



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### **Ação Fibrinolítica de Proteases Produzidas por Bactérias Isoladas de Ambientes Amazônicos**

**Thayana Cruz de Souza<sup>1</sup>, Anni Kelle Serrão de Lima<sup>1</sup>, Michele Silva de Jesus<sup>1</sup>, Raimundo Felipe da Cruz Filho<sup>2</sup>, Ormezinda Celeste Cristo Fernandes<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Instituto Leônidas e Maria Deane-ILMD/Fiocruz/Amazonas, Rua Teresina, 476 - Adrianópolis, Manaus - AM, 69057-070. E-mail [thayanacruz@gmail.com](mailto:thayanacruz@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Avenida General Rodrigo Octávio, 6200 - Coroado I, Manaus - AM, 69077-000.

#### **RESUMO**

*A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna, pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados. Devido a isso, as proteases que podem interferir na coagulação do sangue têm sido investigadas a partir de várias fontes microbianas. Portanto, o objetivo desse trabalho foi isolar bactérias produtoras de proteases com ação fibrinolítica. A atividade proteolítica foi investigada em Agar leite. Em seguida, foi feita a fermentação submersa para obtenção do extrato bruto, a partir disso, realizou-se a quantificação da atividade proteolítica e avaliação quanto ao potencial fibrinolítico dos extratos em placa de fibrina. Das 150 amostras analisadas, 58% das culturas foram positiva para protease e 18% apresentaram ação fibrinolítica, destacando as espécies do gênero *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente. Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas de ambientes amazônicos são micro-organismos promissores para produção de proteases fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica.*

Palavras-chave: proteases, fermentação, fibrina, *Pseudomonas*

#### **INTRODUÇÃO**

A trombose é considerada uma das principais causas de doenças cardiovasculares na vida moderna (Silva et al. 2013; Ashis & Sudhir, 2011), pois pode levar a infarto cerebral e do miocárdio, devido à coágulos de sangue não lisados (Abidi et al. 2014).

Um certo número de proteases que pode interferir na coagulação do sangue tem sido purificada e caracterizada a partir de várias fontes, incluindo micro-organismos. Algumas destas proteases são enzimas fibrinolíticas capazes de digerir a fibrina (Sumi et al. 1995). Atualmente os agentes fibrinolíticos disponíveis para uso clínico são principalmente ativadores de plasminogênio, tais como o ativador de plasminogênio tissular, uroquinase e a estreptoquinase. Apesar da sua utilização generalizada, estes agentes apresentam baixa especificidade para fibrina, são muito caros e causam efeitos indesejados.

Consequentemente, a busca por enzimas fibrinolíticas para utilização na terapia contra trombose é um exercício contínuo, sendo que as proteases de origem microbiana são



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

preferidas em comparação as que são obtidas a partir de fontes vegetais e animais, uma vez que aquelas possuem quase todas as características desejadas para as suas aplicações biotecnológicas, tais como baixo tempo de produção, facilidade de cultivo e de manipulação genética (Abidi et al. 2014).

Neste sentido, esse estudo teve como objetivo isolar, identificar e incorporar na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM) culturas de bactérias produtoras de proteases, e investiga-las quanto à ação fibrinolítica.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### *Microrganismos e Investigação da Produção de Proteases*

Para este estudo foram utilizadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água. As amostras produtoras de proteases foram identificadas com o Kit de identificação BBL Cristal e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM/FIOCRUZ-Brasil).

Para obtenção do inóculo, as culturas foram subcultivadas em Agar Nutriente em placas de Petri ( $\varnothing=90\text{mm}\times 15\text{mm}$ ). Os cultivos foram mantidos a 37 °C por 24 horas (cultura estoque). A partir desta cultura, foi feito um inóculo central de cada amostra em Ágar Leite (Teixeira et al. 2011), para a investigação da produção de proteases. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. A formação de halos translúcidos ao redor da colônia indicou atividade positiva para enzima.

