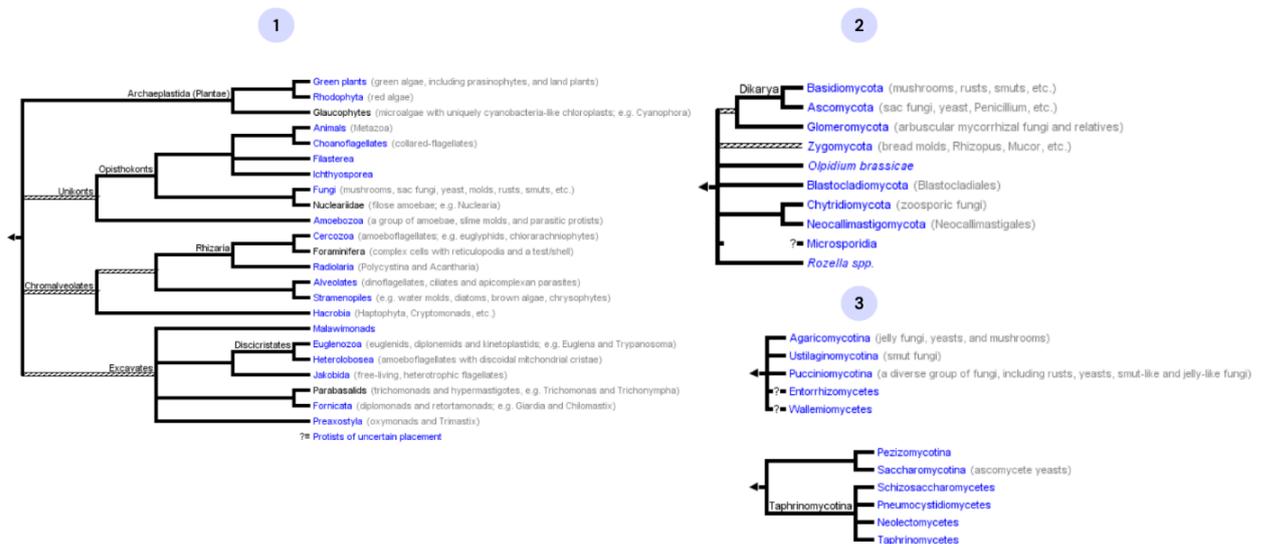
3.1 Fungos

Fazem parte do Reino Fungi e compreendem um vasto grupo de organismos tanto macro quanto microscópico (TELLES, 2010). São seres eucarióticos, constituídos por longos filamentos denominados hifas (pluricelulares) e ou pseudohifas (unicelular), heterotróficos com nutrição por digestão externa, liberando suas enzimas digestivas no substrato e absorvem os nutrientes (TRIERVEILER-PEREIRA et al., 2008; BLACKWELL et al., 2012).

As evidências bioquímicas da biologia molecular, levaram muitos cientistas a definir melhor os sistemas de classificação dos fungos até a presente data. Dessa forma, a sistemática filogenética tem sido constantemente reformulada com a proposição ou supressão de alguns filos ou outras categorias em diferentes níveis taxonômicos (MACEDO, 2017).

Encontrou-se na literatura, diversas classificações taxinômicas sobre os fungos (KIRK et al., 2008; BLACKWELL, 2011; EVERT e HEICHHORN; 2016; MACEDO, 2017). A figura 01, ilustra um cladograma que representa as relações de parentesco entre os Reinos e os oito filos estabelecidos para os fungos: Cryptomycota, Microsporidia, Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Ascomycota e Basidiomycota.

Figura 01: Imagem ilustrando um Cladograma mostrando as relações filogenéticas dos Reinos (1) entre os filios (2) evidenciando que ainda existem incertezas (linha pontilhada) e os dois filios mais numerosos quanto a espécies descritas (3).



Fonte: modificado e adaptado de Tree of Life Web Project (<http://tolweb.org/Fungi/2377>).

Estima-se que sua diversidade ultrapassa 5 milhões, representados por mais de 100.000 espécies, embora, a cada ano, mais de 4.000 espécies novas sejam descritas presentes em diversos ecossistemas (SANTOS, 2015).

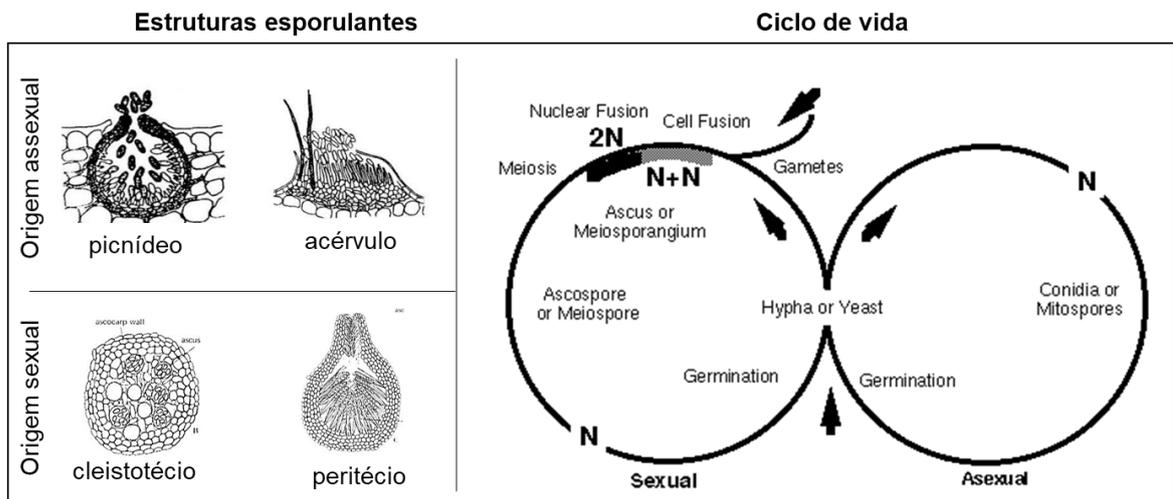
No mundo estão descritas aproximadamente 99.000 espécies de fungos, das quais cerca de 13.800 existiriam no Brasil (KIRK et al., 2008). Destes, acredita-se que a maior parte se encontram em ecossistemas tropicais como exemplo, a nossa floresta amazônica (HAWKSWORTH, 2001; HYDE, 2001; WEBSTER e WEBER, 2007), existindo 519 espécies reportadas para a Amazônia (FORZZA et al., 2010).

Estes organismos se apresentam na natureza sob diversas formas; micro e macroscópicas por ser uma linhagem de grupo polifilético. E são comumente denominados e conhecidos pela sociedade, como leveduras, bolores, mofos, cogumelos comestíveis ou alucinógenos, fungos gelatinosos, orelha-de-pau (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

O item três do cladograma (figura 01), ilustra os filios Basidiomycota e Ascomycota. Dados na literatura, indicam que ambos formam corpos reprodutivos compreendendo mais de 64.000 espécies descritas para os ascomicetos e mais de 30.000 espécies descritas para basidiomicetos (PETERSEN, 2012; SANTOS, 2015; LOGUERCIO-LEITE, 2010).

Os ascomicetos ocupam amplitude de ambientes competindo com outros eucariontes como saprófitos, parasitas, simbioses (ALEXOPOULOS et al., 1996). Sua reprodução pode ocorrer por estruturas esporulantes (sexuais e assexuais) ou por produção de ascósporos (Figura 02).

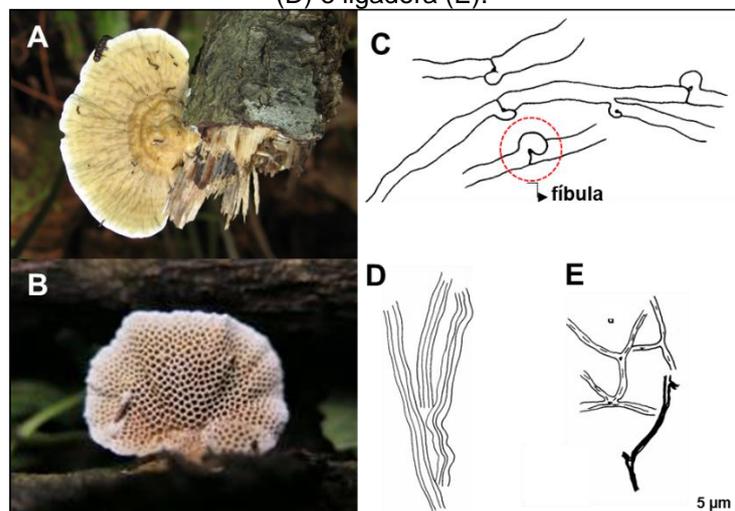
Figura 02: Imagem ilustrando aspectos de estruturas esporulantes e ciclo de vida dos ascomicetos.



Fonte: Modificado e Adaptado de Espósito; Azevedo (2010) e J. Taylor (1995).

Os basidiomicetos também ocupam os mais diversos substratos e os membros mais conhecidos deste grupo são os cogumelos comestíveis e medicinais (DEVECI et al., 2021). Apresentam estruturas somáticas homocarióticas ou heterocarióticas, envolvendo estruturas especiais, as fíbula ou grampo de conexão (Figura 03).

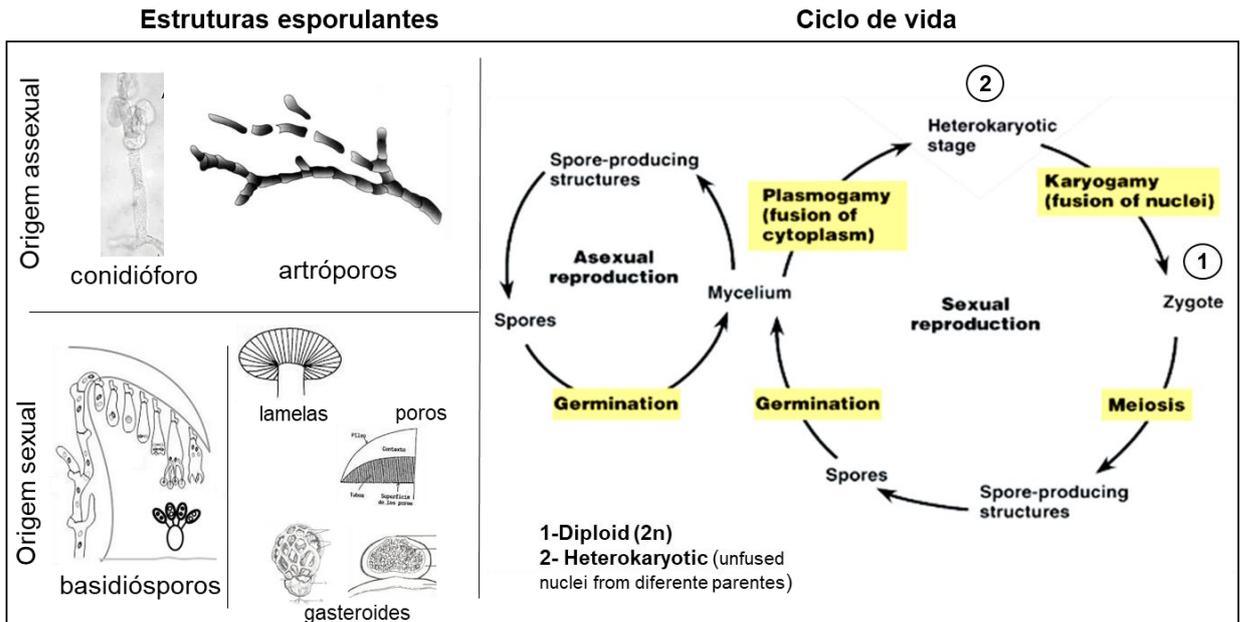
Figura 03: Estruturas somáticas ilustradas do fungo *Hexagonia tenuis* com ilustrações do Basidioma (A), himênio (B), Hifas generativas com a presença de fíbula destacada em vermelho (C), esquelética (D) e ligadora (E).



Fonte: Fotografia retirada do MycoPortal-Collections Portal e (<https://www.inaturalist.org/observations/4747817>) e de Loguercio-Leite (1994).

Os cogumelos em sua forma reprodutora, mais conhecidos como basidioma, desenvolvem a produção de esporos de origem assexuada por brotação, fragmentação do micélio e da produção de conídios, artrósporos ou oídios, e na origem sexual através de basidiósporos, ilustrada na figura quatro (ALEXOPOULOS et al., 1996; LOGUERCIO-LEITE, 2010).

Figura 04: Imagem ilustrando aspectos de estruturas esporulantes conforme suas origens e ciclo de vida dos basidiomicetos.



Fonte: modificado e adaptado de Alexopoulos et al., (1996); Barnett; Hunter, (1999); Jiménez et al., (2010).

Este grupo, em especial, vem sendo amplamente estudado por diversos cientistas pela ampla capacidade de interação em diversos setores das ciências. Presentes na agricultura, na alimentação, na indústria farmacêutica, na biotransformação, na engenharia genética e etc.

3.1.1 Cogumelos e seus benefícios

Os cogumelos, também conhecidos por outras denominações como fungos ou orelha-de-pau, atualmente estão agrupados em dois filos, Basidiomycota e Ascomycota (SILVA et al., 2016).

Diversos são os estudos comprovando que eles apresentam todos os 21 aminoácidos essenciais, sendo ricos em sais minerais e fibras de baixo valor calórico (VÁZQUEZ, 1994). Soccol et al. (2017), de um modo geral, comprovou que os cogumelos chegam a ser constituídos de 90% de água, além de elevados teores de proteína, vitaminas como B1 e C, e algumas vitaminas do complexo B como a riboflavina, biotina e niacina.

Outros autores, por meio de estudos *in vitro* e clínicos sugerem que o consumo de cogumelos ricos em compostos bioativos pode beneficiar a saúde devido aos efeitos biológicos correlacionados (VENTURELLA *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2018; MUSZYNSKA *et al.*, 2017).

Tal benefícios à saúde, para Martins (2019) se deve à presença de metabólitos primários e secundários, tais como ácido oxálico, proteínas, peptídeos, terpenos, esteroides, antraquinonas, derivados do ácido benzoico, quinolonas, alcaloides, taninos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos, β -glucanas e fenóis. Estas propriedades estão presentes tanto no cogumelo in natura quanto na forma de extratos purificados (ABDEL-AZIZ *et al.*, 2015; VALVERDE *et al.*, 2015).

Apesar dos benefícios citados, o cultivo de cogumelos no Brasil é relativamente recente, tendo se fortalecido com a imigração asiática em meados do século XX (DIAS, 2010; SIQUEIRA, 2015). Porém, o consumo destes ainda é algo que está sendo introduzido na cultura e na culinária da população brasileira, por falta de tradição e desconhecimento em relação aos cogumelos (GOMES *et al.*, 2016; ANPC, 2018).

3.1.2 Gênero *Pleurotus*

Macrofungo determinada taxonomicamente como: Fungi; Basidiomycota; Agaricomycetes; Agaricales; *Pleurotaceae*; *Pleurotus*; e *Pleurotus* sp. Se destacam por apresentar diversas biomoléculas, como os compostos fenólicos, terpenos, esteróides e polissacarídeos, associadas às atividades potencializadoras, antibióticas, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, hipocolesterolêmicas e hepatoprotetora

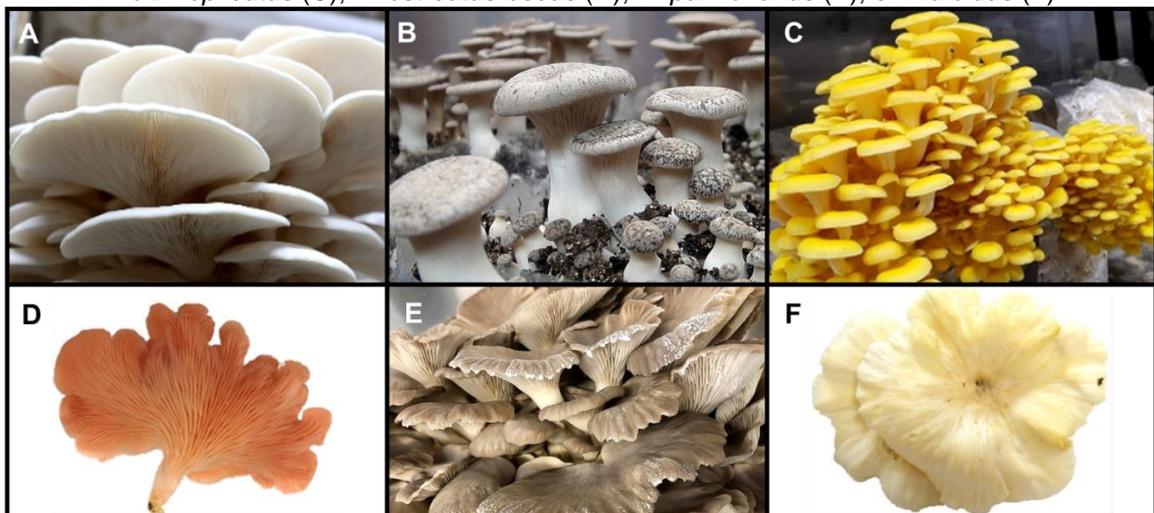
(LOURENÇO et al., 2016; SILVA et al., 2016; MATTJE, 2019; PAZZA et al., 2019; LLAURADÓ et al., 2020).

De acordo Gusman, (2000) mais de 1.000 espécies de *Pleurotus* foram descritas no mundo, no entanto, aproximadamente 50 destas são reconhecidas como válidas para este gênero, e pelo menos 15 espécies de *Pleurotus*, são conhecidas como ocorrendo no Brasil (PUTZKE, 2002).

Para Associação Nacional dos Produtores de Cogumelos (ANPC, 2022), representantes deste grupo estão entre as espécies mais consumidas no cenário mundial e brasileiro, ocupando a segunda posição no ranking mundial e nacional.

Dentre as espécies mais conhecidas, destacam-se: *Pleurotus djamor*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus sajour-caju* e *Pleurotus citrinopileatus* (JANNING, 2016). Mas sabe-se, que existem outros representantes também, assim como o *P. ostreaturoseus*, *Pleurotus eryngii*, e *Pleurotus albidus* (Figura 05).

Figura 05: imagem ilustrando alguns cogumelos do gênero *Pleurotus*: *P. ostreatus* (A); *P. eryngii* (B); *P. citrinopileatus* (C); *P. ostreaturoseus* (D); *P. pulmonarius* (E); e *P. albidus* (F).



Fonte: <https://www.fungicultura.com.br/>; Herbário micológico Jair Putzke.

