



PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES FIBRINOLÍTICAS DE *Trichoderma koningiopsis* EM FERMENTAÇÃO SÓLIDA UTILIZANDO CASCA DE *Dipteryx lacunifera* Ducke

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE PROTEASAS FIBRINOLÍTICAS DE *Trichoderma koningiopsis* MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO CÁSCARA DE *Dipteryx lacunifera* Ducke

PRODUCTION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC PROTEASES FROM *Trichoderma koningiopsis* IN SOLID-STATE FERMENTATION USING *Dipteryx lacunifera* Ducke HULLS

Apresentação: Comunicação Oral

Edson Rodrigues Costa¹; José Pedro Martins Barbosa Filho²; Alice Maria Gonçalves Santos³ Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa⁴; Thiago Pajéu Nascimento⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/VIICIAGRO.0193>

RESUMO

A trombose constitui um relevante problema de saúde pública e demanda terapias fibrinolíticas eficazes, apesar do elevado custo e das limitações associadas aos fármacos disponíveis. Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo extrair, purificar e caracterizar proteases fibrinolíticas produzidas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10), utilizando como substrato a casca do fruto de *Dipteryx lacunifera* Ducke, resíduo abundante da atividade extrativista no ecótono Cerrado–Caatinga. As enzimas foram produzidas por fermentação em estado sólido, utilizando um planejamento fatorial 2^3 para determinar a influência dos parâmetros: quantidade do substrato (3, 5 e 7 gramas), umidade (30, 40 e 50%) e temperatura (25°C, 30°C e 35°C). Após a obtenção do extrato bruto, foi realizado a purificação através de um sistema de duas fases aquosas (SDFA), mediante um planejamento fatorial 2^3 , analisando as variáveis independentes: massa molar de PEG (MM_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}) e concentração de sulfato de magnésio (C_{MgSO_4}) sobre as variáveis respostas: coeficiente de partição (K), rendimento (Y) e fator de purificação (FP). Em seguida, foi realizado a atividade fibrinolítica da enzima purificada e a caracterização bioquímica parcial avaliando efeitos da temperatura e pH na atividade fibrinolítica da enzima. As condições que proporcionaram maior rendimento na obtenção da enzima foram 7 g de substrato, 50% de umidade e 25 °C. Quanto a purificação pelo Sistema de Duas Fases Aquosas, verificou uma partição preferencial da protease fibrinolítica na fase rica em polietilenoglicol. A caracterização bioquímica indicou temperatura ótima de 40 °C, pH ótimo igual a 6 e capacidade fibrinolítica comprovada por ensaio de degradação de fibrina. Os resultados evidenciam o potencial do uso de resíduos regionais como substrato para a produção de enzimas de interesse farmacológico, embora haja necessidade de estudos complementares, especialmente análises toxicológicas, para futuras aplicações terapêuticas.

Palavras-Chave: Resíduos agroindustriais, atividade fibrinolítica, planejamento fatorial, sistema de duas fases aquosas, hidrólise de fibrina.

RESUMEN

¹ Licenciatura em Ciências Biológicas, CPCE - Universidade Federal do Piauí, edsonrodrigues@ufpi.edu.br

² Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, pedro.martinsf@ufpe.br

³ Docente do Colegiado de Agronomia, CPCE – Universidade Federal do Piauí, alicemgsantos@ufpi.edu.br

⁴ Docente do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, romero.brandao@upe.br

⁵ Docente do Colegiado de Ciências Biológicas, CPCE - Universidade Federal do Piauí, thiagopajeu@ufpi.edu.br