#### *Preparo do inóculo e obtenção do extrato enzimático*

A fermentação submersa foi realizada transferindo-se 1 mL da suspensão celular similar a escala de MC Farland 0,5 em frascos de Erlenmeyers (50 mL) contendo 30 mL da solução de Manachini (1987) suplementado com gelatina a 0,5%. A fermentação submersa foi conduzida em agitador orbital durante 24 h/150 rpm/37 °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 fostato 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*

Os extratos brutos com ação proteolítica foram submetidos ao método de 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 3 mm de espessura de gel de fibrina) foi preparada vertendo-se a mistura de 10 mL 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  $\mu\text{L}$  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 .



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisadas 150 culturas de bactérias isoladas de solo e água da região amazônica, das quais 58% foram produtoras de protease. Pode-se destacar as culturas de *Pseudomonas aeruginosa* CBAM 529 e CBAM 526 com 345 U/mL e 279 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente.

Quanto à atividade fibrinolítica, 18% das culturas apresentaram positividade no teste em placa de fibrina com variação de 7 a 27 mm no diâmetro dos halos. Pode-se destacar as amostras CBAM 516 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 529 *P. aeruginosa* (27 mm), CBAM 368 *Burkholderia cepacia* (26 mm), CBAM 519 *Serratia marcescens* (25 mm) e CBAM 546 *Bacillus cereus* (25 mm).

Todas as culturas que apresentaram ação proteolítica foram identificadas e incorporadas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM). Sendo mais prevalente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* com 45% e 32% de amostras isoladas e produtoras de enzima, respectivamente.

De acordo com Raju & Divakar (2014) o gênero *Bacillus* é um dos mais importantes entre os microrganismos que têm sido encontrados para produzir as enzimas fibrinolíticas. Ao longo do tempo, foram sendo descobertas enzimas fibrinolíticas de origem bacteriana, tais como a Nattokinase (NK) a partir de *B. natto* (Sumi et al. 1987) e Subtilisina DFE e subtilisin DJ- 4 a partir de *B. amyloliquefaciens* (Pegui et al. 2002). Outro estudo indica que a nattokinase também pode ser purificada a partir do sobrenadante da cultura de estirpe TKU015 de *Pseudomonas* sp. isolada a partir do solo e que apresenta elevada atividade sobre a fibrina (Wang et al., 2009).

Esses resultados sugerem que as bactérias isoladas na Amazônia e depositadas na CBAM são micro-organismos promissores para produção de enzimas fibrinolíticas que podem ser alternativas para aplicação farmacêutica no tratamento contra trombose.

### CONCLUSÕES

*Esse trabalho confirma o enorme potencial biotecnológico da biodiversidade brasileira, enfatizando as culturas bacterianas isoladas em ambientes amazônicos. Vale ressaltar que essas culturas capazes de produzir proteases com ação fibrinolítica e que podem ser usadas para o desenvolvimento de agentes terapêuticos estão mantidas na Coleção de Bactérias da Amazônia (CBAM), portanto, as informações contidas nesta coleção são recursos-chave para que o país possa utilizá-las no estabelecimento de estratégias rápidas e eficientes para o desenvolvimento científico e tecnológico.*

### 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).

SILVA GMM, MARQUES DAV, PORTO TS, FILHO JLL, TEIXEIRA JAC, JÚNIOR AP, PORTO ALF. Extraction of fibrinolytic proteases from *Streptomyces* sp. DPUA1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. Fluid Phase Equilibria 339 p. 52– 57.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

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.

Holden RW 1990 Plasminogen activators: Pharmacology and therapy. *Radiology* 174 993–1001

RAJU EVN, DIVAKAR G. 2014. An overview on microbial fibrinolytic proteases. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Vol. 5(3): 643-656.

TEIXEIRA, M.F.S., SILVA, T.A., PALHETA, R. A., CARNEIRO, A.L.B., ATAYDE, H.M. 2011. Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações biotecnológicas). Manaus. Edua.

SUMI H, NAKAJIMA N, YATAGAI C 1995 A unique strong fibrinolytic enzyme (datsuwoxinase) in skipjack “Shiokara”, a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.* 112B 543–547

SUMI H, HAMADA H, TSUSHIMA H, MIHARA H AND MURAKI H: 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*; 43(10): 1110- 1111.

PENG Y AND ZHANG YZ. 2002. Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme producing strain DC-4 from Chinese douche and primary analysis of the enzyme property. *Chin High Technol Lett* 2002; 12: 30-34.

WANG, S. et al. - A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. *Process Biochemistry*. 44:2009) 70–76.