Nota-se que as características do basidioma, apresentam formato do píleo é semelhante a uma concha e estipe excêntricos ou lateral, identificadas pela sociedade por diversas denominações. Representantes deste gênero, são comumente conhecidos por “cogumelos-ostra”, “Shimeji-branco”, “Shimeji-rei”, “Hiratake”, “cogumelos-ostra-branco”, podendo ter coloração que varia entre azul-escuro, cinza-escuro, branco, creme, marrom, amarelo e rosa ou salmão (PIMENTA, 2018).

Outras características são evidências para este grupo, podendo ser no meio ambiente como parasitas e sapróbios, encontradas sobre madeira e raízes, causando patologia na madeira conhecida como podridão branca e apresentam forma pleurotoide (FORTUNA, 2021). E classificados como fungos causadores da podridão branca da madeira, devido à forma que suas enzimas degradam a lignina, celulose e hemicelulose presentes em palhas, bagaços, serragens e diversos outros resíduos (ABREU et al., 2007; MAMIRO e MAMIRO, 2011; AGUIAR, 2016).

3.2 Trombose

Compreende-se por trombose, de acordo Muguet et al. (2022), a formação ou desenvolvimento de um coágulo sanguíneo (trombo) responsável por causar inflamação na parede do vaso quando a fibrina não é hidrolisada em casos de desequilíbrio do sistema biológico por redução do teor sanguíneo de plasmina (CHOI et al., 2017).

Conforme em base de dados fornecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 17,9 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares (DCV) em 2019, representando 32% de todas as mortes globais (WHO, 2021). No Brasil, apenas no ano de 2014 foram registrados 605,1 óbitos para cada 100 mil habitantes motivados por causas circulatórias (BARROS, 2018), sendo o país com quarto maior índice de mortalidade por acidente vascular cerebral (AVC) da América Latina e Caribe (BRASIL, 2017).

Segundo Rocha et al. (2005), caracteriza como uma das doenças que se associa ao Tromboembolismo venoso (TEV). Além disso, Muguet et al. (2022), consideram ela também, como um processo patológico de ativação e propagação imprópria da resposta hemostática do organismo.

E de acordo a Sociedade Brasileira de Trombose e Hemostasia, tal patologia pode ocorrer em veias ou em artérias pelo bloqueio da circulação provocada por um coágulo de sangue, também chamado de trombo que, este por sua vez, poderá atingir os pulmões desenvolvendo a embolia pulmonar (TEP), em caso quadro grave (SBTH, 2019).

Dessa maneira, Cercas (2017) compreende dois tipos clínicos principais para a formação da trombose venosa, uma que pode ocorrer tanto numa veia profunda (TVP) ou quando um ou vários êmbolos são liberados na circulação venosa e se alojam na vascularização pulmonar, dando origem a uma tromboembolia pulmonar (TEP).

Diante dessas características clínicas, estima-se que 200.000 habitantes por ano são acometidos por algum fenômeno trombótico com elevado impacto na morbimortalidade e sendo que a grande maioria dos pacientes são dependentes de serviços públicos (SBTH, 2019).

No entanto, para Alves et al. (2015), a fisiopatologia da trombose venosa é considerada complexa, envolvendo a parede das veias e a lesão das mesmas por fatores extrínsecos (trauma, cirurgia) ou intrínsecos (citoquinas inflamatórias) ou entres outros componentes que promovem a amplificação do trombo.

3.2.1 Tratamentos

Existe vários tipos de tratamentos atualmente disponíveis, os anticoagulantes são mais comuns, por apresentar capacidade de diminuir ou aumentar os coagulo do sangue. Mas em geral, com pouca evidência científica (ALMEIDA, 2019).

Tritschler et al. (2018), ainda observaram que nos últimos anos, os tratamentos têm ganhado progresso com a incorporação dos anticoagulantes orais diretos (DOACs) ao arsenal terapêutico e à assimilação da necessidade de terapia por tempo prolongado.

Além disso, conforme análise de Almeida (2019), em uma metanálise de seis estudos demonstrou que o uso de novos anticoagulantes orais diretos foi efetivo na prevenção do TEP e na recorrência da trombose venosa superficial (TVS).

De acordo Sanches (2019), os anticoagulantes orais diretos (DOACs) disponíveis para uso no Brasil, são os inibidores diretos da trombina como Dabigatrana ou do fator X ativado como Rivaroxabana, Apixabana e Edoxabana.

Os coagulantes orais costumam ser bastante utilizados, e possibilitam um controle mais preciso da coagulação por meio de exames clínicos. No entanto, uma das suas desvantagens é que seu efeito pode ser alterado pela interação de outros medicamentos, ou mesmo de alimentos ricos em vitamina K.

3.2.2 Enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica

As enzimas, quimicamente são definidas como proteínas que chegam a desempenhar papel catalizador muito eficaz. Além disso, sua impressionante atividade catalítica, especificidade pelo substrato e estereoespecificidade capacitam as enzimas a preencher os papéis principais em outros processos relacionados com a saúde e o bem-estar do ser humano (RODWELL et al., 2017).

Estas por sua vez, são encontrados em todos os organismos vivos, com diversas aplicações devido a sua alta especificidade de substratos, como na indústria de alimentos, da farmacologia, de detergentes, de biocombustíveis, entre outros. Estima-se que o mercado global de enzimas industriais ultrapasse o valor de seis bilhões de dólares até 2021 (RAVINDRAN et al., 2018).

Para Carrasco-González et al. (2017) e Valério (2021), as proteínas e peptídeos presentes em espécies de cogumelos comestíveis apresentam excelente atividade biológica e a qualidade proteica, contendo assim, elevados teores de todos os aminoácidos essenciais e não essenciais e uma excelente digestibilidade proteica.

A fibrina é uma proteína componente do sangue que desempenha papel importante na hemostasia. Dessa forma, esta proteína é formada pela conversão do fibrinogênio solúvel molecular em monômeros de fibrina que polimerizam espontaneamente e criam uma rede de gel de fibrina (BUBA, 2018).

As proteases constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos (RAJPUT et al., 2016; SILVA et al., 2016). Na literatura, diversos estudos demonstraram a diversidade de microrganismos produtores de enzimas fibrinolíticas identificados e estudadas, nos quais são incluídos: insetos (AHN et al., 2003), poliquetas (DENG et al., 2010), veneno de serpentes (DE-SIMONE et al.,

2005) e cogumelos comestíveis ou medicinais (LEE et al., 2006; SHEN et al., 2007; PARK et al., 2007; CHA et al., 2010; CHOI et al., 2011).

Entre os fungos, os cogumelos têm sido considerados fortes produtores de diferentes substâncias como fonte de proteases (BENEDICT; BRADY, 1972; YAMAÇ; BILGILI, 2006). Devido à ampla diversidade bioquímica que possuem, à susceptibilidade à manipulação genética, à alta produtividade de biocompostos extracelulares, facilmente recuperados quando cultivados em meio líquido ou em matriz sólida (MARTIM et al., 2017).

E para Mander et al. (2011), o acúmulo desta proteína nos vasos ou artérias, é uma das principais causas da enfermidade, denominadas trombose intravascular. Portanto, as proteases fibrinolíticas, agem como biocatalizadores no qual degradam coágulos de fibrina, ganhando assim, um importante papel na indústria farmacêutica como agentes quimioterapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares (CHO et al., 2004; DAS; PRASAD, 2010; FEIJOO-SIOTA).

4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Neste estudo, os testes foram realizados a fim de compreender as respostas obtidas conformes os objetivos específicos determinados no item 2.2. E como resultados das análises dos dados obtidos neste item, foram organizadas em três capítulos como artigos, onde dois já se encontram publicadas.

O capítulo I, está caracterizado por estudo do tipo revisão sistemática onde concentra uma análise de um levantamento realizado nos últimos dez anos (2011-2022). O artigo, intitulado: “*Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years*” lista diversas espécies de cogumelos que tiveram resultados significativos para o tratamento da trombose.

O capítulo II, caracteriza-se como uma pesquisa *in vitro* onde a espécie *Pleurotus eryngii*, cogumelo comestível, foi cultivado em dois meios por fermentação submersa a fim de se obter extrato enzimático. O artigo, intitulado: “*Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa*”, apresenta dados onde confirmam as características químicas das enzimas produzidas por *P. eryngii*.

O capítulo III, também se caracteriza como uma pesquisa *in vitro* onde o extrato enzimático do cogumelo *P. eryngii* foi pré-purificado em sistemas de duas fases aquosas. O artigo, intitulado: “*Atividade antioxidante, citotóxica e pré-purificação de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de extratos obtidos por fermentação submersa de cogumelos comestíveis*”, apresenta dados sobre a partição do sistema de planejamento fatorial, onde a enzima tem maior afinidade na fase rica em sal (Na_2SO_4).

CULTIVATION CONDITIONS AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLYTIC ENZYMES WITH FIBRINOLYTIC ACTION OBTAINED FROM MUSHROOMS IN THE LAST TEN YEARS

Romário da Silva Santana; Viviane Gonçalves de Farias; Elison de Souza Sevalho; Kadmiel Candido; Klaramelia Consuelo Ramón Carpio; Waldireny Rocha Gomes; Rosany Piccolotto Carvalho

Revista: Research, Society and Development

Accepted: 10/30/2022 | Published: 11/05/2022

Doi: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36652>

Abstract

Fibrinolytic enzymes are proteases that are capable of degrading the fibrin mesh present in blood clots and can be obtained through fungal extracts. Thus, the objective of this paper was to seek out and compare all the information regarding the production and biochemical characterization of fibrinolytic enzymes of mushroom species published in papers in the last ten years. The research was carried out in eight national and international electronic databases using the terms: “fungal enzymes”, “fibrinolytic Proteases”, “thrombosis” and “mushrooms”. The results obtained were analyzed according to each step. In the first stage, the titles and abstracts of all papers were analyzed independently; in the second stage, all papers were read and those that did not meet the inclusion criteria were excluded. Then, the remaining papers were reviewed and the data were tabulated and compared. As a result, it was found that enzymes with fibrinolytic action were obtained from eight species of mushrooms in the period of this research: *P. sajor-caju*, *P. ferulae*, *P. ostreatus*, *L. shimeji*, *A. polytricha*, *H. erinaceum*, *C. comatus* and *C. militaris*. The enzymes were identified as protease SPPs, metalloproteases, serine proteases and serine metalloproteases. The methods used to evaluate fibrinolytic activity were the fibrin plate method and/or the formation of artificial thrombus through thrombin and fibrinogen. The molecular mass of these enzymes ranged from ~18 to 66 kDa and, for the biochemical characterization of the extracts, the pH ranged from 4.0 to 9.5 and the optimum temperature from 25 to 70 °C. Via the review, it was observed that few articles were published on the subject in question, which made it necessary to carry out more studies to discover the biotechnological properties of mushrooms and define their applications in the most diverse sectors of industries, not only in commercial species of mushrooms, but also in native species.

Keywords: Fibrinolytic proteases; Mushroom; Thrombolytic therapy; Fibrin.

1. Introduction

Enzymes are biocatalysts that accelerate the speed of specific chemical reactions. Biotechnology has revolutionized the use of traditional enzymes so that they can be applied in commercial and industrial fields (Wu et al., 2021). Global demand and trade for industrial enzymes is growing steadily and is estimated to reach \$7 billion by 2023 (Fasim et al., 2021).

Proteases are enzymes that catalyze the hydrolysis (covalent bond breaking with the participation of a water molecule) of peptide bonds of other proteins, cleaving them into amino acid fragments. Among the various applications of proteases, fibrinolytics stand out, since they are able to degrade fibrin, the most abundant protein in blood clots (Ali et al., 2022; Li et al., 2021). Clot formation is usually regulated by the biological system; but, when fibrin is not hydrolyzed, thrombosis and other cardiovascular diseases can occur (Sharma et al., 2021).

Mushroom extracts are widely used as nutritional supplements and medicines, and present benefits for human health. Most fibrinolytic enzymes (FEs) used industrially are of microbial origin and especially of fungal origin (Altaf et al., 2021). The main advantages with fibrinolytic agents of microbial origin are that they have high yields in activity, reproducibility, economic production, exponential growth, easy optimization and mass production of FEs. These advantages are the main criteria for meeting global market demand on an industrial scale (Katrolia et al., 2020; Acosta et al., 2022).

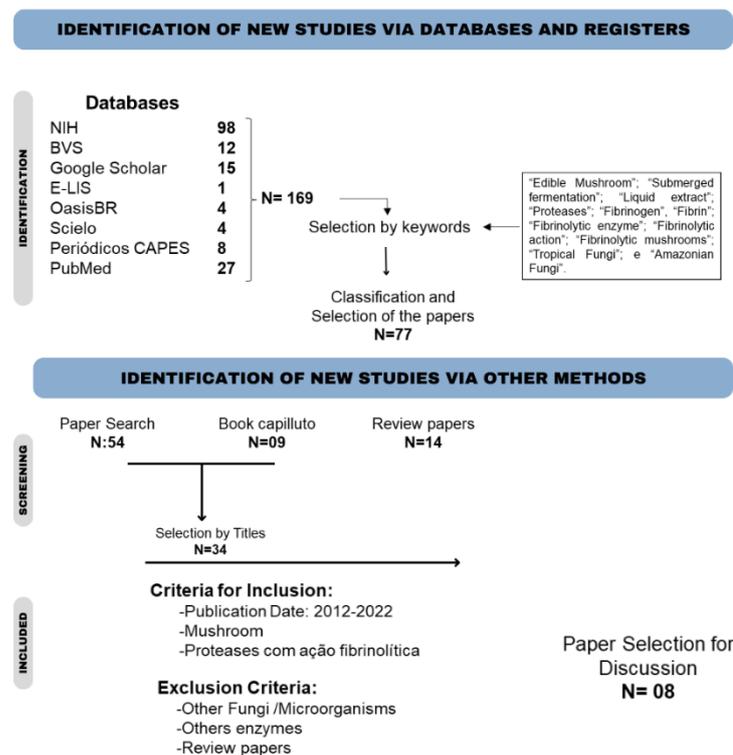
Proteases have been purified and characterized from reproductive structures (basidiome or ascoma) of many species of medicinal or edible mushrooms, including *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus albidus*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus florida*, *Pleurotus ostreatus*, *Coprinus comatus*, *Hericium erinaceum*, *Auricularia polytricha*, *Lyophyllum shimeji*, *Cordyceps militaris* and *Lentino citrinus* (Fonseca, 2013; Machado et al., 2016; Barbosa et al., 2020; Pimenta et al., 2021; Brito et al., 2021; Coelho et al., 2022). Although mushrooms are sources of proteases, there are little data available in the literature on their fibrinolytic action. The objective of this review was to present an overview of the features, production and biochemical characterization mechanisms of fibrinolytic protease from mushroom species.

2. Methodology

2.1 Included, screening, and identification of new studies via databases and registers.

This bibliographic review was conducted following the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis) checklist, which is a method also used by (Bezerra et al., 2021). For data collection, a survey was conducted in international electronic databases (Web of Science (WoS) Core Collection electronic database, National Center for Biotechnology Information, E-prints in Library and Information Science and Scientific Electronic Library Online, and Brazilian Open Access Publications and Scientific Data Portal, Regional Portal of the Virtual Health Library-VHL, CAPES Journal Portal, as shown in Figure 1.

Figure 1. Flow diagram of literature search and selection criteria.



Source: Authors (2022).

The results of the literature (research papers, reviews, and book chapters) survey were filtered using terms: “Edible Mushroom”; “Submerged fermentation”; “Liquid extract”; “Proteases”; “Fibrinogen”, “Fibrin”; “Fibrinolytic enzyme”; “Fibrinolytic action”; “Fibrinolytic mushrooms”; “Tropical Fungi”; and “Amazonian Fungi” in the topic

item that includes the title, summary, and keywords. Additionally, we restricted our search to reports published from January 1, 2012 to January 30, 2022.

2.2 The selection of the papers was conducted in two stages.

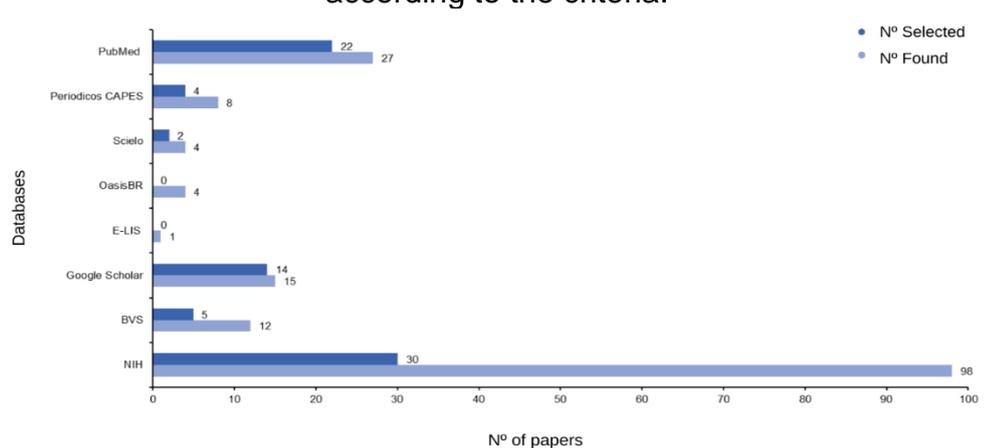
In stage one, the titles and abstracts of all the papers were analyzed independently. This first review selected papers that seemed to meet the inclusion criteria based on the title and abstract. Studies that did not meet any of the inclusion criteria or that were not related to the topic of this review were excluded. In stage two, the papers were read and those that did not meet the inclusion criteria were excluded. Finally, the studies were reviewed and selected for analysis and discussion of the data.

3. Results and Discussion

3.1 Study selection and characteristics.

After applying the search procedures in the electronic platforms established in the methodology, initially, twelve keywords were used to elaborate and contextualize this study. However, for the discussion of this paper, only four relevant keywords were needed: fibrinolytic proteases, mushroom, thrombolytic therapy, fibrin. More than 50% were found in the National Center for Biotechnology Information – NIH platform. Of these, few references were obtained in the databases E-LIS, OasisBR, Scielo and periódicos CAPES (Figure 2).

Figure 2: Graph illustrating numbers of papers selected from the databases, according to the criteria.



Source: Authors (2022).

Of the 34 papers were found involving fibrinolytic protease enzymes produced by mushrooms. Subsequently, after applying the inclusion and exclusion criteria, a review of the full texts was completed, and eight papers were selected for this review. Following the selection criteria according to title and abstract, 46% of the papers were

analyzed, all review papers were excluded, among the other criteria already established in the methodology. All eight papers were read and the main characteristics of the studies, including authorship, impact factor, number of citations, title and most relevant considerations of the study were summarized (Table 1).