La trombosis constituye un problema de salud pública significativo y requiere terapias fibrinolíticas efectivas, a pesar del alto costo y las limitaciones asociadas con los fármacos disponibles. Ante este escenario, este trabajo tuvo como objetivo extraer, purificar y caracterizar proteasas fibrinolíticas producidas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10), utilizando la cáscara del fruto de *Dipteryx lacunifera* Ducke como sustrato, un residuo abundante de las actividades extractivas en el ecotono Cerrado-Caatinga. Las enzimas se produjeron por fermentación en estado sólido, utilizando un diseño factorial 2^3 para determinar la influencia de los parámetros: cantidad de sustrato (3, 5 y 7 gramos), contenido de humedad (30, 40 y 50%) y temperatura (25°C, 30°C y 35°C). Después de obtener el extracto crudo, se realizó la purificación utilizando un sistema acuoso de dos fases (ATPS), empleando un diseño factorial 2^3 . Las variables independientes analizadas fueron: masa molar de PEG (MMPEG), concentración de PEG (CPEG) y concentración de sulfato de magnesio (CMgSO₄). Las variables de respuesta fueron: coeficiente de partición (K), rendimiento (Y) y factor de purificación (PF). Posteriormente, se determinó la actividad fibrinolítica de la enzima purificada y se realizó su caracterización bioquímica parcial, evaluando los efectos de la temperatura y el pH sobre dicha actividad. Las condiciones que proporcionaron el mayor rendimiento enzimático fueron 7 g de sustrato, 50 % de humedad y 25 °C. La purificación mediante el sistema acuoso de dos fases mostró una partición preferencial de la proteasa fibrinolítica en la fase rica en polietilenglicol. La caracterización bioquímica indicó una temperatura óptima de 40 °C, un pH óptimo de 6 y una capacidad fibrinolítica confirmada mediante un ensayo de degradación de fibrina. Los resultados resaltan el potencial del uso de residuos regionales como sustrato para la producción de enzimas de interés farmacológico, si bien se requieren estudios adicionales, especialmente análisis toxicológicos, para futuras aplicaciones terapéuticas.

Palabras clave: Residuos agroindustriales, actividad fibrinolítica, diseño factorial, sistema acuoso de dos fases, hidrólisis de fibrina.

ABSTRACT

Thrombosis is a significant public health issue requiring effective fibrinolytic therapies, despite the high costs and limitations associated with currently available drugs. Given this context, this study aimed to extract, purify, and characterize fibrinolytic proteases produced by *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10) using fruit husks from *Dipteryx lacunifera* Ducke—an abundant waste product of extractive activities in the Cerrado–Caatinga ecotone—as the substrate. The enzymes were produced via solid-state fermentation, employing a 2^3 factorial design to determine the influence of three parameters: substrate quantity (3, 5, and 7 g), moisture content (30%, 40%, and 50%), and temperature (25°C, 30°C, and 35°C). Following crude extract recovery, purification was performed using an aqueous two-phase system (ATPS) based on a 2^3 factorial design; the independent variables analyzed were PEG molar mass (MMPEG), PEG concentration (CPEG), and magnesium sulfate concentration (CMgSO₄), while the response variables were partition coefficient (K), yield (Y), and purification factor (PF). Subsequently, the fibrinolytic activity of the purified enzyme was assessed, and partial biochemical characterization was conducted to evaluate the effects of temperature and pH on this activity. The conditions yielding the highest enzyme recovery were 7 g of substrate, 50% moisture, and 25°C. Regarding purification via the aqueous two-phase system, preferential partitioning of the fibrinolytic protease into the polyethylene glycol-rich phase was observed. Biochemical characterization indicated an optimal temperature of 40°C and an optimal pH of 6, with fibrinolytic capacity confirmed through a fibrin degradation assay. The results demonstrate the potential of using regional residues as a substrate for the production of enzymes of pharmacological interest, although further studies—particularly toxicological analyses—are required for future therapeutic applications.

Keywords: Agro-industrial residues, fibrinolytic activity, factorial design, aqueous two-phase system, fibrin hydrolysis.

INTRODUÇÃO

A trombose é uma condição clínica de grande relevância global, afetando milhões de pessoas. Estima-se que, em todo o mundo, ocorram aproximadamente 10 milhões de casos relacionados a internações, independentemente do nível de desenvolvimento econômico dos países. No Brasil, a incidência anual situa-se entre um e dois casos por mil habitantes, correspondendo a até 400 mil novos diagnósticos por ano. Essa condição está diretamente associada a alterações na hemostasia, processo fisiológico essencial para manter a integridade do sistema circulatório e o equilíbrio do fluxo sanguíneo

(International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2022).

