



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Extração de Proteases Fibrinolíticas de *Penicillium implicatum* CFAM 521 em Sistema de Duas Fases Aquosas

Thayana Cruz de Souza¹, Cláudia Patrícia Mendes de Araújo¹, Josy Caldas Rodrigues¹,
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes¹

¹Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz/Amazonas, Rua Teresina, 476 - Adrianópolis, Manaus - AM,
69057-070. E-mail: thayanacruz@gmail.com

RESUMO

As proteases fibrinolíticas de origem microbiana têm sido investigadas para atuarem como alternativas no tratamento contra doenças cardiovasculares. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a atividade fibrinolítica e purificar o extrato produzido por *Penicillium implicatum* CFAM 521. A ação fibrinolítica foi investigada em placa de fibrina, enquanto a purificação do extrato foi realizada no sistema de duas fases aquosa de PEG-fosfato. *P. implicatum* CFAM 521 apresentou atividade proteolítica de 504 U/ml, 19 mm no halo da placa de fibrina e as proteases fibrinolíticas ficaram retidas na fase inferior (rica em sal) do sistema de purificação.

Palavras-chave: protease fibrinolítica, fungo, purificação

INTRODUÇÃO

O aproveitamento de fontes naturais, como os micro-organismos, para produção de novos fármacos, vem sendo o incentivo principal para o desenvolvimento de diversos setores da bio-indústria (Specian et al. 2014). Dentro das aplicações farmacêuticas, estão as enzimas fibrinolíticas de origem microbiana que podem ser usadas no tratamento da trombose (Silva et al. 2013).

Embora exista uma série de anexos utilizados em distúrbios do coágulo sanguíneo, tais como a uroquinase e o ativador do plasminogênio tissular, estes podem causar hemorragias internas e possuem custo elevado. Dessa forma, novas buscas estão sendo feitas de forma a propor alternativas para estes problemas e desenvolver um tratamento antitrombolítico mais eficaz.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo extrair e purificar protease fibrinolítica produzida por *Penicillium implicatum* CFAM 521 depositado na Coleção de Fungos da Amazônia- CFAM.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismos, preparo do inóculo e produção de proteases

Para este estudo foi utilizada a cultura de *P. implicatum* CFAM 521 obtida da Coleção de Fungos da Amazônia (CFAM/FIOCRUZ-Brasil). Para obtenção do inóculo, a cultura foi subcultivada em Ágar Extrato de Malte (MEA) em placas de Petri (Ø=90mmx15mm). Os cultivos foram mantidos a 28°C por 7 dias (cultura estoque).

A fermentação submersa foi realizada transferindo-se 1 mL da suspensão de esporos da cultura estoque na concentração de 5×10^6 dos isolados em frascos de Erlenmeyers (50 ml)



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

contendo 30 ml da solução de Manachini (1987) suplementado com gelatina a 0,5%. A fermentação submersa foi conduzida em agitador orbital durante 96 h/150 rpm/28 °C. O extrato foi separado da biomassa por filtração a vácuo. No extrato bruto recuperado foi determinada a atividade proteolítica.

Quantificação da atividade proteolítica

A quantificação da atividade proteolítica foi feita de acordo com Fleuri & Sato (2008) utilizando caseína como substrato (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) em tampão fosfato 0,15M. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um alteração de 0,01 na absorbância a 280 nm por minuto.

Avaliação da atividade fibrinolítica

O extrato bruto foi submetido a atividade fibrinolítica em placa de fibrina de acordo com o método descrito por Astrup e Mullertz (1952), com pequenas modificações. A placa de fibrina (9 cm de diâmetro contendo 3mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10mL de fibrinogênio [0,5% (p/v)] e gel de agarose [1% (p/v)] com 0,1 mL de uma suspensão de trombina (100 unidades NIH/ml). Em seguida, foram confeccionados furos de 0,5 mm de diâmetro para aplicação de 20 µL do extrato enzimático fibrinolítico bruto, e posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C durante 18 horas e o diâmetro do halo translúcido foi medido.