Table 1: Characterization of the main characteristics of the eight selected papers: a descriptive analysis.

| Author(s)/Year/Journal | Impact factor/number of citations | Title | Study considerations |
|---|-----------------------------------|---|--|
| Xiao-lan Liu, Xiqun Zheng, Juan-kun Zhang (2012) Applied Mechanics and Materials | 5.587**-,5.246* 7 | Production of a Fibrinolytic Enzyme from <i>Coprinus comatus</i> YY-20 | The enzyme of the species under study can be applied as a natural agent in the form of oral anticoagulants, in the therapy or prevention of thrombosis. |
| Bong-Suk Choi, Kumar Sapkota, Jun-Hui Choi, et al., (2013) Appl Biochem Biotechnol | 3.014**-,2.431* 44 | Herinase: A Novel Bi-functional Fibrinolytic Protease from the Monkey Head Mushroom, <i>Hericium erinaceum</i> | Enzyme isolation was performed and the biochemical properties of herinase appear to be a promising for further studies in thrombolytic therapy. |
| Sharjah Mohamed Ali, Tau Chuan Ling, et al., (2014) Separation and Purification Technology | 8.425**-,7.312* 46 | Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of <i>Auricularia polytricha</i> (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system | The crude lyophilized extract showed significant fibrinolytic activity (10.83 U/mg). This was purified (ATPS) and its enzyme characterized for which the molecular weight of the enzyme is 66 kDa. |
| Xiao-lan Liu, Xi-qun Zheng, Peng-zhi Qian, et al., (2014) J. Microbiol. Biotechnol | 3.45**-,2.351* 50 | Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of <i>Pleurotus ostreatus</i> | The fibrinolytic enzyme of <i>Pleurotus ostreatus</i> can also be applied as a natural agent for oral fibrinolytic therapy or thrombosis prevention. |
| Sung-Min Moon, Jae-Sung Kim, et al., (2014) Journal of Bioscience and Bioengineering | 3.313**-,2.894* 43 | Purification and characterization of a novel fibrinolytic, a chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom <i>Lycophyllum shineji</i> | Chymotrypsin as purified serine-metalloprotease may be useful for thrombolytics, similar to the known fibrinolytic enzymes such as lumbrokinase and nattokinase. |
| Xiaolan Liu, Narasimha kumar Koppurapu, et al., (2015) Journal of Agricultural and Food Chemistry | 5.504 **-, 5.279* 22 | Purification and Biochemical Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme from Culture Supernatant of <i>Cordyceps militaris</i> | The enzyme in this research may act as an anticoagulant and prevent thrombosis. Therefore, the enzyme can be used as a therapeutic agent for the treatment of thrombosis. |
| Jun-Hui Choi, Dae-Won Kim, Seung Kim, Sung-Jun Kim (2017) Preparative Biochemistry and Biotechnology | 2.358** 17 | Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom <i>Pleurotus ferulae</i> | Evidence of antithrombotic potential by the action of the metalloprotease enzyme isolated from the mushroom, showing effective activity against thrombin and fibrinogen, necessary for the formation of the fibrin clot. |
| Maroua Omrane Benmrad, Sondes Mechri, et al. (2019) BMC Biotechnology | 3.252**-,2.563* 38 | Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom <i>Pleurotus sajor-cajii</i> strain CTM10057 with industrial interest | This mushroom constitutes a new source of proteolytic activity (SPPS) for the applications, showing a high degree of hydrolysis and catalytic efficiency when compared to SPTC and the commercial proteases Flavourzyme® 500 L and Thermolysin type X. |

Impact factor according to the Web of Science (*) and Scopus (**) databases. **Source:** Authors (2022).

In this context, the impact factor (IF) is one of the criteria for confirming the quality of journals and also the technical resource of evaluation in journals (Strehl, 2005; Ruiz et al., 2009). It was observed that more than 55% of the selected papers were published in different journals, with an impact factor ranging from 0.738 to 7.312 in the Web of Science collection data, and from 0.494 to 8.425 in the Scopus data.

Of these, the article by Ali et al. (2014) was published in the Journal Separation and Purification Technology, which presented the highest impact factor (8.425), and the article by Liu et al. (2014) was published in the Journal Microbiology Biotechnology, which presented the lowest impact factor (2.351).

Another factor analyzed in this study was how often the selected papers were cited and referenced by other authors. The paper authored by Liu et al. (2014), published in the Journal of Microbiology and Biotechnology, had the highest number of citations (50), and the paper by Liu et al. (2012), published in the journal Applied Mechanics and Materials, had the lowest, with seven citations. Finally, all the studies evaluated had as their main objective to verify the potential of proteolytic enzymes with fibrinolytic action produced by mushrooms in their most varied forms of cultivation.

3.2 Review and analysis of papers.

Among the fungi found in this study, it can be seen that mushrooms produce a variety of enzymes that meet the nutritional and pharmaceutical requirements for development and improvement in the human physiological process. They present mild processing conditions, catalyze reactions and are chemically and environmentally sustainable and less toxic (Sharma; Bajaj, 2017).

Liu et al. (2012) studied the mushroom *C. comatus* and the enzyme extracted from the submerged culture, which was not characterized, but showed catalytic activity of 164.49 U/mg, under conditions of pH 5.0 at 25 °C. Choi et al. (2013) analyzed and characterized the enzyme extracted from *H. erinaceum*, which was a metalloprotease type, with reaction at 220.65 U/mg, at a slightly acidic pH (5.5) and at 30 °C.

Ali et al. (2014) demonstrated that *A. polycrita* had significant fibrinolytic activity at 10.83 U/mg, when extracted from the lyophilized basidiome, under conditions of neutral pH (7.0) at 37 °C. Moon et al. (2014) concluded that the mushroom *L. shimeji* has an enzyme of serine metalloprotease type with the same action of lumbrokinase and nattokinase. The catalytic reaction of the enzyme was determined as 178.9 U/mg under alkaline conditions (pH 8.0) at 37 °C.

Choi et al. (2016) discovered that metalloproteases obtained from the *P. ferulae* basidiome have antithrombotic potential. The catalytic reaction, effect and stability of the enzyme was estimated at 1253.33 U/mg under acidic conditions (pH 4.0) at 50 °C. Benmradi et al. (2019) found that *P. sajor-caju* proteases obtained in a submerged bioprocess demonstrate fibrinolytic activity similar to commercial drugs. The enzyme showed catalytic action at 79,000 U/mg under alkaline conditions (pH 9.5) at 70 °C.

3.3 Biochemical characterization of fibrinolytic protease.

Chemically, enzymes are defined as proteins built from long polymers and chains of amino acids, which can play a very effective catalytic role in the cellular system. Fibrin, an insoluble protein derived from a soluble precursor, fibrinogen, consists of three combinations of polypeptide chains, which are designated A α , B β and γ , which are arranged in an elongated structure of 45 nm in length and 2-5 nm in diameter (Kollman et al., 2009; Pechik et al., 2006). This protein is a component of the blood that plays an important role in hemostasis; as a binding and healing agent in inflammation.

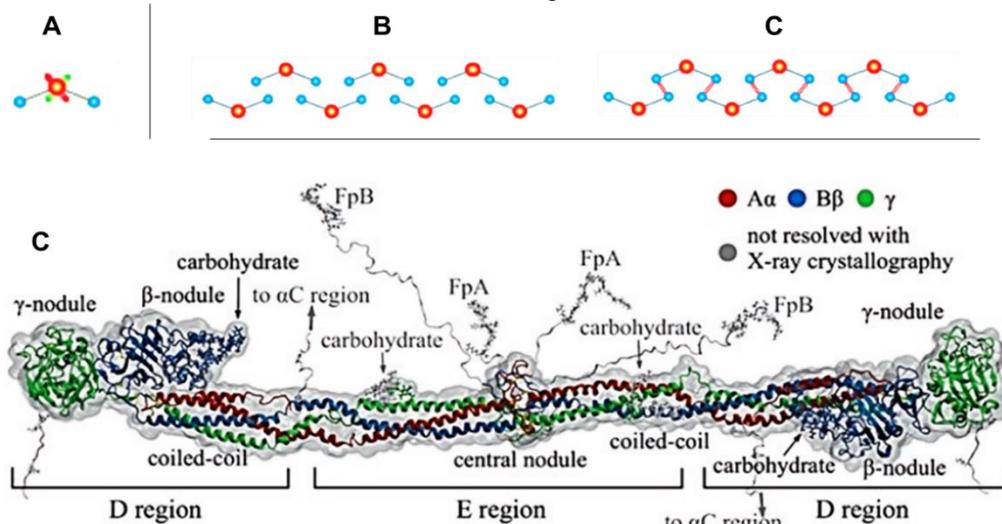
The accumulation and formation of inadequate clots in the vessels or arteries, under certain pathophysiological conditions of the organism, is an important risk factor for heart disease (Mander et al., 2011; Bajaj et al., 2014), especially in the complications of acute myocardial infarction, ischemic heart disease, valvular diseases, peripheral vascular diseases, arrhythmias, high blood pressure and stroke (Mine et al., 2005).

Fibrinolytic proteases act as biocatalysts, in which they degrade fibrin clots, and thus gain an important role in the pharmaceutical industry as chemotherapeutic agents in the treatment of cardiovascular diseases (Cho et al., 2004; Das and Prasad, 2010; Feijoo-Siota and Villa, 2011).

The protein catalytic reaction is formed by proteolytically converting soluble fibrinogen molecules into fibrin (polymeric) monomers that spontaneously polymerize and create a fibrin gel network, as illustrated in Figure 3 (Anna et al., 2017; Buba, 2018).

For fungal proteases, four classes have been recognized by the International Union of Biochemistry (Figure 4A): serine endopeptidases (EC 3.4.21.-), cysteine-endopeptidases (EC 3.4.22.-), aspartic endopeptidases (EC 3.4.23.-), and metallo-endopeptidases (EC 3.4.24.-) (Angelo et al., 2010).

Figure 3: Representation with schematic edits adapted to better understand the fibrinogen molecule (A), the interaction of soluble (B) and insoluble fibrin polymers (C). Scheme C illustrates the three-dimensional structure of the fibrinogen molecule with its D domains, at the ends, and E domain in the center interacting with the A α and B β chains with FpA and FpB in the central node and the beginning of the α C regions.

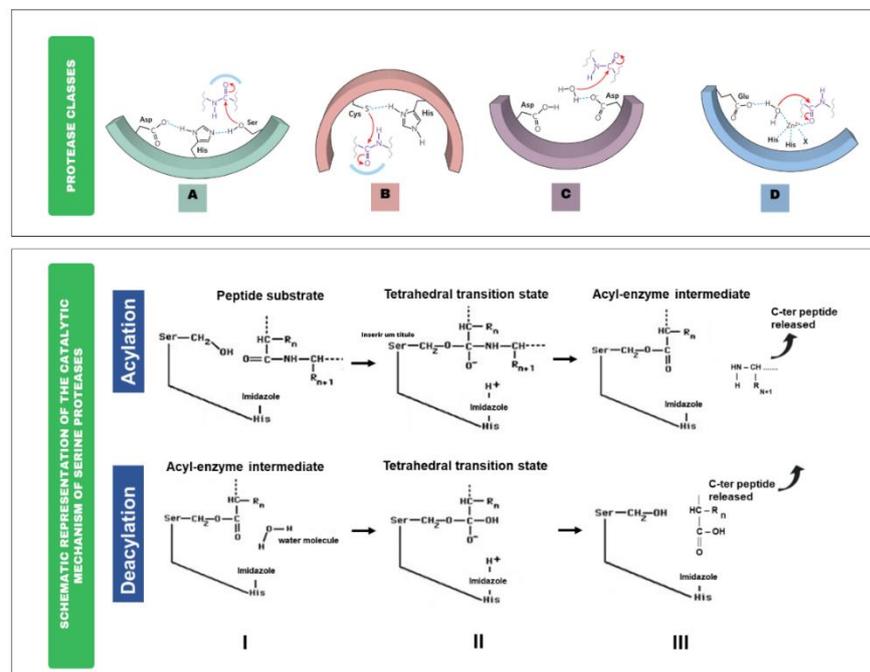


Source: Weisel; Litvinov (2017).

The enzyme families are determined by the mechanism of action and the presence of amino acid residues (Figure 4B) to form an acyl-enzyme intermediate that covalently binds to the N-terminus of the enzyme substrate (Erez et al., 2009; Shafee, 2014; Naeem et al., 2022).

Figure 4: Schematic representation of enzyme classes and the catalytic mechanism. A) Soluble serine proteases (EC 3.4.21; A in the image), the mechanism of cysteine proteases (EC3.4.22; B in the image), the aspartyl proteases (EC 3.4.23; C in the image) Metalloproteases (EC 3.4.24; D in the image). B) Schematic representation of the catalytic mechanism of serine proteases.

<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/>.



Source: Erez et al., (2009).

3.4 Mushrooms as sources for the production of fibrinolytic enzymes.

The scientific community already effectively utilizes all available information on fibrinolytic enzymes. As a future perspective, the community should focus on exploration edible mushrooms. Fibrinolytics can be obtained from several natural sources and are widely researched in food and non-food sources. In this context, there is a particular interest in fibrinolytic enzymes obtained from foods, especially those from fermented foods, which present a different perspective in relation to fibrinolytics from other sources (Ali and Bavisetty, 2020).

The emergence of an interest in the study of basidiomycetes as possible producers of proteolytic enzymes is a consequence of the lack of animal raw materials and the imperfection of microbial preparations (Ali et al., 2022). The search for enzymes for the food and medical industry among basidiomycetes is determined by two circumstances: the absence of sporulation in culture, which reduces the risk of occupational diseases in industrial conditions, and the presence of a large number of edible mushrooms (Katrolia et al., 2020; Li et al., 2021).

However, FEs of microbial origin have come into the spotlight due to their advantages such as ease of handling, substrate specificity, and ease of genetic manipulation for large-scale enzyme production. Several promising and potential strains have been isolated, especially from traditional fermented foods. In this context, this topic aims to throw a spotlight on the production of FEs through statistical optimization for fermentative bioprocessing, and genetic engineering approaches with strains isolated from diverse sources (Fasim et al., 2021).

Eight species of mushrooms grouped in the phylum Basidiomycota were identified: *P. sajor-caju*; *P. ferulae*; *P. ostreatus*; *L. shimeji*; *A. polytricha*; *H. erinaceum*; and *C. comatus*; and, for Ascomycota: *C. militaris*. Regarding the biochemical characterization of the fungal extracts, for the effect on the activity and stability of the enzyme, the species showed significant action ranging in pH from 4.0 to 9.5 at temperatures from 25 to 70 °C. These characteristics are considered crucial for assessing the conditions under which the enzyme reaches maximum activity and for it to be used in various industrial processes (Aguilar and Sato, 2018; Banerjee and Ray, 2017).

As shown in Table 2, mushrooms that are considered the most valuable resources for the production of fibrinolytic enzymes, while there are no studies that have evaluated the fibrinolytic potential of edible mushrooms-derived enzymes. It

should be noted that the catalytic activity of fibrinolytic enzymes can be improved by chemical modification.

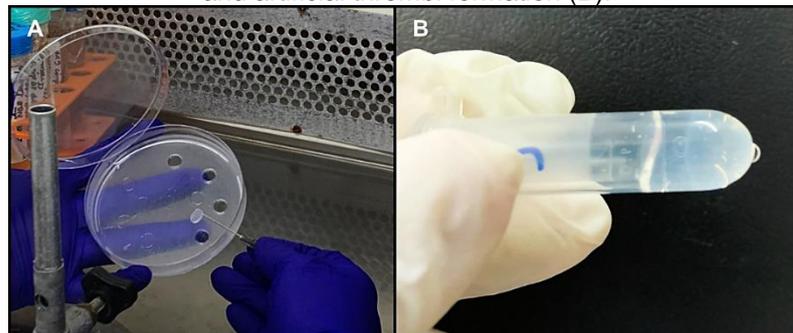
In this study, it was observed that the vast majority of the mushrooms studied synthesized fibrinolytic enzymes, which were identified as protease SPPS (Benmradi et al., 2019), metalloproteases (Choi et al., 2016; Liu et al., 2014; Choi et al., 2013), serine proteases (Liu et al., 2015) and serine metalloproteases (Moon et al., 2014).

The molecular mass of the enzymes identified in the selected papers range from ~18 to 66 kDa under different submerged culture conditions to favor the development and performance of the enzyme. These were analyzed in a short period of time and also from the direct extraction of the basidiome of the mushroom. According to Cardoso et al. (2022), even if it involves chemical or physical agents, enzymatic characterization is able to affect the native state of the enzyme, yet when intended for the pharmaceutical industry, it is essential.

3.5 Fibrinolytic tests.

The fibrinolytic action of mushroom species can be determined in different methodologies, such as the fibrin plate method, which is a direct measure of qualitative activity, evidenced by the degradation halo that is formed around the wells (Figure 5A) and by dissolution of the artificially produced clot/thrombus (Figure 5B). These methodologies are considered complementary for the quality of the results in studies involving the determination of the fibrinolytic enzyme (Ferreira et al., 2010; Galo and Colombo, 2009).

Figure 5: Illustration of the methods for determining fibrinolytic activity via the fibrin plate method (A) and artificial thrombi formation (B).



Source: Authors (2022).

The fibrin plate method is a qualitative method for direct measurement of halo appearance (Flute, 1964), observed by cup plate test for enzyme detection via degradation of the halo formation (Sousa et al., 2008). The artificial thrombi method is an in vitro quantitative method (Figure 7) performed by the formation of fibrin clots formed through the reaction of thrombin and fibrinogen (Astrup and Mullertz, 1952),

and the clot dissolving capacity by fibrinolytic enzymes present in a sample for determination of fibrinolytic activity is quantified using spectrophotometry (Wang et al., 2014).