A hemostasia compreende três etapas interdependentes: a primária, caracterizada pela formação do tampão plaquetário; a secundária, definida pela deposição de fibrina ao redor desse tampão; e a terciária, ou fibrinólise, responsável pela degradação da fibrina formada. Em determinadas circunstâncias, esse sistema não atua de maneira adequada ou no momento oportuno, favorecendo o desprendimento do trombo. Uma vez deslocado pela corrente sanguínea, o trombo passa a ser denominado êmbolo, podendo desencadear eventos tromboembólicos graves, como acidente vascular cerebral (AVC), embolia pulmonar ou infartos em diversos órgãos, resultando em isquemia e morte celular (Rodrigues; Castilho-Fernandes; Fontes, 2012; Robbins; Cotran, 2016).

Nesse cenário, destaca-se a necessidade do uso de fármacos fibrinolíticos em doses terapêuticas para conter a trombose e prevenir suas complicações. Embora amplamente reconhecida como uma patologia de grande impacto mundial, o tratamento disponível apresenta desafios importantes, como elevados custos e potenciais efeitos adversos. No contexto brasileiro, as terapias mais utilizadas envolvem heparina não fracionada (HNF), heparinas de baixo peso molecular (HBPM), fondaparinux, anticoagulantes orais e antagonistas da vitamina K (AVKs) (Sobreira *et al.*, 2024). No entanto, apesar da eficácia desses agentes, limitações relacionadas à acessibilidade, risco de sangramentos e necessidade de monitoramento reforçam a urgência de identificar fontes alternativas, seguras e economicamente viáveis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Hazare *et al.*, 2024; Peng; Yang; Zhang, 2005).

No Piauí, ocorre o ecótono Cerrado–Caatinga, uma região de transição entre dois importantes biomas e reconhecida por sua ampla biodiversidade. Entre as espécies vegetais encontradas nesse ambiente destaca-se *Dipteryx lacunifera* Ducke, conhecida como castanheira-de-burro, garampara ou fava-de-morcego. O fruto dessa árvore é tradicionalmente obtido por extrativismo e comercializado, sobretudo, nas feiras da cidade de Bom Jesus – PI. No entanto, a casca do fruto, que representa cerca de 60% de sua estrutura, é geralmente descartada (Carvalho *et al.*, 2008; Vieira-Júnior *et al.*, 2007; Cavalcante *et al.*, 2015) contribuindo para a geração de resíduos oriundos da atividade extrativista.

Além dessa espécie vegetal, também foi isolado na região o fungo *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10), microrganismo filamentoso pertencente à classe Sordariomycetes, do filo Ascomycota (Meyer; Mazaro; Silva, 2019). A literatura destaca o potencial do gênero na produção de enzimas de interesse farmacêutico (Elegbede, 2020; Shao *et al.*, 2018); contudo, não há registros do cultivo desse fungo por fermentação em estado sólido utilizando-se a casca do fruto de *Dipteryx lacunifera* Ducke como substrato. Diante disso, a utilização de resíduos extrativistas como substrato para o crescimento de fungos produtores de enzimas com atividade fibrinolítica desponta como uma abordagem promissora para pesquisas futuras.

Dessa forma, o cultivo do fungo sobre os resíduos gerados pelo extrativismo do fruto de *Dipteryx lacunifera* Ducke apresenta um potencial promissor para a produção de enzimas com atividade fibrinolítica. Assim, esta pesquisa tem como objetivo obter, purificar e caracterizar bioquimicamente proteases com ação fibrinolítica produzidas por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10), utilizando como substrato a casca do fruto da *D. lacunifera*, subproduto abundante da atividade extrativista local.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