Preparação do Sistema de duas fases aquosas

Para a etapa de purificação, elaborou-se um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central para determinar as influências e interações das concentrações e massa molar do PEG e das concentrações dos sais de fosfato (Tabela 1).

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial (2^3) com quatro (4) repetições no ponto central de diferentes concentrações e massa molar do PEG e sais de fosfato.

Variáveis	Níveis		
	-1	Zero	+1
Con.PEG	10%	15%	20%
MMPEG	1000	4000	6000
Con. Sais	15%	18%	21%

Todos os sistemas de PEG/fosfato foram preparados para uma massa final de 3g, formulados com mistura de soluções de PEG [1000; 4000 e 6000 g/mol⁻¹ (50% p/p)] e soluções de sais de fosfatos monobásico (NaH₂PO₄) e dibásico (Na₂HPO₄) (40% p/p), pH 5,0 e água deionizada, em tubos do tipo Falcon de 15 mL. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora. As duas fases (superior e inferior) foram separadas com auxílio de pipeta. Após esse procedimento foi determinada a atividade de protease e a concentração de proteína em cada uma das fases (Superior e Inferior).

Determinação do coeficiente de partição, recuperação, fator de purificação e proteínas totais

O coeficiente de partição (K) da enzima foi definido como a relação entre a atividade proteolítica na fase superior (As) e na fase inferior (Ai) (Eq. 1)

O fator de purificação (FP) foi calculado pela relação entre a atividade proteolítica específica na fase superior e a atividade proteolítica específica do extrato bruto (Aeb) (Eq 2).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

“Cs” e “Ceb” são as concentrações totais de proteínas, expressas em $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, na fase superior e no extrato bruto inicial, respectivamente.

A atividade de recuperação foi determinada como sendo a razão entre a atividade total na fase superior e a do extrato bruto e é expressa em percentagem (Eq. 3)

“Vs” e “Veb” são os volumes da fase superior e do extrato bruto, respectivamente.

$$1) \quad K = \frac{As}{Ai} \quad 2) \quad PF = \frac{As/Cs}{Aeb/Ceb} \quad 3) \quad Y = \left(\frac{As \times Vs}{Aeb \times Veb} \right) \times 100$$

Determinação do conteúdo de proteína total foi realizada pelo método de Bradford (1976) usando albumina sérica bovina como padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Investigação da atividade proteolítica

A produção proteolítica de *P. implicatum* CFAM 521 foi de 504,90 U/ml. Este valor foi superior ao encontrado por Haq et al. (2006) ao avaliar a espécie *P. chrysogenum* que apresentou 12 U/ml.

Quanto a ação fibrinolítica, *P. implicatum* apresentou capacidade de degradação do coágulo na placa de fibrina, com halo de 19 mm (Figura 1). Estes dados corroboram com o estudo realizado por Shirasaka et al. (2012) que, por sua vez, encontraram protease fibrinolítica produzida por *Aspergillus oryzae* KSK-3, a qual foi indicada para tratamento fibrinolítico de uso oral e aplicações nutracêuticas. Esses resultados sugerem que os fungos são promissores para produção de enzimas fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica.

*Purificação da protease fibrinolítica de *Penicillium implicatum* CFAM 0521*

No presente estudo, o valor máximo do coeficiente de partição (K) foi 1,97. Este aumento do coeficiente de partição da protease indica migração para a fase superior (PEG) (Bacha et al. 2012). Esta mesma amostra, apresentou o valor mais alto da atividade de recuperação (Y) correspondendo a 212% (ponto 4). Esta recuperação elevada, superior a 100%, está associada à remoção de inibidores e contaminantes durante a purificação do sistema, o que favorece a atividade da enzima (Cavalcanti et al.2006).

Tabela 2. Resultados da purificação da enzima fibrinolítica pelo sistema de duas fases aquosas.