Table 2: List of mushroom species and biochemical characterization of enzymes synthesized under different growing conditions.

| Species | Acquisition of the Extract | | Biochemical Characterization | | | | | | Reference |
|-------------------------------|---|--------------------|------------------------------|-------------|--|-------------------------------|----------------|------------------------|-----------------------|
| | Cultivation Conditions | Fermentation | pH | Temperature | Metal ions | Inhibitors | Molecular Mass | Enzyme | |
| <i>Pleurotus sajor-caju</i> | BDA- lentil flour, YE, glucose, KH ₂ PO ₄ | SF-28 °C 3 days | 9.5 | 70 °C | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ | PMSF and DFP | ~65 kDa | Protease SPPS | Benmrad et al. (2019) |
| <i>Pleurotus ferulae</i> | Basidiomes in sterile saline | - | 4.0-8.0 | 50 °C | Cu ²⁺ , Mg ²⁺ | EGTA and EDTA | ~20 kDa | Metalloprotease | Choi et al. (2016) |
| <i>Cordyceps militaris</i> | Sucrose and soybean meal | SF 23 °C | 7.4 | 37 °C | Fe ²⁺ | PMSF, Aprotinin and Pepstatin | ~32 kDa | Serina Aspartica | Liu et al. (2015) |
| <i>Pleurotus ostreatus</i> | BDA-Glucose-KH ₂ PO ₄ -MgSO ₄ -soymilk | SF -25°C 6 days | 7.4-7.8 | 37 °C-45 °C | Ca ²⁺ , K ⁺ | EDTA, SBTI and Pepstatin | ~18 kDa | Metalloprotease | Liu et al. (2014) |
| <i>Lyophyllum shimeiji</i> | Basidiome obtained from the Yedang Mushroom Company | - | 8.0 | 37 °C | Cu ²⁺ , Co ²⁺ | PMSF and TPCK | ~21 kDa | Serina Metalloprotease | Moon et al. (2014) |
| <i>Auricularia polytricha</i> | Basidiome obtained from a mushroom farm (lyophilized) | - | 7.0 | 37 °C | - | - | ~66 kDa | - | Ali et al. (2014) |
| <i>Hericium erinaceum</i> | Basidiome obtained from the Korean Mushroom Company | - | 5.5-7.0 | 30 °C | Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ | PMSF-TPCK and Aprotinin | ~51 kDa | Metalloprotease | Choi et al. (2013) |
| <i>Coprinus comatus</i> | Sucrose and soybean meal | SF-25 °C 6 days | 5.0 | 25 °C | - | - | - | - | Liu et al. (2012) |

Submerged fermentation (SF). Source: Authors (2022).

4. Conclusion

In general, this review paper summarized the main characteristics of the mushroom species that produce proteolytic enzymes with fibrinolytic action. As such, it can be seen that mushroom biocompounds meet the criteria of the pharmaceutical industries for obtaining and producing in the short term, and also have low cost, mild synthesis conditions, ease of use and wide specificity for substrates, when compared with other microorganisms. The most studied species were of the genus *Pleurotus*, and it is believed that this was due to the easy acquisition of the basidiomes.

Few species of mushrooms have been studied in recent years and not all studies that have already been published can be considered complete; either because they have not purified or because they have not biochemically characterized the fibrinolytic enzymes. Thus, more studies are needed to recognize the biotechnological properties of mushrooms and define their applications in the most diverse sectors of industries, not only in commercial mushroom species, but also in native species.

Based on the accomplished analyzes,, the characterization of the fibrinolytic enzymes present in mushrooms, it is considered necessary realize more studies to discover the biotechnological properties and to be able to better define their applications in the pharmaceutical products industry to assist in the treatment of thrombosis.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Graduate Program in Biotechnology at the Federal University of Amazonas (PPGIOTEC), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and FAPEAM for the funding, and the other collaborators who contributed to the development of this research. This work is part of a larger project entitled: "Basidiomycetes of the Amazon: investigation of species producing fibrinolytic enzymes, compounds inhibiting free radicals of the enzyme HMG-CoA reductase", which had its funding approved by FAPEAM in the call N°.006/2019-UNIVERSAL AMAZONAS-FAPEAM process N°. 062.00134/2020.

References

- Acosta, G. A., Fonseca, M. I., Fariña, J. I., & Zapata, P. D. (2022). Exploring Agaricomycetes from the Paranaense rainforest (Misiones, Argentina) as an unconventional source of fibrinolytic enzymes. *Mycologia*. 114(2):242-253. doi:10.1080/00275514.2022.2035148
- Aguilar, J. G., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262.

- Ali, A. M. M. et al. (2022). Production of fibrinolytic enzymes during food production. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, p. 157-187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823506-5.00018-7>
- Ali, A. M., and Bavisetty, S. C. B. (2020). Purification, physicochemical properties, and statistical optimization of fibrinolytic enzymes especially from fermented foods: a comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 163, p. 1498-1517.
- Ali, S. M., Ling, T. C., Sekaran, M., Y. S. T., Jegadeesh, R., & Vikineswary, S. (2014). Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology*, 122 359–366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.016>
- Altaf, F., Wu, S., & Kasim, V. (2021). Role of Fibrinolytic Enzymes in Anti-Thrombosis Therapy. *Front Mol Biosci*, May 28;8:680397. doi: 10.3389/fmolb.2021.680397.
- Ângelo, R. S. (2010). Enzimas hidrolíticas. In: Esposito, E.; Azevedo, João Lúcio de (Org.). *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, 2^a edição.
- Anna, D., Protopopova, R. I., Litvinov, D. K., Galanakis, C., Nagaswami, N. A., Barinov, A. R. Mukhitov, Dmitry V. Klinovd & John W. Weisel. (2017). Morphometric characterization of fibrinogen's α C regions and their role in fibrin self-assembly and molecular organization. *Nanoscale*. DOI: 10.1039/c7nr04413e
- Astrup, T., and Mullertz, S. (1952). The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys*; 40: 346–51p. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5)
- Bajaj, B. K., Singh, S., Khullar, M., Singh, K., & Bhardwaj, S. (2014). Optimization of fibrinolytic protease production from *Bacillus subtilis* I-2 using agro-residues. *Braz Arch Biol Technol* 57:653–662. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402132>
- Banerjee, G., & Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 119-143.
- Barbosa, E. E. P., Pimenta, L., Brito, A. K. P., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2020). Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases / Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 92475–92485. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-598>
- Benmrاد, O., M., Mechri, S., Zarái, J. N., & et al. (2019). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. *BMC Biotechnol* 19, 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0536-4>
- Bezerra, V. H. S., Cardoso, S. L., Fonseca-Bazzo, Y., Silveira, D., Magalhães, P. O., & Souza, P. M. (2021). Protease Produced by Endophytic Fungi: A Systematic Review. *Molecules*, 26 (22):7062. Published 2021 Nov 22. doi:10.3390/molecules26227062
- Bruto, A. K. P., Pimenta, L., Barbosa, E. E. P., Batista, S. C. P., Coelho, M. P. S. L. V., Castillo, T. A., Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Evaluation of tropical forest substrates for cultivation and production of proteases by *Pleurotus djamor*. *Research*,

Society and Development, [S. I.], v. 10, n. 3, p. e31810313385. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13385>

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

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., & Porto, A. L. F. (2022). Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 2, p. e13611225449, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i2.25449.

Cho, I. H., Choi, E. S., Lim, H. G., & Lee, H. H. (2004). Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. *J Biochem Mol Biol*, 37 (2):199-205. doi:10.5483/bmbrep.2004.37.2.199.

Choi, B. S., Sapkota, K., Choi, J. H., Shin, C. H., Kim, S., & Kim, S. J. (2013). Herinase: a novel bi-functional fibrinolytic protease from the monkey head mushroom, *Hericium erinaceum*. *Appl Biochem Biotechnol*, Jun; 170 (3):609-22. doi: 10.1007/s12010-013-0206-2. Epub 2013 Apr 7. PMID: 23564433.

Choi, J. H., Kim, D. W., Kim, S., & Kim, S. J. (2016). Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. *Prep Biochem Biotechnol*, Jul 3;47(6):539-546. doi: 10.1080/10826068.2016.1181083.

Coelho, M., Figueiredo, A. S. F., Martim, S. R. M., & Teixeira, M. F. S. T. (2022). Ciclo de produção de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos lignocelulósicos da fruticultura Amazônica: um estudo de caso. *Concilium*, 284–294. <https://doi.org/10.53660/CLM-116-138>

Das, G., and Prasad, M. P. (2010). Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *International Research Journals of Microbiology*, v. 1, n.2, p. 026-031, April.

Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, 459 (7245):371-378. doi:10.1038/nature08146

Fasim, A., More, Veena, S., & More, Sunil, S. (2021). Large-scale production of enzymes for biotechnology uses. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 69, p. 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.12.002>.

Feijoo-Siota, L., and Villa, T. G. (2011). Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. *Food Bioprocess Technol*, 4:1066–1088., v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011. DOI 10.1007/s11947-010-0431-4

Ferreira, C. N., Sousa, M. O., Dusse, L. M. S., & Carvalho, M. G. (2010). O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 32, n. 5, p. 416-421. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842010000500016>

Flute, P. T. (1964). Haemorrhage and fibrinolysis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 57(7), 603–606.

- Fonseca, T. R. B. (2013). *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: Avaliação do Crescimento, Produção de Basidioma e Determinação da Atividade Proteolítica em Resíduos Agroindustriais. Universidade Federal do Amazonas.
- Galo, L. A., and Colombo, M. F. (2009). Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. *Química Nova*, 32 (2), 488-492. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200036>
- Katrolia, P., Liu, X., Zhao, Y., Kopparapu, N. K., & Zheng, X. (2020). Gene cloning, expression and homology modeling of first fibrinolytic enzyme from mushroom (*Cordyceps militaris*). *Int J Biol Macromol*, 146:897-906. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.09.212
- Kollman, J. M., Pandi, L., Sawaya, M. R., Riley, M., & Doolittle, R. F. (2009). Crystal structure of human fibrinogen. *Biochemistry*, 48(18):3877-3886. doi:10.1021/bi802205g
- Li, G., Liu, X., Cong, S., Deng, Y., & Zheng, X. (2021). A novel serine protease with anticoagulant and fibrinolytic activities from the fruiting bodies of mushroom *Agrocybe aegerita*. *Int J Biol Macromol*, 168:631-639. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.11.118
- Liu, X. L., Zheng, X. Q., Qian, P. Z., Kopparapu, N. K., Deng, Y. P., Nonaka, M., & Harada, N. (2014). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus*. *J Microbiol Biotechnol*, Feb 28;24(2):245-53. doi: 10.4014/jmb.1307.07063.
- Liu, X. L., Zheng, X. Q., & Zhang, J. K. (2012). Production of a Fibrinolytic Enzyme from *Coprinus comatus* YY-20. *Applied Mechanics and Materials*, Vols. 138–139, pp. 1195–1201. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.138-139.1195>
- Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., Kirsch, L. S. M., Campelo, C. L. & Oliveira, I. M. A. (2016). Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5): 621-627. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>
- Mander, P., Cho, S. S., Simkhada, J. R., Choi, Y. H., & Yoo, J. C. (2011). A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 1449–1455. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.03.016>
- Mine, Y., Wong, A. H. K., & Jinag, B. (2005). Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. *Food Research International*, 38:243–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.008>
- Moon, S. M., Kim, J. S., Kim, H. J., Choi, M. S., Park, B. R., Kim, S. G., Ahn, H., Chun, H. S., Shin, Y. K., Kim, J. J., Kim, D. K., Lee, S. Y., Seo, Y. W., Kim, Y. H., & Kim, C. S. (2014). Purification and characterization of a novel fibrinolytic α chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. *J Biosci Bioeng*, May;117(5):544-50. doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.10.019.
- Naeem, M., Manzoor, S., Abid, M. U. H., Tareen, M. B. K., Asad, M., Mushtaq, S., Ehsan, N., Amna, D., Xu, B., & Hazafa, A. (2022). Fungal Proteases as Emerging Biocatalysts to Meet the Current Challenges and Recent Developments in Biomedical Therapies: An Updated Review. *J. Fungi*, 8, 109. <https://doi.org/10.3390/jof8020109>

- Pechik, I., Yakovlev, S., Mosesson, M. W., Gilliland, G. L., & Medved, L. (2006). Structural basis for sequential cleavage of fibrinopeptides upon fibrin assembly. *Biochemistry*, Mar 21;45 (11):3588-97. doi: 10.1021/bi0525369. PMID: 16533041; PMCID: PMC2531209.
- Pimenta, L., Barbosa, E. E. P., Brito, A. K. P. de, Martim, S. R., & Teixeira, M. F. S. (2021). Processo eco-amigável para selecionar substrato Lignocelulósico para produção de peptidases ácidas / Eco-friendly process to select Lignocellulosic substrate for the production of acid peptidases. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 3469–3479. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-234>
- Ruiz, M. A., Greco, O. T., Braile, D. M. (2009). Fator de impacto: importância e influência no meio editorial, acadêmico e científico. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 24(3): 273-278. <https://doi.org/10.1590/S0102-76382009000400004>
- Shafee, T. (2014). *Evolvability of a Viral Protease: Experimental Evolution of Catalysis, Robustness and Specificity*. University of Cambridge: Cambridge, UK.
- Sharma, C., Osmolovskiy, A., & Singh, R. (2021). Microbial Fibrinolytic Enzymes as Anti-Thrombotics: Production, Characterisation and Prodigious Biopharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*. 2021;13 (11):1880. Published Nov 5. doi:10.3390/pharmaceutics13111880
- Sharma, M., and Bajaj, B. K. (2017). Optimization of bioprocess variables for production of a thermostable and wide range pH stable carboxymethyl cellulase from *Bacillus subtilis* MS 54 under solid state fermentation. *Environ Prog Sustain Energy*. doi:10.1002/ep.12557
- Souza, H. Q. et al. (2008). Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, pg. 116-124, Campinas, SP.
- Strehl, L. (2005). O fator de impacto do ISI e a avaliação da produção científica: aspectos conceituais e metodológicos. *Ci. Inf.*, Brasília, v. 34, n. 1, p.19-27. Disponível: <https://wp.scielo.org/wp-content/uploads/STREHL-L..pdf>
- Wang, J., Wu, C., Chen, Y., Chen, C., Hu, S., & Chang, S. (2014). Antihyperglycemic activity of exopolysaccharide produced by mushroom *Pleurotus ferulae* with submerged liquid culture on streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 2, n. 7, p. 419-424.
- Weisel, J. W., and Litvinov, R. I. (2017). Fibrin Formation, Structure and Properties. *Subcell Biochem*, 82: 405–456. doi:10.1007/978-3-319-49674-0_13
- Wu, S. et al. (2021). Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 60,88–119. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS DO COGUMELO OSTRAREI POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Romário da Silva Santana; Samara Claudia Picanço Batista; Enedina Nogueira de Assunção; Salomão Rocha Martim; Maria Francisca Simas Teixeira; Waldireny Rocha Gomes; Rosany Piccolotto Carvalho

Revista: Concilium

Aceito: 25/10/2022 | Publicado: 03/11/2022

Doi: <https://doi.org/10.53660/CLM-573-650>

Resumo

As proteases são biocatalisadores com funções fisiológicas complexas, presentes em todos os seres vivos que predominam em processos biotecnológicos nos diversos segmentos da indústria. Das fontes naturais de protease, espécies de *Pleurotus* sintetizam compostos bioativos de interesse industrial, inclusive enzimas proteolíticas. Neste estudo foi investigada a produção e caracterização parcial de proteases de *P. eryngii* DPUA 1816 para futura aplicação industrial. A fermentação foi realizada em extrato de Malte ou Sabouraud + extrato de levedura 0,5% (p/v), por sete dias, a 28 °C, 150 rpm. Nos extratos recuperados foi determinada atividade qualitativa de proteases e avaliado o efeito do pH, temperatura, íons e inibidores na atividade e estabilidade enzimática. Os resultados mostraram que, nas condições experimentais a atividade de proteases de *P. eryngii* foi 22,70 U/mL, com atividade ótima em pH 5,0, a 40 °C, com estabilidade na faixa de 40 °C a 80 °C. Os íons Mn²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ e K⁺ aumentaram a atividade das enzimas em 85%, 84%, 40%, e 31%, respectivamente. Porém, Fe²⁺ e Cu²⁺ reduziram ação catalítica em 38% e 37%, respectivamente. O EDTA e o PMSF causaram inibição de 96% e 95,10%, respectivamente. Com base nesses resultados foi observada a presença de metaloproteases e serinoproteases, enzimas que tem importância industrial para elaboração de laticínios e fármacos.

Palavras-chave: *Pleurotus*; Bioprocesso; Cogumelo comestível; Estabilidade; Biocatalisadores

INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que hidrolisam substratos proteicos em peptídeos e aminoácidos, atuam em diversos processos biológicos essenciais para a manutenção das condições fisiológicas dos seres vivo, como sinalizador celular, construção de incontáveis moléculas, fixação de nitrogênio e na biossíntese de uma diversidade de metabólitos (OLIVEIRA e MANTOVANI; 2009; BENMRAD *et al.*, 2019).

As enzimas proteolíticas ou peptidases são classificadas com base nas seguintes propriedades: mecanismo de ação, exo e endopeptidases; o pH ótimo (ácidas, neutras e básicas); íons metálicos e aminoácidos do sítio ativo (serinoproteases, cisteinoproteases, metaloproteases, aspartatoproteases, teoninoproteases e glutaminoproteases (INÁCIO *et al.*, 2015; MRTIM *et al.*, 2015; MARTIM *et al.*, 2017).

De acordo com as características das proteases, tais enzimas são comumente utilizadas em diferentes setores industriais, na formulação de alimentos, medicamentos, produtos de limpeza e de cosmético, em processos de recuperação ambiental. Devido à demanda comercial, o mercado de proteases está em expansão crescente, correspondendo a 70% do mercado industrial global de biocatalisadores (MARTIM *et al.*, 2017; MAGALHÃES *et al.*, 2019; RAZZAQ *et al.*, 2019).

Em função da importância industrial e eficiência da diversidade de fungos, inúmeras espécies desses organismos são analisadas e confirmadas como produtores de proteases, contudo predominam nos processos biotecnológicos os representantes do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium* e *Pleurotus* (CAMPOS *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2020; PIMENTA *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2021).

Espécies de *Pleurotus* são cogumelos comestíveis, valiosas fontes de nutrientes e fibras que, em diferentes condições de cultivo produzem compostos bioativos, incluindo proteases, enzimas de valor econômico e com aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica e ambiental (COELHO *et al.*, 2022). Na indústria de alimentos comumente são usadas na fabricação de laticínios, bebidas, produtos de panificação, cosméticos e fármacos (LIU *et al.*, 2014; CHOI *et al.*, 2017; BENMRAD *et al.*, 2019)

Dada a importância de espécies de *Pleurotus* como fonte de compostos bioativos, neste estudo foi avaliada a produção e caracterização de proteases do

cogumelo *P. eryngii* DPUA 1816, conhecido como Shimeje Rei, para posterior aplicação industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Cogumelo

Nesta pesquisa no bioprocesso foi utilizado *Pleurotus eryngii* DPUA 1816, espécie cedida do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para obtenção de culturas viáveis, o cogumelo foi inoculado em ágar batata dextrose (BDA) 0,5% de extrato de levedura (p/v) (MAGALHÃES *et al.*, 2019). As culturas foram mantidas a 25 °C, na ausência de luz. Após oito dias, dessas culturas foram retirados discos miceliais e transferidos para o meio de fermentação (BARBOSA *et al.*, 2020)

Seleção do meio de cultivo para produção de proteases por fermentação submersa

Para seleção dos meios na síntese de proteases, cinco discos miceliais (Ø5 mm) foram inoculados em frascos Erlenmeyer (125 mL). O preparo do cultivo procedeu utilizando 50 mL de extrato de Malte ou Sabouraud + extrato de levedura 0,5% (p/v). A fermentação foi conduzida a 28°C, a 150 rpm, durante sete dias. Em seguida, o extrato bruto foi recuperado por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman n. 1 e, em membrana polietersulfônica com porosidade de 0,22 µm (PRADO *et al.*, 2021).