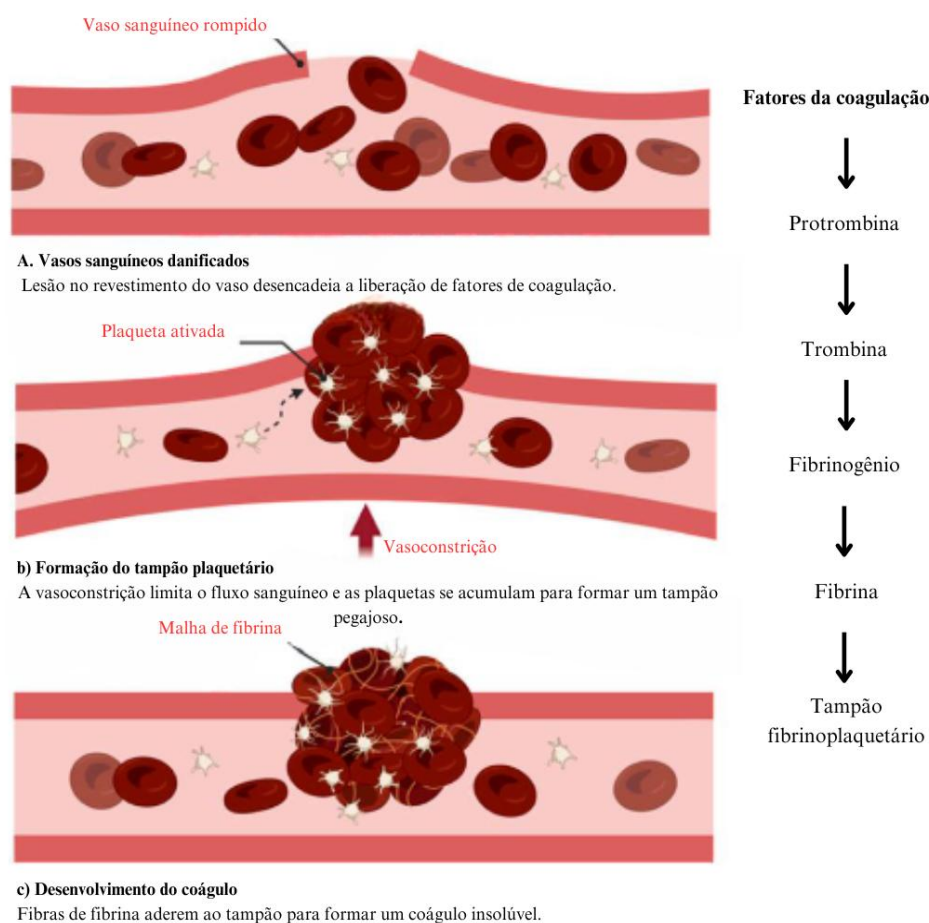
Hemostasia

A hemostasia é o processo natural de cessação de um sangramento, envolvendo a interação entre a parede vascular, plaquetas e o sistema de coagulação sanguínea (Figura 01), mas também pode ser induzida artificialmente por meio de ligaduras ou cauterização do vaso lesado (Filho, 2016). Esse mecanismo visa preservar a integridade dos vasos sanguíneos e garantir a fluidez do sangue após uma lesão vascular, mantendo o equilíbrio do sistema circulatório. Naturalmente, a hemostasia ocorre por meio de componentes hemostáticos, como o endotélio vascular, plaquetas, micropartículas e fatores plasmáticos pró-coagulantes, que formam um tampão fibrinoplaquetário para prevenir ou evitar a perda de sangue (Rodrigues; Castilho-Fernandes; Fontes, 2012; Robbins; Cotran, 2016).

A hemostasia primária consiste na formação do trombo, sendo seus principais atores o endotélio, as plaquetas (em número adequado e forma funcional), as micropartículas e o fator de von Willebrand (FvW) (Filho, 2016). O evento inicial desse processo é a vasoconstrição que ocorre por ação de fatores neuro-humorais locais, induzindo a contração transitória do vaso. Em seguida, as plaquetas são ativadas ao entrar em contato com a matriz extracelular (MEC) exposta no local da lesão, interagindo por meio dos receptores de glicoproteínas Ib (GpIb) com o FvW presente na MEC. Essa ativação ocorre via sinalização intracelular, expondo glicoproteínas e integrinas, que formam ligações com o FvW, o colágeno e a fibronectina (Robbins; Cotran, 2016; Filho, 2016).

A hemostasia secundária envolve o modelo clássico da cascata de coagulação, um processo complexo no qual fatores específicos são ativados por meio das vias extrínseca e intrínseca, convergindo na via comum. Esse mecanismo culmina na formação de um coágulo de fibrina insolúvel, essencial para a estabilidade do trombo. Cada etapa da cascata de coagulação envolve uma enzima (um fator da coagulação ativado), um substrato (a forma pró-enzima inativa de um fator da coagulação) e um cofator (um acelerador da reação), que juntos garantem a progressão eficiente do processo (Rodrigues; Castilho-Fernandes; Fontes, 2012; Periyah, 2017).