Pontos	CPEG (g/mol)	MPEG (%)	C _{NaH₂PO₄} (%)	AP ⁱ (U/ml)	AP ^s (U/ml)	K	PF	Y (%)
1	10	1000	15	17,60	9,93	0,56	11,67	17,60
2	20	1000	15	11,40	13,93	1,22	0,45	78,19
3	10	6000	15	20,60	7,20	0,35	0,18	18,65
4	20	6000	15	17,00	33,47	1,97	0,52	212,11
5	10	1000	21	17,40	11,67	0,67	0,43	12,84
6	20	1000	21	6,93	1,73	0,25	0,41	9,15
7	10	6000	21	3,27	0,67	0,20	0,03	1,39
8	20	6000	21	9,67	9,33	0,97	0,69	60,96
9	15	4000	18	13,33	14,73	1,11	0,52	45,86
10	15	4000	18	18,33	17,13	0,93	4,03	37,33
11	15	4000	18	7,27	10,33	1,42	0,27	24,03
12	15	4000	18	12,93	21,80	1,69	0,58	59,37

MPEG– Massa Molar do PEG; CPEG– Concentração do PEG; C_{NaH₂PO₄}– Concentração do Fosfato de Sódio; K– Coeficiente de partição da atividade proteolítica; Y- Atividade de recuperação; PF– Fator de Purificação; APⁱ– Atividade Proteolítica na Fase Inferior; AP^s- Atividade Proteolítica na Fase Superior.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Dessa forma, o sistema que proporcionou as melhores condições de purificação foi o ponto 4 (tabela 2), sendo este utilizado para o teste na placa de fibrina, no qual verificou-se que apenas a fase inferior do extrato purificado permaneceu com a atividade fibrinolítica com a formação do halo translúcido. Isso demonstra que embora a afinidade da maioria das proteases presentes no extrato tenha sido pelo PEG, as proteases fibrinolíticas ficaram retidas na fase inferior (rica em sal). Esses resultados estão de acordo com Sales et al. (2013), que avaliaram o coeficiente de partição de proteases fibrinolíticas produzidas por *Bacillus* sp. UFPEDA 485 e verificaram que em todos os ensaios a enzima migrou para a fase inferior.

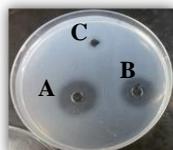


Figura 1. Atividade fibrinolítica do extrato purificado de *Penicillium implicatum* CFAM 0521. **A.** Extrato Bruto. **B.** Extrato purificado – Fase Inferior. **C.** Extrato purificado – Fase Superior

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que P. implicatum CFAM 521 produz metabólitos que podem ser usados como fonte de biomoléculas para o tratamento da trombose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASTRUP T, MULLERTZ S. 1952. The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity. Arch Biochem Biophys;40:346–51. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(52\)90121-5](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(52)90121-5).
- BACHA E, SANT'ANNA V, DAROITB DJ, CORRÊAA APF, SEGALINC J, BRANDELLI A 2012. Production, one step purification and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3, Process Biochemistry 47, 2455–62.
- BRADFORD MM 1976. 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.
- CAVALCANTI MTH, PORTO TS, NETO BB, LIMA-FILHO JL, PORTO ALF, PESSOA-JUNIOR A 2006. Aqueous two-phase systems extraction of α -toxin from *Clostridium perfringens* type A. Journal of Chromatography B 833135–140.
- FLEURI LF, SATO HH 2008. Study of different parameters in the production of Lytic enzymes. Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 28 299-310 pp.
- MANACHINI PL, FORTINA MG, PARINI C 1987. Purification and properties of an endopolygalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. Biotechnology Letters 9: 219-224.
- SHIRASAKA N, NAITOU N, OKAMURA K, KUSUDA M, FUKUTA Y, TERASHITA T 2012. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. Mycoscience 53:354–364.
- SPECIAN V, ORLANDELLI RC, FELBER AC, AZEVEDO JL; PAMPHILEA JA 2014. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, v.16(4), p.345-51