Determinação de atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada por Leighton *et al.* (1973) utilizando como substrato solução de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl (pH 7,2). Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 durante 60 minutos, a 440 nm. As proteases do extrato com atividade significativa foram submetidas à caracterização bioquímica.

Caracterização bioquímica das proteases

Efeito do pH na atividade e estabilidade proteolítica

Para avaliar o pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada em 25°C, utilizando as seguintes soluções tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10), durante uma hora. Na avaliação da estabilidade ao pH, o extrato enzimático foi diluído em cada tampão (1:1, v/v), a 25°C,

por uma hora, seguido da determinação da atividade de proteases e as análises foram determinadas em triplica e o resultados expressos em atividade relativa (BATISTA *et al.*, 2021).

Efeito da temperatura na atividade e estabilidade proteolítica

Para determinar o efeito da temperatura na atividade o extrato enzimático e a solução de azocaseína 1% (p/v) foram incubados na faixa de 30°C a 80°C, durante uma hora. No ensaio de estabilidade à temperatura, os extratos foram incubados em temperaturas de 30 a 80 °C, por uma hora. Em seguida, foi determinada a atividade proteolítica. As análises foram realizadas em triplica e o resultados expressos em atividade relativa (BATISTA *et al.*, 2021).

Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica

O efeito de inibidores e íons metálicos na atividade enzimática foi determinado de acordo com o método descrito por Brito *et al.* (2019). Como inibidores foram utilizadas as seguintes soluções (10 mM): fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido iodoacético e pepstatina A (0,1 mM), na mistura reacionl. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional, foram CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. Os extratos enzimáticos foram incubados nas condições ótimas de pH e de temperatura durante uma hora. A atividade enzimática residual foi comparada ao controle incubado sem os inibidores e os íons metálicos, correspondendo a 100% de atividade.

Análise Estatística

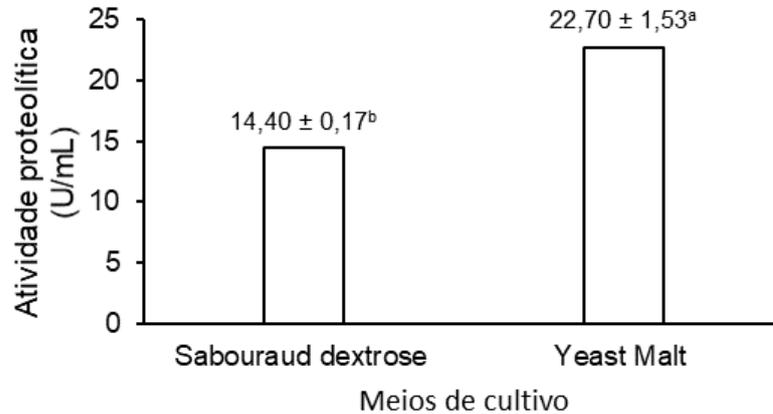
Os valores dos experimentos foram obtidos de testes em triplicatas, e estes, submetidos à análise de variância com as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Minitab, versão 19.0 (MINITAB, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃOS

Nas condições avaliadas, *P. eryngii* DPUA 1816 sintetizou proteases em todos os meios de cultivo. No entanto, quantidade significativa (22,70 U/mL) foi verificada no meio extrato de malte, sendo esse valor 36,56% superior aos obtidos em extrato de Sabouraud (Figura 1). Bano, Dahot e Naqvi (2021) determinaram atividade proteásica de 0,55 U/mL para *P. eryngii*, sendo esse resultado inferior aos determinados no presente estudo. Martim *et al.* (2017) e Barbosa *et al.* (2020) constataram atividade proteolítica de 34 U/mL e 26,53 U/mL para *P. albidus* e *P. ostreatoroseus*, respectivamente. Brito *et al.* (2019) citaram que a síntese de

proteases é influenciada pela composição nutricional do meio de cultivo, pH, temperatura, luminosidade e oxigenação.

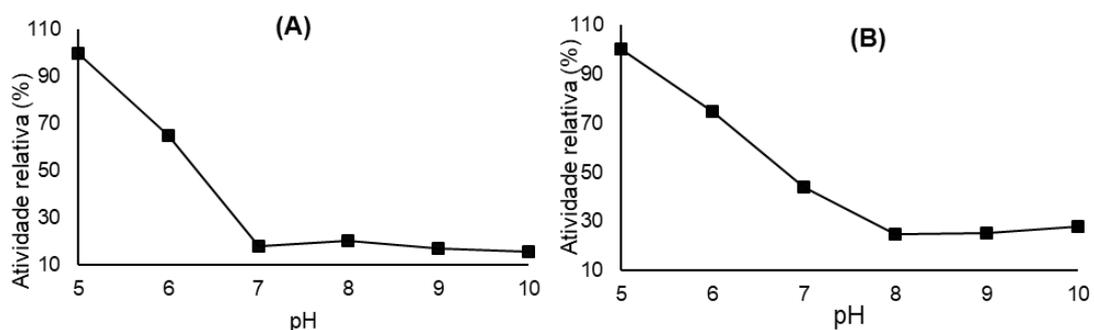
Figura 1. Influência dos meios de cultivo na atividade proteolítica de *P. eryngii* DPUA 1816.



Fonte: Autores (2022).

O meio extrato de malte estimulou a síntese expressiva de enzimas proteolíticas por *P. eryngii* DPUA 1816 e, por isso, as proteases contidas no extrato obtido deste meio foram submetidas à caracterização bioquímica. Nesta análise, a ação catalítica significativa foi determinada em pH 5,0, demonstrando que *P. eryngii* DPUA 1816 sintetiza proteases ácidas (Figura 2). Resultado similar foi reportado por Martim et al. (2017) e Barbosa et al. (2020). Entretanto, Benmrada et al. (2019) verificaram que *Pleurotus sajor-caju* expressam proteases alcalinas com atividade catalítica significativa em pH 9,5, dado que difere dos encontrados no presente estudo. Razzaq et al. (2019) citaram que proteases ácidas têm ampla aplicação na área de alimentos, sendo usadas comumente para a elaboração de molho vegetais, hidrolisados proteicos e temperos. Martim et al. (2015) utilizaram proteases de *P. albidus* com atividade ótima em pH 5,0 para formulação de queijo tipo Minas frescal.

Figura 2. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *P. eryngii* DPUA 1816.

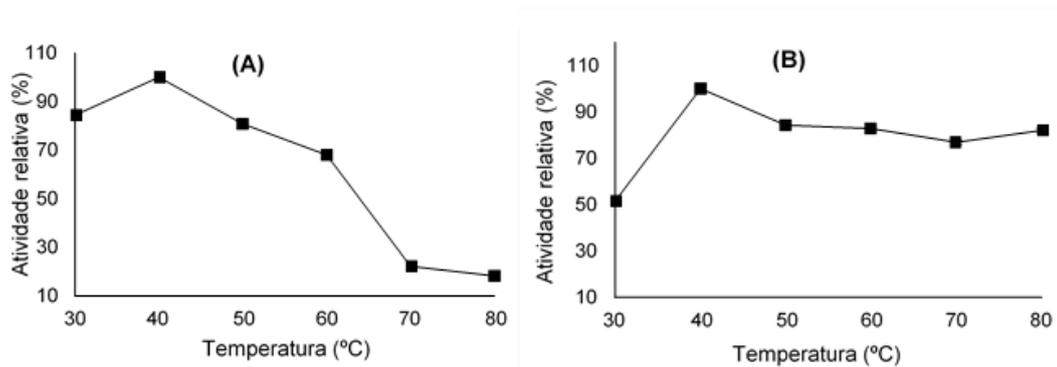


Fonte: Autores (2022).

Quanto à estabilidade ao pH, as proteases mantiveram atividade catalítica superior a 50% na faixa de pH 5,0 a 6,0 (Figura 2). Na literatura científica foi demonstrado que a estabilidade de proteases sintetizada por *Pleurotus* varia de acordo com a espécie e o bioprocesso. Machado *et al.* (2017) verificaram que enzimas proteolíticas de *P. ostreatoroseus* cultivado por fermentação no estado sólido, em tubérculos de *Dioscorea alata*, mantiveram estabilidade na faixa de pH 7 a 8. Por outro lado, as proteases de *P. albidus* cultivado em meio líquido GYP (Glicose-Extrato de levedura-Peptona) permaneceram ativas em pH 5 a 10.

Nos testes de avaliação da temperatura ótima, a enzima demonstrou atividade significativa a 40°C, com redução de ação catalítica nas temperaturas superiores (Figura 3). Resultado similar foi reportado por Machado *et al.* (2017) e Barbosa *et al.* (2020), para as proteases de *P. ostreatoroseus*. Liu *et al.* (2015) verificaram que as proteases de *P. ostreatus* atuam em condições significativas de atividade a 45 °C.

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *P. eryngii* DPUA 1816.



Fonte: Autores (2022).

Em relação à estabilidade térmica, as proteases mantiveram atividade superior a 77% na faixa de 40°C a 80°C, resultado que demonstra a alta capacidade dos biocatalisadores proteolíticos sintetizados *P. eryngii* DPUA 1816 se manterem ativos em amplas faixas de temperatura (Figura 3). Liu *et al.* (2015) constataram a estabilidade das proteases de *P. ostreatus* na faixa de 23°C a 45°C. Machado *et al.* (2017) verificaram que as enzimas proteolíticas de *P. ostreatoroseus* se mantiveram estáveis entre 25 °C a 50 °C. Benmrاد *et al.* (2019) constataram que as proteases de *P. sajor-caju* possuem estabilidade em temperaturas de 80°C a 100 °C. Awad *et al.* (2013) citaram que a estabilidade térmica é uma vantagem importante em processos fermentativos para obtenção de diferentes bioprodutos. Jisha *et al.* (2013) também

relataram que proteases ativas em temperaturas de 40 a 70°C têm aplicação em diversos segmentos industriais, inclusive na formulação de fármacos e alimentos.

Os estudos bioquímicos de inibição enzimática são importantes para fornecer dados referentes à natureza da enzima, funcionamento do centro ativo e necessidade de cofatores (Awad *et al.*, 2013). A tabela 1 demonstra o efeito dos íons metálicos e inibidores na atividade proteolítica de *P. eryngii* DPUA 1816. Nas condições avaliadas foi observado que os íons Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} e K^+ estimularam a ação catalítica em 85%, 84%, 40%, e 31%, respectivamente. Entretanto, Fe^{2+} e Cu^{2+} causaram a redução da atividade enzimática em 38% e 37%, respectivamente. Benmrad *et al.* (2019) verificam aumento de 170% e 9% na atividade proteolítica de *P. sajor-caju* na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} , respectivamente. Martim *et al.* (2017) constataram que os íons Mn^{2+} incrementaram em 16% a atividade das proteases de *P. albidus*. Barbosa *et al.* (2020) observaram redução de 100% e 57,13% na ação catalítica das proteases de *P. ostreatoroseus* na presença de Fe^{2+} e Cu^{2+} , respectivamente.

Tabela 1. Efeito dos íons metálicos e inibidores na atividade das proteases de *P. eryngii* DPUA 1816.

| Íons metálicos e inibidores | Atividade relativa (%) |
|-----------------------------|------------------------|
| Controle | 100 |
| Mn^{2+} | 185 |
| Mg^{2+} | 140 |
| Na^+ | 75 |
| Zn^{2+} | 184 |
| K^+ | 131 |
| Ca^{2+} | 94 |
| Cu^{2+} | 63 |
| Fe^{2+} | 62 |
| Ácido Iodoacético | 11,4 |
| EDTA | 4,0 |
| PMSF | 4,9 |
| Pepstatina A | 16,5 |

Fonte: Autores (2022).

Em relação ao efeito de inibidores na atividade proteolítica foi verificada inibição expressiva de 96% e 95,10% na presença de EDTA e PMSF, respectivamente. Estes resultados sugerem a presença majoritária de metaloproteases e serinoproteases no extrato bruto de *P. eryngii* DPUA 1816. Choi *et al.* (2017) também verificaram a produção significativa de metaloproteases por *Pleurotus ferulae*. Martim *et al.* (2017) e Barbosa *et al.* (2020) constataram a síntese de serinoproteases por *P. albidus* e *P. ostreatoroseus*.

CONCLUSÃO

Pleurotus eryngii 1816 sintetiza enzimas proteolíticas em condições de cultivo submerso. Em extrato de malte há produção significativa de proteases ácidas, termoestáveis, do tipo de metaloproteases e serinoproteases. Esses biocatalisadores têm potencial para uso no setor alimentício e de medicamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia da UFAM/DPUA. Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –CAPES. Aos colegas colaboradores Mestres e Doutores.

REFERÊNCIAS

- AWAD, Sameh; AHMED, Nour Elhoda; SODA, Morsi El. Application of Salt Whey from Egyptian Ras Cheese in Processed Cheese Making. **Food and Nutrition Sciences**, 4, 79-86, 2013. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.49A2011>
- BANO, S., UMAR, Muhammad Dahot, & NAQVI, S.H.A.. OPTIMIZATION OF CULTURE CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF PROTEASE BY *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology**, 13(3), 193–198, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34016/pjbt.2020.17.2.115>
- BARBOSA, Elliza Emily Perrone; PIMENTA, Laynah; BRITO, Ana Kézia Pimentel de; MARTIM, Salomão Rocha; e TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 11, p.92475-92485, nov. 2020. DOI:10.34117/bjdv6n11-598
- BATISTA, S. C. P.; PRADO, F. B.; BRITO, A. K. P.; COELHO, M. P. S. DE L. V.; CASTILLO, T. A.; MARTIM, S. R.; & TEIXEIRA, M. F. S. Residual biomass from Amazon's horticultural residues processing for mycelial growth and production of proteases by an edible mushroom species. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. 2021. <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/13393>.
- BENMRAD, OMRANE M., MECHRI, S., ZARAÏ JAOUADI, N. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnol** 19, 43, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0536-4>
- BRITO, E. C., BRAGA, R., TEIXEIRA, M. F., & MARTIM, S. 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**, 14(3), 463-472, 2019. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.232>
- CAMPOS, C; DIAS, D. C; VALLE, J. S; COLAUTO, N. B; LINDE, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 19-24, jan./jun. 2011.
- CHOI, Jun-Hui; KIM, Dae-Won; KIM, Seung; KIM, Sung-Jun. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, Volume 47, 2017. <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1181083>

COELHO, M.; FIGUEIREDO, A. S. F.; MARTIM, S. R. M., & TEIXEIRA, M. F. S. T. Ciclo de produção de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos lignocelulósicos da fruticultura Amazônica: um estudo de caso. **Revista Concilium**, Vol. 22, Nº 2 284–294, 2022. <https://doi.org/10.53660/CLM-116-138>

INÁCIO, F. D., FERREIRA, R. O., DE ARAUJO, C. A., BRUGNARI, T., CASTOLDI, R., PERALTA, R. M., & DE SOUZA, C. G. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. **BioMed research international**, 290161, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/290161>

JISHA, N., V., B. SMITHA, R., PRADEEP, S., SREEDEVI, S., N. UNNI, K., SAJITH, S., Priji, P., SARATH-JOSH, M. & BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, 1, 39-51, 2013. doi: [10.4236/aer.2013.13005](https://doi.org/10.4236/aer.2013.13005).

LIU, X. L., ZHENG, X. Q., QIAN, P. Z., KOPPARAPU, N. K., DENG, Y. P., NONAKA, M., & HARADA, N. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from culture supernatant of *Pleurotus ostreatus*. **Journal of microbiology and biotechnology**, 24 (2), 245–253, 2014. <https://doi.org/10.4014/jmb.1307.07063>

MACHADO, A.R.G. et al. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**. v.16, n.46, p: 2160-2166. 2017.

MAGALHÃES, A. S.; SILVA, T., TEIXEIRA, M. F., CRUZ FILHO, R., DA SILVA, S., GOMES, D. M., & PEREIRA, J. bioma amazônico (Polyporaceae). Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi - **Ciências Naturais**, 14(3), 453-462, 2019. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.231>

MARTIM, S. R. et al. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 17, p. 660-667. DOI: 10.5897/AJMR2017.8520. 2017.

MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, R. A.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; CRUZ-FILHO, R. F.; & TEIXEIRA, M. F. S. Extração líquido-líquido de proteases de *Pleurotus albidus* (DPUA 1692) empregando sistema de duas fases aquosas (peg-fosfato). In: **Diversidade Microbiana da Amazônia**. Oliveira et al. (Org.). Editora INPA, 2015.

Minitab Statistical Software. LEAD Technologies, Inc. **Version 19.0. MYANT**, N. Cholesterol gallstones; plasma cholesterol in liver disease, *Biol. Cholesterol Related Steroids*. 853–887, 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-433-22880-6.50025-4>.

OLIVEIRA, Luciana Gonzaga de; MANTOVANI, Simone Moraes. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 742-756, 2009.

PIMENTA, Laynah; BARBOSA, Elliza Emily Perrone; BRITO, Ana Kézia Pimentel de; MARTIM, Salomão Rocha; TEIXEIRA, Maria Francisca Simas. Eco-friendly process to select Lignocellulosic substrate for the production of acid peptidases. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.3469-3479 Jan. 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n1-234.