Figura 01: Representação da formação de coágulo para cessar hemorragia após lesão da parede vascular (hemostasia).



Fonte: Adaptado de Hazare *et al.* (2024).

Dentre os fatores de coagulação, a trombina destaca-se como o mais importante, desempenhando múltiplas funções enzimáticas que regulam diversos aspectos da hemostasia. Ao final da cascata de coagulação, o organismo ativa o processo de fibrinólise, realizada pela atividade enzimática da plasmina, que quebra a fibrina e interfere na sua polimerização. Quando o organismo não ativa o processo de fibrinólise em tempo adequado, o trombo formado para conter a hemorragia pode se desprender do local de origem e formar um êmbolo, o que pode resultar em complicações tromboembólicas (Robbins; Cotran, 2016).

Gênero *Trichoderma*

Os ecótonos, áreas de transição entre diferentes ecossistemas ou biomas, evidenciam mudanças nas condições abióticas e bióticas em nível local e regional. No Piauí, destaca-se uma rica biodiversidade representada pelo ecótono Cerrado-Caatinga, onde 37% da vegetação que recobre o estado pertence à caatinga e 46% ao cerrado (Oliveira; Malhi, 2016; Castro *et al.*, 2007).

Dentre os organismos encontrados na região, destacam-se os do gênero *Trichoderma* (Figura 02), classificado na classe Sordariomycetes, do filo Ascomycota. Nas espécies em que a fase sexuada é conhecida, esta se caracteriza pela formação de corpos de frutificação do tipo peritécio, desenvolvidos em estromas com coloração variada, como verde, amarelada, creme ou marrom, sobre o substrato colonizado (Meyer; Mazaro; Silva, 2019).

Figura 02: *Trichoderma koningiopsi* (UFPIT10) cultivado em placa de Petri.



Fonte: Própria (2026).

O gênero *Trichoderma* apresenta ampla distribuição em diferentes ecossistemas e, atualmente, graças aos avanços da filogenia molecular, já foram identificadas mais de 200 espécies. No Brasil, *Trichoderma* tem sido amplamente utilizado na agricultura, destacando-se como agente de biocontrole no manejo de doenças de plantas e como promotor de crescimento vegetal. Sua adaptabilidade às condições ambientais do país e sua eficiência em diferentes culturas agrícolas consolidam seu papel como uma ferramenta sustentável para a produção agrícola (Atanasova, 2014; Meyer; Mazaro; Silva, 2019).

Além de sua aplicação na agropecuária, o gênero *Trichoderma* tem demonstrado potencial biotecnológico para a produção de fármacos, conforme apresentado nos trabalhos de Elegbede *et al.* (2020) e Shao *et al.* (2018). Dessa forma, *Trichoderma* torna-se uma alternativa na busca por novas fontes de enzimas com atividade fibrinolítica, uma vez que está disponível na região onde será desenvolvida a presente pesquisa.

***Dipteryx lacunifera* Ducke**

O ecótono Cerrado-Caatinga é diverso e possui uma biodiversidade rica e com potencial agroindustrial e extrativista, o que resulta também na formação de resíduos que podem servir como

fonte de enzimas. Considerando os recursos vegetais disponíveis destaca-se a castanheira do Gurguéia (*Dipteryx lacunifera* Ducke) (Figura 03), espécie popularmente conhecida como castanheira de burro, garampara ou fava de morcego que se encontra dispersa principalmente nos cerrados do Sul e Centro-sul do Piauí. Apesar de sua ampla presença na região, a espécie é pouco conhecida em outras partes do Nordeste, o que pode explicar a escassez de estudos sobre suas atividades biológicas e seu potencial biotecnológico (Carvalho *et al.*, 2008; Vieira-Júnior *et al.*, 2007; Cavalcante *et al.*, 2015).

Figura 03: Árvore adulta da *Dipteryx lacunifera* Ducke com frutos.



Fonte: Própria (2026).