PRADO, F. B.; BATISTA, S. C. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, & M. F. S. Feasibility of protease production by aspergillaceae species and screening of coagulants from

bovine milk. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.2, p. 16356-16373, 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-317>

RAZZAQ, Abdul; SADIA, Shamsi; ARFAN, Ali; QURBAN, Ali; MUHAMMAD, Sajjad; ARIF, Malik; & MUHAMMAD, Ashraf. Microbial Proteases Applications. **Front. Bioeng. Biotechnol**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CITOTÓXICA E PRÉ-PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS
PROTEOLÍTICAS COM AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE EXTRATOS OBTIDOS POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE COGUMELOS COMESTÍVEIS**

Romário da Silva Santana; Felipe de Souza Mendes; Bárbara Janaína Paula da
Silva; Emerson Silva Lima; Thiago Pajeú Nascimento; Márcia Nieves Carneiro da
Cunha; Ana Lúcia Figueiredo Porto; Maria Francisca Simas Teixeira; Waldireny
Rocha Gomes; Rosany Piccolotto Carvalho

Revista: Regulatory Toxicology and Pharmacology

Aceito:

Doi:

Resumo

Nos últimos tempos, o consumo de cogumelos vem aumentando em função dos inúmeros benefícios que geram a saúde humana. Nisso, as biomoléculas produzidas por esses organismos, refletem na melhoria da qualidade de vida. As enzimas proteolíticas com ação fibrinolíticas estão presentes em diversos micro e macro-organismos, e sua produção podem ser obtidas por meio de processos fermentativos. Nesse contexto, a presente pesquisa teve como objetivo, realizar testes antioxidantes, citotóxico e recuperação da enzima do extrato bruto de duas espécies de cogumelos comestíveis por sistema bifásico aquoso. Os cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*, na concentração de 100 µg/mL, apresentaram inibição inferior a 50%, nos ensaios de DPPH e ABTS, e no teste de citotoxicidade, apresentaram viabilidade celular superior a 80%. Nas condições testadas, *P. eryngii* apresentou 1552,8 ± 91,6 (U/mL) de protease e desta, 226,47 ± 7,26 (U/mL) teve ação fibrinolítica, sendo mais eficiente que o *P. ostreatus*. Na recuperação do extrato de *P. eryngii*, por sistema bifásico aquoso, parte das proteínas sintetizadas por ele interagiram na fase PEG, porém, como condição ótima, o efeito simultâneo da protease fibrinolítica revelou ter maior afinidade com a fase rica em sal, onde atividade fibrinolítica do fator de purificação foi de 30,25 (U/mL). A massa molecular referente à protease de *P. eryngii* do extrato das fases SAL e PEG, ficou entre 75 a 100 kDa. Considerando as potenciais aplicações de proteases fibrinolíticas, no uso terapêutico para o tratamento de doenças trombolíticas este estudo apresenta dados promissores para a doença como alternativa terapêutica no tratamento.

Palavras-chave: Enzimas; Cogumelos comestíveis; Terapias trombolíticas.

1 Introdução

Nos últimos tempos, o consumo de cogumelos vem aumentando em função dos inúmeros benefícios que geram a saúde (Condé et al., 2016), mas estudos recentes comprovam sua eficácia através da caracterização de enzimas presentes em cogumelos, com potencial de uso em diversos setores do mercado industrial farmacêutico (Santana et al., 2022).

Estas enzimas refletem benefícios para melhorar a qualidade da vida humana, como fonte alimentar, principalmente na composição nutricional de suplementos dietéticos e medicamentos (Jakopovich, 2011; Ribeiro et al., 2015). Tais benefícios, hoje são comprovados através de testes antioxidantes e citotóxicas, fornecendo assim, maior espectro quanto aos metabólitos secundários presentes em extratos fungicos (Duarte, 2014).

Os basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, possuem um forte destaque comercial, este grupo, compreende cerca de 40 espécies, pertencem a família *Pleurotaceae* e se desenvolvem em regiões temperadas, zonas tropicais e subtropicais no mundo (Jose e Janardhanan, 2000; Kong, 2004).

Seu basidioma normalmente é grande e carnoso, podendo ter coloração que varia entre azul-escuro, cinza-escuro, branco, creme, marrom, amarelo e rosa ou salmão (Pimenta, 2018), conhecidos popularmente como cogumelos-ostra, Shimeji branco/preto, Hiratake (Ishikawa et al., 2017).

Dados na literatura, reportam diversos estudos *in vitro*, utilizando o basidioma deste gênero, onde se comprovam a presença de vários nutrientes essenciais, incluindo fibras dietéticas, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais com propriedades medicinais agindo como antibactericidas, atividades antivirais, hematológicas, hipocolesterolêmicas, antitumoral e imunomoduladora (Singh et al., 2011; Venturella e Gargano, 2017).

Diante disso, a presente pesquisa teve como objetivo principal, realizar testes antioxidantes, citotóxico e recuperação da enzima do extrato bruto de duas espécies de cogumelos comestíveis por sistema bifásico aquoso.

2 Material e Métodos

2.1 Obtenção do cogumelo e preparação do extrato

Os cogumelos: *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 e *P. eryngii* DPUA 1816, foram obtidos da coleção de culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade

Federal do Amazonas-UFAM (DPUA), certificado na gestão de documentos com base na NBR ISSO 9001:2015. As culturas foram reativadas sob meio de cultura sólida contendo ágar batata dextrose (BDA) e 0,5% (p/v) de extrato de levedura (Magalhães et al., 2019) e incubadas a 25 °C, na ausência de luz, por oito dias (Kirsch et al., 2011) até se obter pureza das colônias e viabilidade para posteriores testes.

A obtenção dos extratos consistiu utilizando cinco fragmentos miceliais de 5 mm e inoculados em 50 mL, sob duas condições de meios para crescimento: Yast Malt (YM); e Sabouraud Dextrose +Extrato de levedura (SB+YE), e fermentados durante sete dias, sob temperatura 28°C, a 150 rpm (Teixeira, 2021; Martim et al., 2017). Após isso, realizou-se a recuperação dos extratos brutos, separando os pellets por filtração a vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1 e membrana polietersulfônica de 0,22 µm (Prado et al., 2021), em câmara de fluxo laminar, liofilizado e armazenados em geladeira (4,6°C) para posteriores análises.

2.2 Determinação de Atividade Antioxidante e Citotóxica.

Para se detectar a presença de compostos antioxidantes, dos extratos fungicos, foram testados em dois métodos; por DPPH (Molyneux, 2004) e por ABTS (Re et al., 1999). O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme a metodologia de Ahmed et al., (1994) com o intuito de analisar a viabilidade celular em células da linhagem MRC-5 (fibroblastos) após exposição com os extratos por 24 horas.

2.3 Caracterização bioquímica por Sistema bifásico aquoso (SAB)

2.3.1 Pre-purificação por sistemas de duas fases aquosas (SAB)

Para este ensaio, considerou-se critérios realizado por Silva et al. (2020). Baseado no planejamento fatorial, foram preparados 12 sistemas em tubos graduados (15mL), contendo: PEG em diferentes concentrações de massas molares (4000, 6000 e 8000 g/mol); de sulfato de sódio- Na_2SO_4 ; água destilada; e 2,0 g de amostra, obtendo o peso final de 10 g a 37°C. Após a mistura em cada sistema, agitou-se em vortex durante 1 minuto, até dissolver o PEG e o Sal. A formação das fases superior e inferior, foram obtidas em 60 minutos, pequenas alíquotas foram extraídas separadamente com pipetas e analisadas para a concentração de proteína, atividade proteásica e fibrinolítica.

Para os parâmetros referentes as variáveis resposta, considerou-se método proposto por Nascimento et al. (2016). Onde foram determinadas mediante equações: coeficiente de partição (K), fator de purificação (FP) e recuperação (Y):

$$\text{Equação 1: } K = \frac{FPEG}{FSAL} \quad \text{Equação 2: } FP = \frac{AEPEG}{AESAL} \quad \text{Equação 3: } Y = \left(\frac{AEPEG}{VPEG} \text{ OU } \frac{AFSAL}{VSAL} \right) \frac{1}{AEbruto V inicial} \times 100$$

Equação 1: Fibrinolítica na fase superior (FPEG) e fase inferior (FSAL); Equação 2: Atividade Específica da protease fibrinolítica fase PEG (AEPEG) ou sal (AESAL) sobre a atividade específica do extrato bruto (AEbruto) expressas em mg/mL; Equação 3: AFPEG ou AFSAL sobre seu respectivo volume (VPEG) ou (VSAL), sobre a atividade fibrinolítica presente no extrato bruto (AFbruto) do valor inicial (V inicial).

Para permitir a estimativa de erro experimental, realizou-se um planejamento fatorial para a seleção preliminar da purificação, proposto por Neto et al. (2002) para verificar a influência das variáveis respostas.

2.3.2 Teor de proteínas totais

A concentração relativa de proteínas dos extratos foi estimada de acordo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando o azul brilhante de Coomassie G-250 e albumina do Soro Bovino (BSA) como padrão. Os testes foram realizados em triplicatas, as absorbâncias lidas a 595 nm.

2.3.3 Determinação de atividade proteolítica e fibrinolítica

A atividade proteolítica foi determinada por Leighton et al. (1973) utilizando como substrato solução de azocaseína 1% (p/v), preparada em tampão Tris-HCl (pH 7,2). Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 durante 60 minutos, e absorbâncias lidas a 440 nm.

A atividade fibrinolítica foi determinada através da realização de um trombo artificial, consiste de um método quantitativo in vitro seguindo protocolo proposto por Astrup e Mullertz (1952) e a capacidade de dissolução do coágulo pelas enzimas fibrinolíticas presentes nos extratos foi quantificada em espectrofotométrico a 275 nm (Wang et al., 2014).

2.3.4 Precipitação da proteína

A precipitação do extrato bruto foi realizando conforme Wessel e Flüggé (1984), usando solução de Acetona e TCA 10%. A mistura foi incubada em gelo por duas horas, seguida de centrifugação por 15 minutos a 10.000g. Os sobrenadantes foram removidos e os pellets secos para análise em gel de eletroforese.

2.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A amostra foi analisada de acordo Ali et al. (2014), usando SDS-PAGE com gel de acrilamida composto de 12% de gel de resolução e 4,5% de gel de empilhamento. Os pellets obtidos do item 2.2.3, foram misturados em água Ultra-pura contendo

solução de 1,5 M de Tris-HCl (pH8,8), 30% acrilamida mix, de glicerol, 10% SDS, 10% de ammonium persulfate, TEMED (2-mercaptoetanol) e bromofenol azul.

2.4 Análises estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm D.P.M. (Desvio Padrão da Média). Todos os ensaios in vitro foram realizados em triplicata biológica, e analisados estatisticamente, usando o software GraphPad Prism 6. Os ensaios foram analisados pelo teste de comparações múltiplas e a análise de variância (Anova) para comparação entre os grupos. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

3.1 Análises Antioxidantes e Citotóxicos do extrato bruto

O potencial antioxidante dos extratos obtidos por fermentação submersa para os cogumelos *P. ostreatus* e *P. eryngii*, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, todos apresentaram inibição inferior a 50%, nos ensaios de DPPH e ABTS.

Os valores obtidos da capacidade antioxidante foram, para *P. ostreatus* cultivado em meio SB+YE, apresentou mais 14% de inibição do radical em ABTS e mais de 6% do radical em DPPH. Para *P. eryngii* cultivados em YM, o percentual de inibição do radical em ABTS foi mais de 12% e mais 6% do radical em DPPH (Tabela 01).

Tabela 01: Avaliação do percentual de atividade antioxidante do radical em ABTS e DPPH dos extratos dos cogumelos comestíveis.

| SUBSTÂNCIA PADRÃO EXTRATOS | CONCENTRAÇÃO ($\mu\text{g/mL}$) | DPPH % | ABTS % |
|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Ácido gálico | 100 | 78,91 \pm 0,00 ^B | 96,17 \pm 0,00 ^B |
| <i>P. ostreatus</i> DPUA 1533 * | 100 | 5,06 \pm 0,01 ^A | 12,24 \pm 0,01 ^A |
| <i>P. ostreatus</i> DPUA 1533 ** | 100 | 6,87 \pm 0,03 ^A | 14,99 \pm 0,03 ^A |
| <i>P. eryngii</i> DPUA 1816 * | 100 | 6,49 \pm 0,02 ^A | 12,99 \pm 0,01 ^A |
| <i>P. eryngii</i> DPUA 1816 ** | 100 | 4,9 \pm 0,02 ^A | 12,13 \pm 0,01 ^A |

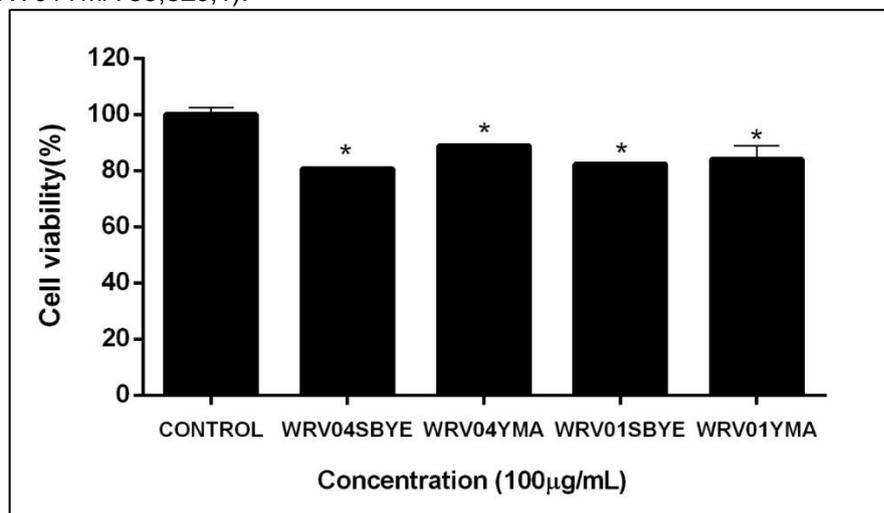
Meios de cultivo: *YM; **SB+YE. Médias seguidas por uma mesma letra em uma mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). **Fonte:** Autores (2022).

Dados na literatura, considerando para os extratos de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp., comprovam que possuem vários tipos de ácidos orgânicos reativos nas várias concentrações de antioxidantes (HALLIWELL et al., 1995; VALENTÃO et al., 2005; RAHIM et al., 2010; XIAO et al., 2012; BAKIR et al., 2018; STASTNY et al., 2022).

Brugnari et al. (2016) comprovaram capacidade antioxidante do cogumelo *P. ostreatus* cultivado em meio líquido, na concentração de 100 µg/mL, com mais de 80% de inibição do radical em ABTS e DPPH. Estudo realizado por Yu et al. (2018) demonstraram capacidade antioxidante de *P. eryngii*, utilizando solventes, com inibição do radical de DPPH em 81,0% (Etanol) e 88,4% (Acetato de etila) com inibição do radical de ABTS.

A atividade citotóxica foi avaliada em células de linhagens humanas de fibroblastos (MRC-5). Expostas na concentração de 100µg/mL das substâncias testes, no intervalo de tempo de tratamento em 24 horas (Figura 1).

Figura 1: Gráfico representando a avaliação da citotoxicidade dos extratos em percentual, de *P. eryngii* (WRV04SBYE 80,7±0,2), *P. eryngii* (WRV04YMA 82,3±0,2), *P. ostreatus* (WRV01SBYE 84,1±4,8) e *P. ostreatus* (WRV01YMA 88,8±0,1).



Os dados estão expressos em porcentagem de viabilidade celular com média ± desvio padrão (em relação ao controle de DMSO) e analisados por two-way ANOVA seguido do teste de Dunnett. *p < 0,05.

Conforme observada na figura 1, os extratos de *P. eryngii* e *P. ostreatus* sob as condições de cultivo, apresentaram viabilidade celular superior a 80%, não sendo considerada citotóxica. Estes resultados, confirmam o que Hyde et al. (2019) mostraram sobre o potencial dos fungos e suas aplicações para o mercado da indústria, onde os cogumelos têm se mostrado como excelente fonte produtora de diversas moléculas bioativos.

Nota-se que ao comparar estes dados com outras espécies, o gênero *Pleurotus* tem destaque na produção de um extrato não sendo tóxico. Al-Temimay et al. (2015) relatou viabilidade celular de *P. ostreatus* em linhagens cancerígenas (CaSki, MCF-7 e A549) exceto em MRC-5, onde teve 30% citotoxicidade em concentração de 200 µg/ml, apresentando efeitos colaterais nocivos sobre as células normais, testados em

72h. Além disso, Klaus et al. (2021) estudaram o *P. fabellatus* e apresentou citotoxicidade fraca em MRC-5, concentração testada de 40 mg/mL tendo viabilidade celular em 60,53%.

3.2 Pré-purificação do extrato por SAB

Nas condições testadas, o extrato bruto de *P. eryngii* DPUA 1816 na atividade específica, apresentou $1552,8 \pm 91,6$ (U/mL) de protease e desta, $226,47 \pm 7,26$ (U/mL) apresentou ação fibrinolítica, em comparação com *P. ostreatus*, com $16,3 \pm 1,57$ (U/mL) de protease e $71,5 \pm 0,56$ (U/mL) teve ação fibrinolítica.

Para a recuperação do extrato *P. eryngii* DPUA 1816, utilizou-se sistemas de duas fases aquosas compostos por PEG e sulfato de sódio (Na_2SO_4), para extração à produção e ao particionamento da protease fibrinolítica, sob única etapa, como ilustrada na matriz do planejamento com os resultados (Tabela 2).

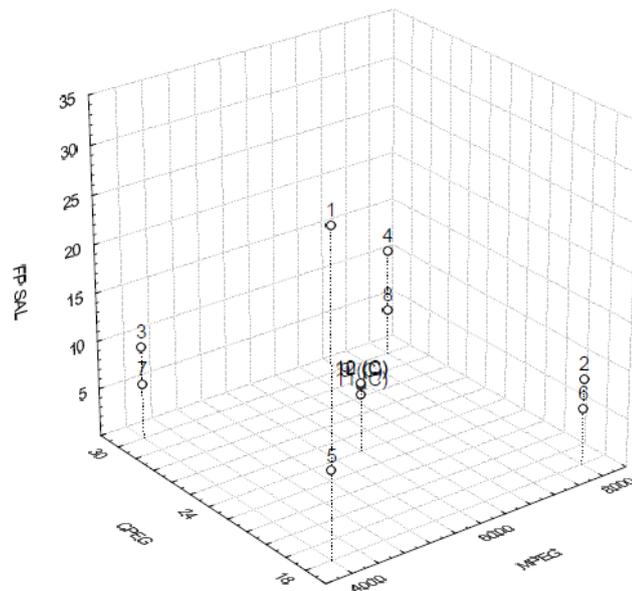
Tabela 2: Resultados do planejamento fatorial de 12 sistemas por fermentação extrativa, utilizando sistema bifásico aquoso (PEG/SAL) para extração e particionamento de protease fibrinolítica produzida por *Pleurotus eryngii* DPUA 1816.

| S ^a | M _{PEG} ^b | C _{PEG} ^c | C _{SAL} ^c | AF _{PEG} ^d | AF _{SAL} ^d | Y _{PEG} ^e | Y _{SAL} ^e | FP _{PEG} ^f | FP _{SAL} ^f | K ^g | BM _{Proteica} ^h |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| 1 | 4000 | 18 | 10.0 | 9,242 | 30,25 | 68,61 | 242,63 | 49,68 | 209,05 | 0,31 | 81,99 |
| 2 | 8000 | 18 | 10.0 | 10,714 | 8,62 | 74,57 | 77,32 | 54,27 | 56,96 | 1,24 | 83,75 |
| 3 | 4000 | 30 | 10.0 | 12,723 | 9,05 | 88,54 | 76,98 | 56,99 | 61,04 | 1,41 | 91,53 |
| 4 | 8000 | 30 | 10.0 | 11,064 | 11,22 | 82,13 | 90,23 | 38,37 | 71,41 | 0,99 | 121,01 |
| 5 | 4000 | 18 | 13.2 | 13,977 | 8,86 | 88,62 | 82,21 | 39,10 | 57,76 | 1,58 | 129,31 |
| 6 | 8000 | 18 | 13.2 | 10,577 | 5,97 | 73,61 | 53,55 | 38,89 | 37,53 | 1,77 | 110,51 |
| 7 | 4000 | 30 | 13.2 | 12,807 | 6,73 | 89,13 | 46,84 | 40,32 | 36,47 | 1,90 | 124,54 |
| 8 | 8000 | 30 | 13.2 | 10,848 | 5,63 | 93,95 | 34,83 | 38,16 | 30,68 | 1,93 | 135,50 |
| 9 | 6000 | 24 | 11.6 | 14,493 | 7,43 | 123,28 | 55,16 | 50,03 | 44,32 | 1,95 | 136,95 |
| 10 | 6000 | 24 | 11.6 | 13,323 | 7,70 | 107,14 | 57,16 | 48,04 | 45,12 | 1,73 | 125,56 |
| 11 | 6000 | 24 | 11.6 | 10,194 | 6,48 | 86,71 | 45,10 | 37,03 | 38,12 | 1,57 | 129,79 |
| 12 | 6000 | 24 | 11.6 | 13,773 | 7,33 | 123,55 | 46,48 | 48,02 | 45,49 | 1,88 | 139,81 |

^aS: Número de sistemas realizados; ^bM_{PEG}: massa molar do PEG (g/mol); ^cC: concentração de PEG e SAL (%w/w); ^dAF: atividade fibrinolítica na fase PEG e sal (U/mL); ^eY: recuperação na fase PEG e Sal (%); ^fFP: fator de purificação na fase PEG e SAL; ^gK: coeficiente de partição; ^hBM: Balanço de massa proteica (%).

Como observado, obteve-se atividades fibrinolíticas em todos os sistemas do planejamento fatorial. Este efeito simultâneo pode ser observado no gráfico da figura 2, revelando que o FP_{SAL} aumentou linearmente dos níveis mais baixos para os mais altos, sobre as C_{PEG} com a M_{PEG}.

Figura 2: Efeito simultâneo do fator de purificação, na concentração e massa molar do PEG, do planejamento fatorial, da protease fibrinolítica de *P. eryngii* DPUA 1816 por sistema bifásico aquoso.



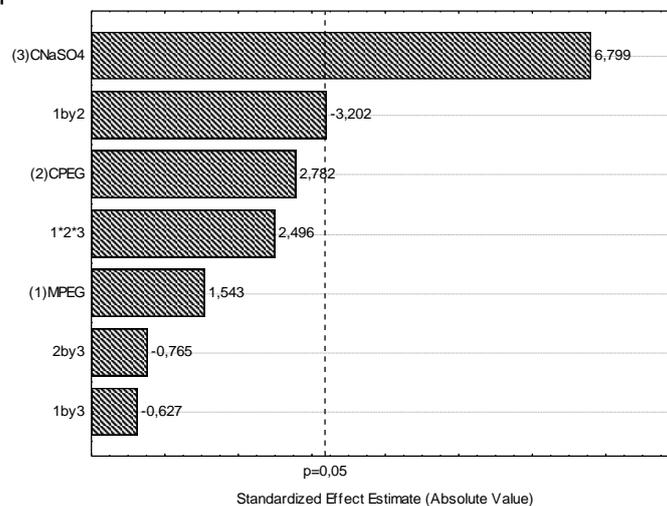
Fonte: Autores (2022).

Parte das proteínas sintetizadas por *P. eryngii*, também interagiram na fase PEG. Porém, como condição ótima, o efeito simultâneo da protease fibrinolítica revelou ter maior afinidade com a fase rica em sal.

Todos os sistemas do planejamento fatorial, apresentaram recuperação acima de 80%, e somente dois sistemas tiveram valores de coeficiente de partição inferior 1. No entanto, a maior atividade fibrinolítica do fator de purificação foi de 30,25 (U/mL), obtido na fase inferior do sistema 1, na concentração de 18%_{PEG} e 10%_{SAL}.

Os resultados das variáveis independentes, estatisticamente, para concentração de NaSO₄ as interações tiveram efeito positivo e significativo para coeficiente de partição (Figura 2).

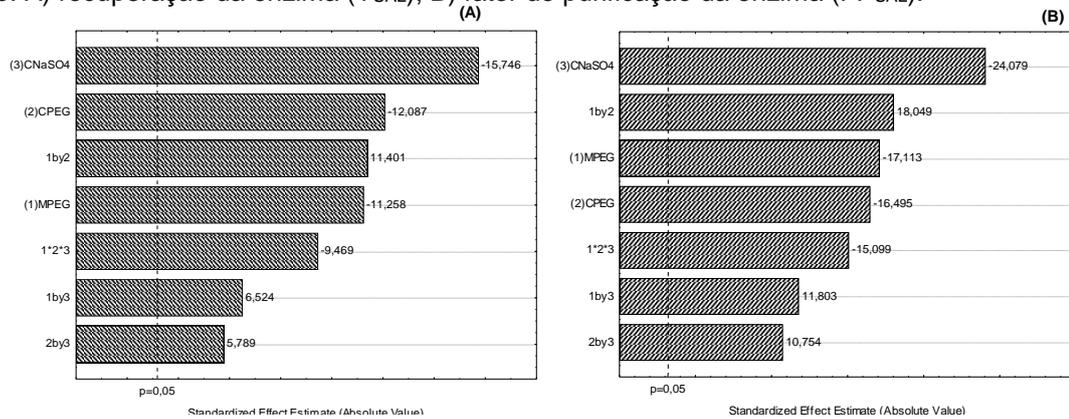
Figura 2: Gráfico de Pareto mostrando o efeito das variáveis sobre o coeficiente de partição (K) por sistema bifásico aquoso.



Fonte: Autores (2022).

As variáveis independentes para a recuperação e purificação da enzima, na fase sal, as interações tiveram efeitos significativos e negativos, entre as concentrações e massa de PEG (Figura 3 A e B).

Figura 3: Gráfico de Pareto ilustrando os efeitos das variáveis independentes por sistema bifásico aquoso. A) recuperação da enzima (Y_{SAL}); B) fator de purificação da enzima (FP_{SAL}).

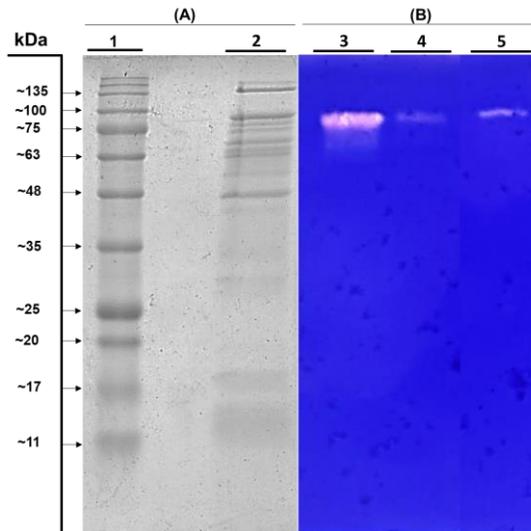


Fonte: Autores (2022).

Nestas análises, o efeito das variáveis independentes mostrou que quanto maior a concentração, mais a enzima tem afinidade na fase rica em sal. Isso indica, que os valores menores presentes nas variáveis independentes, contribuiu para o aumento significativo da recuperação do extrato enzimática, quando combinados os menores valores da M_{PEG} e da C_{PEG} , maiores são os valores de Y .

Para verificar a pureza da protease fibrinolítica produzida por *P. eryngii*, realizou-se eletroforese SDS-PAGE 12%, para o extrato bruto, e para o extrato pre-purificado, fez-se o zimograma da protease para as duas fases do sistema 1 (Figura 4).

Figura 4: Representação da eletroforese SDS-PAGE a 12% e zimograma do extrato bruto e do sistema pre-purificado. (A): 1-Marcador de massa molecular; 2-extrato bruto obtido por fermentação submersa em meio YM; (B): 3-Zimograma do extrato bruto; 4-Fase inferior do sistema 1; 5-Fase superior PEG 4000 do sistema 1.



Fonte: Autores (2022).

Observa-se, que a banda referente à protease do extrato bruto apresentou enzimas sob diferentes tamanhos. E como resultado do zimograma, a protease fibrinolítica, presente no extrato bruto e na fase SAL e PEG, ficou entre os marcadores de massa molecular 75 a 100kDa.

4 Conclusão

Considerando as potenciais aplicações de proteases fibrinolíticas no uso terapêutico para o tratamento de doenças trombolíticas, ambas as espécies de cogumelos, *P. eryngii* e *P. ostreatus*, apresentam viabilidade celular eficiente (80%). Além disso, todos os sistemas do planejamento fatorial, quanto caracterização da enzima de *P. eryngii*, por sistema bifásico aquoso, mostrou recuperação acima de 80% nas fases PEG e SAL, e a maior atividade fibrinolítica do fator de purificação obtido, foi de 30,25 (U/mL), na fase rica em sal do sistema 1. Portanto, este estudo apresenta dados promissores para o tratamento da trombose como alternativa terapêutica. Porém, ainda se faz necessária mais estudos com outras espécies de cogumelos comestíveis.

Agradecimento

O apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa e também o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pelo financiamento do projeto e de bolsa através dos recursos disponibilizados no EDITAL Nº. 006/2019 - UNIVERSAL AMAZONAS -

FAPEAM Processo Nº. 062.00134/2020 e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico e científico.

Referências

- Ahmed, S.A.; Gogal Jr., R. M.; Walsh, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- Akopovich, I. "New dietary supplements from medicinal mushrooms: Dr Myko San--registration report." *Int J Med Mushrooms* 13(3): 307-313, 2011.
- Ali, S. M.; Ling, T. C.; Muniandy, S.; Tan, Y. S.; Raman, J.; Sabaratnam, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. *Separation and Purification Technology* 122 359–366, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.016>
- Al-Temimay, Israa A.; Muna H. AL-Jibouri; Hassan, Abdulla A.; Mohammad, Farooq I. Test the Cytotoxicity of *Pleurotin* Extracted from an Edible Mushroom *Pleurotus osteratus* Against Three Human Carcinoma Cell Line. *Iraqi Journal of Science*, Vol 56, No.4A, pp: 2773-2781, 2015. <https://www.researchgate.net/publication/327417145>
- Astrup, T.; & Mullertz, S. The fibrin platemethod for estimating of fibrinolyticactivity. *Arch Biochem Biophys*; 40: 346–51p, 1952. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5)
- Bakir T, Karadeniz M, Unal S. Investigation of antioxidant activities of *Pleurotus ostreatus* stored at different temperatures. *Food Sci Nutr*. 2018 Apr 16;6(4):1040-1044. doi: 10.1002/fsn3.644. PMID: 29983968; PMCID: PMC6021724.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248– 254, 1976. DOI: [doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brugnari, T., Kato, C. G., Correa, V. G., De Freitas, E. N., Nolli, M. M., & De Souza, C. G. M. Atividade antioxidante do extrato aquoso do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus*. *Uningá Review*, 25(3), 2016. Retrieved from <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/1784>
- Condé, V. F., Oliveira, J. E. Z., & Oliveira, D. M. F. Incidência e severidade de hérnia das crucíferas (*plasmodiophora brassicae* w.) Em repolho (bra Farinha de cogumelo *pleurotus ostreatus* (hiratake) enriquecido em ferrossica oleracea l. Var. Capitata) em solo tratado com biofertilizante tipo bokashi. *Ciência E Natura*, 39(1), 01–06, 2016. <https://doi.org/10.5902/2179460X21437>
- Duarte A. F. S., Hirota B. C. K., Oliveira V. B., Campos R., Murakami F. S., Miguel M. D., et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl. (Rubiaceae). *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*. 2014;35(4):607-614.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Loliger, L.; Aruoma O. I. The characterization of antioxidant. *Food Chem Toxicol* 1995;33 (7):601–17.

Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T. & Stadler, M. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, n. 1, p. 1-136, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>

Ishikawa, N. K.; Vargas-Isla, R.; Gomes, D.; Menolli Jr., N. Principais cogumelos comestíveis cultivados e nativos do estado de São Paulo. *Pesquisa & Tecnologia* 14(2), 2017.

Jose, N., Janardhanan, K. K. Antioxidant and antitumour activity of *Pleurotus florida*. *Curr. Sci.* 79 (7), 941–943, 2000.

Kirsch, L. S., A. C. Pinto, T. S. Porto, A. L. Porto & M. F. S. Teixeira. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 13(2): 185-192, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v13.i2>

Klaus, A., Wan-Mohtar, W.A.A.Q.I., Nikolić, B. et al. Pink oyster mushroom *Pleurotus flabellatus* mycelium produced by an airlift bioreactor—the evidence of potent in vitro biological activities. *World J Microbiol Biotechnol* 37, 17, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02980-6>

Kong, W.S. Description of Commercially Important *Pleurotus* Species. In: Choi, K.W., Ed., *Mushroom Growers' Handbook 1: Oyster Mushroom Cultivation*, MushWorld, Seoul, 54-61, 2004.

Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R. A. J.; & Kelln, R. A. The Relationship of Serine Protease Activity to RNA Polymerase Modification and Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, v. 76, n. 1, p. 103-122, 1973. [doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90083-1)

Magalhães, A. S.; Silva, T. A.; Teixeira, M. F.; Filho, R. F. C.; Silva, S. D.; Gomes, D. M., & Pereira, J. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). *Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais*, 14(3), 453-462, 2019. <https://doi.org/10.46357/bcnaturais.v14i3.231>

Martim, S. R. et al. *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. *African Journal of Microbiology Research*, v. 11, n. 17, p. 660-667, 2017. DOI: 10.5897/AJMR2017.8520.

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

Nascimento, T. P., Sales, A. E., Porto, C. S., Brandão, R. M., Campos-Takaki, P. G. M., Teixeira, J. A., Porto, C. T., Porto, S. A. L. F., & Converti, A. Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). *Journal of Chromatography B*, Volume 1025, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.046>.

Pimenta, Laynah. *Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por Pleurotus ostreatus e Pleurotus eryngii*. Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus – AM, 2018.

Prado, F. B.; Batista, S. C. P.; Martim, S. R.; Teixeira, M. F. S. Feasibility of protease production by aspergillaceae species and screening of coagulants from bovine milk. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.7, n.2, p. 16356-16373 feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-317>

Rahim, M. S., Salihon, J., Yusoff, M. M., Bakar, I. A., & Damanik, M. R. Effect of temperature and time to the antioxidant activity in Plecranthus amboinicus Lour. *American Journal of Applied Sciences*, 7(9), 1195–1199, 2010. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.1195.1199>

Re, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

Ribeiro, A., G. Ruphuy, J. C. Lopes, M. M. Dias, L. Barros, F. Barreiro and I. C. Ferreira "Spray drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients." *Food Chem* 188: 612-618, 2015.

Santana, R. S., Farias, V. G., Sevalho, E. de S., Candido, K., Carpio, K. C. R., Gomes, W. R., & Carvalho, R. P. Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years. *Research, Society and Development*, 11(14), 2022. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36652>

Silva, A., Nascimento, J., Rodrigues, C., Nascimento, D., Costa, R., Viana, D., Leite, A., Figueiredo, M., Pastrana, L., Converti, A., Nascimento, T. & Porto, Ana. Partial purification of fibrinolytic and fibrinogenolytic protease from *Gliricidia sepium* seeds by aqueous two-phase system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101669>

Singh, M., Vijay, B., Kamal, S., Wakchaure, G. C. Mushrooms: cultivation, marketing and consumption, directorate of mushroom research. *Indian Council of Agricultural Research (ICAR)*, Solan, India, 2011.

Stastny, J.; Marsik, P.; Tauchen, J.; Bozik, M.; Mascellani, A.; Havlik, J.; Landa, P.; Jablonsky, I.; Tremel, J.; Herczogova, P.; Bleha, R.; Synytsya, A.; Kloucek, P. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of Five Medicinal Mushrooms of the Genus *Pleurotus*. *Antioxidants*, 11, 1569, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11081569>

Teixeira, M. F. S. **Manual de qualidade**: coleção de cultura DPUA. Instituto de Ciências Biológicas (ICB II) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM); - Manaus, AM: EDUA, 2021.

Valentão, P.; Lopes, G.; Valente, M.; Barbosa, P.; Andrade, P. B.; Silva, B. M. et al. Quantitation of nine organic acids in wild mushrooms. *J Agric and Food Chem*; 53:3626-30, 2005.

Venturella, G., Gargano, M.L. Medicinal properties of mediterranean oyster mushrooms: species of genus *Pleurotus* (higher basidiomycetes). *Med. Plants Fungi: Recent Adv. Res. Dev.* 4, 49–58, 2017.

Wessel, D., & Flügge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical biochemistry*, 138(1), 141–143, 1984. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6)

Xiao, H. W., & Gao, Z. J. The application of scanning electron microscope (SEM) to study the microstructure changes in the field of agricultural products drying. In *Scanning Electron Microscopy*. InTech, 2012.