A espécie pertence à Família Fabaceae e é caracterizada pela produção de frutos do tipo cápsula lenhosa, de formato ovóide, pericarpo lenhoso, coloração amarronzada e elevada resistência. No interior desses frutos encontra-se uma amêndoa comestível de coloração marrom-escuro, que apresenta sabor agradável e alto valor nutricional, sendo uma importante fonte de energia, carboidratos, proteínas e fibras brutas. Suas folhas possuem raque foliar com comprimento de 10 a 20 cm e de 8 a 14 folíolos. As flores apresentam cálices membranáceos, com coloração alvo-esverdeada, pontuações verrucosas presentes e tamanho de 6 a 15 mm de comprimento (Carvalho; Lima; Cardoso, 2025; Vieira-Júnior *et al.*, 2007).

Trabalhos realizados por Vieira-Júnior *et al.* (2007) e Polmann *et al.* (2024) propuseram a caracterização do óleo essencial extraído do fruto da castanheira, demonstrando seu potencial para aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Além disso, há registros de pesquisas em desenvolvimento que já demonstraram o potencial dos extratos produzidos a partir da casca do fruto

na atividade enzimática fibrinolítica, coagulação do leite, nutrição animal, tratamento de sementes (Sousa *et al.*, 2024) e atividade anticoagulante.

Fermentação em Estado Sólido

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo trifásico complexo e heterogêneo (gás-líquido-sólido), geralmente definido como o crescimento de microrganismos, frequentemente fungos, na superfície de partículas de substrato sólido, poroso e úmido. Nesse sistema, há umidade suficiente para sustentar o crescimento e o metabolismo microbiano, embora o processo ocorra na ausência ou quase ausência de água líquida visível entre as partículas. A utilização de resíduos na produção de enzimas por meio de FES reduz a poluição ambiental e possibilita a obtenção de produtos de alto valor agregado, empregando uma tecnologia econômica e sustentável (Ruiz, *et al.*, 2012; Diaz, *et al.*, 2016).

Além disso, a FES apresenta-se como uma alternativa superior à fermentação submersa, pois utiliza resíduos agrícolas complexos e heterogêneos como substratos, empregando uma tecnologia de baixo custo, especialmente em relação às exigências de esterilidade e regulamentação. Essa abordagem também se aproxima das condições naturais dos microrganismos, simulando o ambiente de vida de muitos fungos filamentosos superiores (Holker; Lenz, 2005). Até 2018, o Brasil destacava-se como o país com o maior número de publicações utilizando a FES para a produção de enzimas a partir de resíduos agroindustriais, os quais, por muito tempo, foram subvalorizados (Santos *et al.*, 2018).

A literatura atual apresenta diversas pesquisas utilizando a FES na produção de enzimas levando em consideração a diminuição de resíduos, como Khaswal *et al.*, (2024); Zou *et al.*, (2024); Munoz-Seijas *et al.*, (2024) e Ferreira *et al.*, (2024). Esses trabalhos reforçam o potencial da FES na extração de enzimas utilizando microrganismos e o seu benefício ao meio ambiente e à sociedade.

Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

O Sistema de Duas Fases (SDFA) é uma técnica utilizada para a purificação de enzimas, permitindo sua separação com base em características como tamanho, carga, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica. Nesse processo, ocorre a transferência de um soluto entre duas fases líquidas, caracterizando-se como uma abordagem adequada para as etapas iniciais de separação. Dependendo da aplicação final do produto a ser purificado, o SDFA pode substituir etapas cromatográficas (Silva; Low, 2006).

À medida que os polímeros são misturados a um sal de alta força iônica, formam-se grandes agregados, e a interação entre eles leva à separação em duas fases distintas, resultante do efeito de exclusão estérica. O polietilenoglicol (PEG) é um polímero amplamente recomendado para a

recuperação de produtos biológicos devido à presença de seus grupos hidroxila. Este polímero junto a uma alta concentração de sais, como fosfatos, citratos e sulfatos, que capturam uma grande quantidade de água, são amplamente utilizados no SDFA (Asenjo; Andrews, 2011; Blatkiewicz *et al.*, 2018). Deste modo, o SDFA composto por sal e PEG é o mais utilizado na separação de biomoléculas. Para a purificação de enzimas fibrinolíticas, o SDFA tem demonstrado bons resultados, como demonstrado por Nascimento *et al.* (2016) e Alencar *et al.* (2021).