Yu, Eun-Ji; So-Ra, Han; Ki-Hwa, Kim; Bo-Ram, Park; Kun-Ok, Lim; Tae-Jin Oh. Antibacterial and Antioxidant Activity of *Pleurotus eryngii* Extracts. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, Vol.9, No. 12, 2018. DOI Number: 10.5958/0976-5506.2018.02191.5

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos quanto à produção, pré-purificação e caracterização bioquímica de enzimas proteolíticas com ação fibrinolítica de cogumelos comestíveis, conclui-se que:

- Que os extratos de *P. eryngii* e *P. ostreatus*, cultivados em YM e SB, apresentaram viabilidade celular superior a 80%, não sendo considerada citotóxica.
- Que a melhor produção de cultivo se deu em meio YM, apresentando valores significativos em teor proteínas, proteases e fibrinolítica;
- Que o cogumelo foi *P. eryngii*, apresentado $1552,8 \pm 91,6$ (U/mL) de protease e $226,47 \pm 7,26$ (U/mL) desta enzima, tendo ação significativos de atividade fibrinolítica;
- Que a enzima fibrinolítica do extrato bruto, pré-purificado em sistema de duas fases aquoso PEG e SAL, tiveram recuperação acima de 80%;
- Que a maior atividade fibrinolítica do fator de purificação, do sistema bifásico aquoso, foi de 30,25 (U/mL), na concentração de 18%_{PEG} e 10%_{SAL};
- Que a massa molecular presente no extrato bruto e no SAB, ficou entre os marcadores de 75 a 100kDa;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-AZIZ, S. M.; HAMID, H. A.; FADEL, M. Edible mushrooms: a green biotechnology and great nutritional value for improving human health. **EPH-International Journal of Science And Engineering**, v. 1, n. 8, p. 01-17, 2015.
- ABREU, L.D.; MARINO, R.H.; MESQUITA, J.B.; Ribeiro, G.T. Degradação da madeira de *Eucalyptus* sp. por basidiomicetos de podridão branca. **Arquivos do Instituto Biológico**, 74(4): 321-328, 2007.
- AGUIAR, Lorena Vieira Bentolila de. **Cultivo e avaliação nutricional de *Pleurotus ostreatus* de ocorrência na Amazônia, em condições ambientais não controladas**. Dissertação- Programa de Pós-Graduação em Agricultura no Trópico Úmido (ATU) -INPA, Manaus, Amazonas, novembro, 2016.
- AGUILAR, Alfredo; TWARDOWSKI, Tomasz; WOHLGEMUTH, Roland. Bioeconomy for sustainable development. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 8, p. 1800638, 2019.
- AHN, M.Y.; HAHN, B.S.; 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 Resource*, v. 112, n. 5, p. 339-347, 2003.
- ALEXOPOULOS, C. J; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introdução à Micologia**. John Wiley and Sons, Nova York. 868p. 1996.
- ALMEIDA, Marcelo José de; GUILLAUMON, Ana Terezinha; MIQUELIN, Daniel; JOVILIANO, Edwaldo Edner; HAFNER, Ludvig; Sobreira, Marcone Lima; GEIGER, Martin Andreas; MOURA, Regina; RAYMUNDO, Selma; YOSHIDA, Winston Bonnetti. Diretrizes de conceito, diagnóstico e tratamento da trombose venosa superficial. **J Vasc Bras**. 2019; 18: e20180105. <https://doi.org/10.1590/1677-5449.180105>
- ALVES C. Pereira; ALMEIDA, C. Costa; BALHAU, A. Pratas. **Tromboembolismo Venoso Diagnóstico e Tratamento**. Capítulo de Cirurgia Vasculiar, da Sociedade Portuguesa de Cirurgia, Portugal, março de 2015.
- AMARAL, Creusa Sayuri Tahara et al. Novos caminhos da biotecnologia: As inovações da indústria 4.0 na saúde humana. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 23, n. 3, p. 203-231, 2020.
- ANPC. ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE COGUMELOS. Cogumelos. Disponível em: <<https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>>. Acesso em: 18-de outubro de 2022.
- BARBOSA, E. E. P.; PIMENTA, L.; BRITO, A. K. P.; MARTIM, S. R.; & TEIXEIRA, M. F. S. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases / Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production. *Brazilian Journal of Development*, 6(11), 92475–92485, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n11-598>
- BARNETT, H. L. e HUNTER, B. B. *Illustrated Gênero of Imperfec the Fungi*. Ed. APS Press. v4, 1999.
- BARROS, Priscila Danielly Santos de. Purificação e caracterização de enzimas fibrinolíticas obtidas de *Arthrospira platensis*. **Dissertação** de mestrado do Programa

de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, Recife 2018.

BENEDICT, R. G.; BRADY, L. R. Antimicrobial activity of mushroom metabolites. **J Pharmacol Sci** 61: 1820–1822, 1972.

BLACKWELL, M. **The fungi**: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426-438. 2011.

BLACKWELL, M.; VILGALYS, R.; JAMES, T. Y.; TAYLOR J. W. **Fungi**. Eumycota: mushrooms, sac fungi, yeast, molds, rusts, smuts, etc. 2012. Disponível em <<http://tolweb.org/>>. Acesso em: 10.dez. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Acidente Vascular Cerebral – AVC. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidente-vascularcerebral-avc>>. Acesso em: 20 de jan. 2022.

BUBA, Juliano Costa. Produção de proteases com atividade fibrinolítica por cultivo submerso de *Mucor subtilissimus* em biorreator. **Dissertação** de mestrado da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

BRITO, A. K. P., PIMENTA, L., BARBOSA, E. E. P., BATISTA, S. C. P., COELHO, M. P. S. L. V., CASTILLO, T. A., MARTIM, S. R., & Teixeira, M. F. S. Evaluation of tropical forest substrates for cultivation and production of proteases by *Pleurotus djamor*. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 3, 2021. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13385>

CARRASCO-GONZÁLEZ, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 69-81, 2017.

CERCAS, Maria do Rosário Branco. Trombose Venosa: Revisão a propósito de Caso Clínico. **Dissertação** de mestrado integrado em medicina, da Universidade de Lisboa, Portugal, 2017.

CHA, W.S.; PARK, S.S.; KIM, S.J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solidstate conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6475-6481, 2010.

CHO, I. H.; CHOI, E. S.; LIM, H. G.; LEE, H. H. Purification and characterization of six fibrinolytic serine-proteases from earthworm *Lumbricus rubellus*. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 199-205, 2004.

CHOI, D.; CHA, W. S.; PARK, N.; KIM, H. W.; LEE, J. H.; PARK, J. S.; PARK, S. S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3279-3285, 2011.

CHOI, J. H.; KIM, J. E.; KIM, S.; YOON, J.; PARK, D. H.; SHIN, H. J.; LEE, H. J.; CHO, S. S. Purification and partial characterization of a low molecular fibrinolytic serine metalloprotease C142 from the culture supernatant of *Bacillus subtilis* C142. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 724- 731, 2017.

COELHO, M.; FIGUEIREDO, A. S. F.; MARTIM, S. R. M.; & TEIXEIRA, M. F. S. T. Ciclo de produção de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos lignocelulósicos

da fruticultura Amazônica: um estudo de caso. *Concilium*, 284–294, 2022. <https://doi.org/10.53660/CLM-116-138>

DA SILVA, A, C.; JORGE, N. **Cogumelos**: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. *Journal of Health Sciences*, v. 13, p. 375-384, 2011.

DAS, G.; PRASAD, M.P. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. **International Research Journals of Microbiology**, v. 1, n.2, p. 026-031, April, 2010.

DENG, Z.; WANG, S.; LI, Q.; JI, X.; ZHANG L.; HONG, M. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from the polychaete, *Neanthes japonica* (Iznka). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1954-1960, 2010.

DE-SIMONE, S.G.; CORREA-NETTO, C.; ANTUNES, O.A.C.; DE-ALENCASTRO, R.B.; SILVA JR.; F.P. Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two p-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. **Journal of Chromatography**, v. 822, n. 1-2, p. 1-9, 2005.

DEVECI, E.; ÇAYAN, F.; TEL-ÇAYAN, G.; DURU, M. E. Inhibitory activities of medicinal mushrooms on α -amylase and α -glucosidase-enzymes related to type 2 diabetes. *South African Journal of Botany*, v. 137, p. 19-23, 2021

DIAS, E. S. Mushroom cultivation in Brazil: challenges and potential for growth. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 795-803, 2010.

ESPOSITO, Eliza; AZEVEDO, João Lúcio. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educus, 2010.

EVERT, R. F.; HEICHHORN, S. E. Raven – **Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and Biotechnologically Engineered Plant Proteases with Industrial Applications. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1066-1088, 2011.

FORZZA, RC., org., et al. INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil** [online]. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. 828 p. Vol. 2. ISBN 978-85-8874-243-7. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.Hawksworth, D.L. 2001. Mushrooms: the extent of the unexplored potencial. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3: 82.

GOMES, D. et al. Censo paulista de produção de cogumelos comestíveis e medicinais. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2016.

GUIMARAES, L.H.S.; PEIXOTO, S.C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A.C.S.; SANDRIN, V.C.; ZANOELO, F.F.; JUNIO, A.B.; POLIZELLI, M. L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 474-480, 2006.

HAWKSWORTH, D.L. Mushrooms: the extent of the unexplored potencial. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 3: 82, 2001.

HYDE, K.D. Where are the missing fungi? Does Hong Kong have any answers?. **Mycological Research**, 105(12): 1514-1518, 2001.

JANNING, Jéssika Adriane. Estudo da viabilidade de produção de três espécies de cogumelos do gênero *Pleurotus* em resíduo úmido de cervejaria. **Trabalho de conclusão de Curso** do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo, 2016.

JIMÉNEZ, J.J.; TRAPERO, A.; SÁNCHEZ, M.E. **La Podredumbre radical del pinsapo**. Consejería de médio ambiente: Junta de Andalucía, Revisado agosto 2010.

JUNIOR, Nilo Luiz Saccaro. Bioprospecção e desenvolvimento sustentável. **IPEA Desafios do Desenvolvimento**, ano, v. 9. 2012.

KIRK, P.M.; CANNON, P.F.; DAVID, J.C., STALPERS, J.A. **Dictionary of Fungi**. 10ed. CABI Publishing, Surrey, 771p. 2008.

LEE, J. S.; BAI, H. S.; PARK, S. S. Purification and characterization of two novel fibrinolytic proteases from mushroom, *Fomitella fraxinea*. **Journal Microbiology and BioTechnology**; v. 16, n. 2, p. 264-271, 2006.

LOGUERCIO LEITE, Clarice. Polyporaceae na ilha de santa catarina III: o genero *Hexagonia* Fr. **INSULA Florianópolis** N° 23 3-14, 1994.

LOGUERCIO-LEITE, Clarice. Taxonomia dos fungos. In: **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Esposito, Eliza; Azevedo, João Lúcio (Org.).Caxias do Sul: Educs, 2010.

LOURENÇO, I.; ALVES, MJ.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Extratos de cogumelos silvestres potenciam a ação de antibióticos contra bactérias multi-resistentes. **III Encontro de Jovens Investigadores do Instituto Politécnico de Bragança**: livro de resumos, p. 33-33, 2016.

MACEDO, Edimar Cristiano. **Principais grupos de fungos: uma interpretação com base em sua sistemática filogenética**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, 2017.

MAMIRO, D.P.; MAMIRO, P.S. Yield and mushroom size of *Pleurotus ostreatus* grown on rice straw basal substrate mixed and supplemented with various crop residues. **Journal of Animal & Plant Sciences**, 10(1): 1211-1218, 2011.

MANDER, P.; CHO, S. S.; SIMKHADA, J. R.; CHOI, Y. H.; YOO, J. C. A low molecular weight chymotrypsin-like novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* sp. CS624. **Process Biochemistry**. v. 46, p. 1449–1455, 2011.

MARTIM, S. R., L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, B. C. SOUZA, I. M. A. OLIVEIRA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Ciências Naturais**, Belém, v. 12, n. 3, p. 353-362, set.-dez. 2017.

MARTINS, Olívia Gomes. **Análise da produtividade e sustentabilidade de inóculo de *Pleurotus ostreatus* após repicagens sucessivas**: estudo de caso. Dissertação- Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2019.

MATTJE, V. M. Impacto da dieta composta de ração suplementada com FeSO₄.7H₂O e com micélio de *Pleurotus* sp. Em modelos murinos associada ao tratamento com Metotrexato. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Gurupi, 2019.

MUGUET, C. M.; GUIMARÃES, K.; BASTOS, L. .; BARONI, M. .; CURTY, M.; MARZANO, M.; COSTA, M.; TARDELLI, M. .; RISI, R. .; LUSTOSA, R.; ESTADO, V. Post-COVID-19 deep vein thrombosis and its pharmacological management. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. e12311124991, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i1.24991.

PARK, S.; LI, M.; KIM, J.; SAPKOTA, K.; KIM, J.; CHOI, B.; YOON, Y.; LEE, J.; LEE, H.; KIM, C.; KIM, S. Purification and Characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. **Bioscience and BioTechnology Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2214-2222, 2007.

PAZZA, A. C. V.; ZARDO, C.; KLEIN, R. C. M.; DA-CAS, T. M. S.; BERNARDI, D. M. Composição nutricional e propriedades funcionais fisiológicas de cogumelos comestíveis. **FAG JOURNAL OF HEALTH** (FJH), v. 1, n. 3, p. 240- 265, 2019.

PETERSEN, J. H. **The Kingdom of Fungi**. Dinamarca: Gyldendal, 2012.

PIMENTA, L.; BARBOSA, E. E. P.; BRITO, A. K. P. de; MARTIM, S. R.; & TEIXEIRA, M. F. S. Processo eco-amigável para selecionar substrato Lignocelulósico para produção de peptidases ácidas / Eco-friendly process to select Lignocellulosic substrate for the production of acid peptidases. *Brazilian Journal of Development*, 7(1), 3469–3479, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-234>

PIMENTA, Laynah. Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*. **Monografia** do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, MANAUS – AM, 2018.

PUTZKE, Jair. OS GÊNEROS PLEUROTUS E LENTINUS (AGARICALES, BASIDIOMYCOTA, FUNGOS) NO BRASIL - I: LISTA DE ESPÉCIES E CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO. **Caderno de Pesquisa Sér. Bio.**, Santa Cruz do Sul, Vo. 14, No. 1, Jan./Jun. 2002, pp. 67-75

RAJPUT, K., S. CHANYAL & P. K. AGRAWAL. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree - *Cupressus torulosa* D.DON. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 5(7): 1034-1054, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.20959/wjpps20167-7137>

RAVINDRAN, R.; HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, v. 5, n. 4, p. 93, 2018.

RAVINDRAN, Rajeev; HASSAN, Shady; WILLIAMS, Gwilym & JAISWAL, Amit. A Review on Bioconversion of Agro-Industrial Wastes to Industrially Important Enzymes. **Bioengineering**. 5-93, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering5040093>

ROCHA A. T.; PAIVA, E.F.; LICHTENSTEIN, A.; MILANI-Jr, R.; CAVALHEIRO-FILHO, C.; MAFFEI, F. H.; ANDRÉ, C.; FUKUJIMA, M. M.; FREITAS, G. R.; LAGE, S.; BONDUKI, C.; CARVALHO, C.; RAMACCIOTTI, E.; TEIXEIRA, V. L.; SILVEIRA, P. R. M.; MATHIAS, C.; NICOLAU, J. C.; LOPES, R. D.; BUKSMAN, S.; HAGEMeyer, V.;

- D'AMICO, E.; TERRA-FILHO, M.; LEVY, R. A.; SOUZA, A. W. S. **Projeto Diretrizes: Tromboembolismo Venoso**: Profilaxia em Pacientes Clínicos – Parte III. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 31 de março de 2005.
- RODWELL, V. W.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J. *et al.* **Bioquímica Ilustrada de Harper**. Tradução DORVILLÉ, L. F. M.; MOREIRA, M. E. C., *et al.* 30 ed. McGraw Hill Brasil, 2017.
- SANCHES, Suzanna Maria Viana. Terapia Anticoagulante para Tratamento da Trombose Venosa Profunda – O Que Há de Novo?. **Rev. Cient. HSI** 2019;3(3)
- SANTOS, Elisandro Ricardo Drechsler dos. **Material complementar ao livro Sistemática Vegetal I: Fungos**. In: Paulo Antunes Horta Junior (Org.). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. Disponível em: <https://uab.ufsc.br/biologia/files/2020/08/Fungos.pdf>
- SHEN, M. H.; KIM, J. S.; SAPKOTA, K.; PARK, S. E.; CHOI, B. S.; KIM, S.; LEE, H. H.; KIM, C. S.; CHUN, H. S.; RYOO, C. I.; KIM, S. J. Purification, characterization and cloning of fibrinolytic metalloprotease from *Pleurotus ostreatus* mycelia. **Journal of Microbiology and BioTechnology**, v. 17, n. 8, p. 1271-1283, 2007.
- SILVA, O. S.; R. L. OLIVEIRA, C. M.; SOUZA-MOTTA, A. L. F.; PORTO & T. S. PORTO. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research** 4(4): 125-143, 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012>>.
- SILVA, O. S., R. L. OLIVEIRA, C. M. SOUZA-MOTTA, A. L. F. PORTO & T. S. PORTO. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research** 4(4): 125-143, 2016. DOI: <<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012>>.
- SIQUEIRA, F. G. **Aplicações biotecnológicas para biomassas do pós-cultivo de cogumelos comestíveis**. Brasília – DF, 2015.
- SBTH. Sociedade Brasileira de Trombose e Hemostasia Trombose e Hemostasia. 10 de maio de 2019. Acessado dia 22 de janeiro de 2022, disponível no site: <http://sbth.org.br/trombose-e-hemostasia/>.
- TAYLOR, J. W. Tornando o Deuteromycota redundante: uma integração prática de fungos mitospóricos e meiospóricos. **Posso. J. Bot.** 73 (supl.):s754-s759, 1995.
- TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Manaus: EDUA, 2011.
- TELLES, C. B. S. **Análises estruturais e atividades biológicas de exopolissacarídeo extraído do fungo comestível *Pleurotus sajor-caju* e de seu derivado sulfatado quimicamente**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN.
- TRIERVEILER-PEREIRA, L.; SULZBACHER, M. A.; BALTAZAR, J. M. 2018. **Diversidade de fungos brasileiros e alimentação: o que podemos consumir?** In: III Fórum Ambiental de Angatuba, 2018, Angatuba-SP.

TRITSCHLER, T.; KRAAIJPOEL, N; L. E. G.; WELLS, P. S. Venous Thromboembolism: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**. Oct 16;320(15):1583-1594, 2018.

VALÉRIO, Taynara Pacheco. **Utilização de resíduos lignocelulósicos de palmito pupunha (*Bactris gasipaes*) para o cultivo de cogumelo (*Pleurotus ostreatus*).** Dissertação, Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR, 2021.

VÁZQUEZ, JES. **Producción de hongos comestibles.** San Cristóbal de las Casas: Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste; 1994. 107 p.

VALVERDE, M. E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T.; PAREDES-LÓPEZ, O. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. **International journal of microbiology**, v. 2015, 2015.

VENTURELLA, G. et al. Medicinal Mushrooms: Bioactive Compounds, Use, and Clinical Trials. **International Journal of Medical Science**, 22: 1-31, 2021.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. **Introduction to Fungi.** Cambridge. UK. 841pp., 2007.

WHITTAKER, R. H. New concepts of kingdoms of organisms. **Science**, Nova Iorque, v. 163, p. 150-160, 1969.

WHO. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). 11 de junho de 2021. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>>. Acessado em: 21 de janeiro de 2022.

YAMAC, Mustafa; BILGILI, Fatma. Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. **Pharmaceutical Biology**, Vol. 44, No. 9, pp. 660–667, 2006.