METODOLOGIA

Microrganismo, meio de manutenção e esporulação

O fungo filamentoso *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10) utilizado neste trabalho foi isolado do ecótono Cerrado-Caatinga (SISGEN A8431AA), localizada na região Sudoeste do Estado do Piauí, Brasil com coordenadas geográficas de Latitude 8°51'7.48" S e Longitude 44°11'39.95" W.

Inoculação

Os esporos foram coletados utilizando uma solução nutritiva composta por 0,5% de extrato de levedura, 1% de glicose e 0,01% de Tween 80, diluídos em tampão de fosfato de sódio 245 mM, previamente esterilizado, com pH 7,0. A contagem dos esporos foi realizada em uma câmara de Neubauer, para obtenção final de uma concentração de 10^7 esporos/mL.

Tratamento do substrato para fermentação

A casca do fruto da *Dipteryx lacunifera* Ducke foi coletada a partir dos resíduos gerados pelos feirantes da cidade de Bom Jesus - PI. Após a obtenção da casca, ela foi seca ao sol por uma semana e, em seguida, triturada no moinho do laboratório de nutrição animal da UFPI-CPCE. Posteriormente, o material foi padronizado com tamizes de 2 mm e 1 mm, a fim de padronizar o substrato de forma uniforme. O material que ficou retido entre as peneiras de 2 mm e 1 mm foi utilizado como substrato para a FES.

Produção da protease fibrinolítica através da Fermentação em estado sólido

A fermentação em estado sólido seguiu a metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2016): os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo o substrato selecionado, que foram autoclavados por 20 minutos a 121°C. O substrato foi umedecido, conforme necessário, com solução nutritiva e água para atingir a umidade desejada. Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 para determinar a influência dos parâmetros: quantidade do substrato (3, 5 e 7 gramas), umidade (30, 40 e 50%) e temperatura (25°C, 30°C e 35°C). Após a inoculação (10^7 esporos/mL), os

frascos foram incubados por 72 horas de fermentação.

Extração das proteases e obtenção do extrato bruto

Seguindo a metodologia descrita por Nascimento *et al.* (2016), foram adicionados 7,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (245 mM) para cada 1 g de substrato, e os frascos foram colocados em um agitador orbital a 150 rpm por 60 min em temperatura ambiente. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado a 3500 rpm por 10 min, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade enzimática.

Purificação pelo Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA)

Para a purificação das proteases fibrinolítica foi utilizado o Sistema de duas fases aquosas (SDFA) que foi preparado em tubos graduados de 15 mL com diferentes concentrações de soluções de mistura de sais de sulfato de magnésio e 50% (p/p) de soluções de Polietilenoglicol conforme um planejamento fatorial 2^3 , onde foram analisadas as variáveis: massa molar de PEG (MM_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}) e concentração de sulfato de magnésio (C_{MgSO_4}) sobre as variáveis respostas: coeficiente de partição (K), rendimento (Y) e fator de purificação (FP).

O coeficiente de partição da protease (K) foi determinada pela razão entre as atividades da protease na fase superior (F_{PEG}) e na fase inferior (F_{SAL}):

$$K = \frac{F_{PEG}}{F_{SAL}}$$

A recuperação enzimática (Y) foi determinada como a razão da atividade proteásica na fase superior (AP_{PEG}) ou inferior (AP_{SAL}) sobre seu respectivo volume (V_{PEG}) ou (V_{SAL}), tudo isso sobre a atividade proteásica presente no extrato bruto (AP_{bruto}) dividida pelo seu respectivo volume do extrato adicionado no sistema e posteriormente multiplicado por 100 para representação da recuperação em porcentagem:

$$Y = \left(\frac{\frac{AP_{PEG}}{V_{PEG}} \text{ ou } \frac{AP_{SAL}}{V_{SAL}}}{AP_{bruto}} \right) \times 100$$

O fator de purificação (FP) foi definido como a atividade específica da protease presente da fase PEG (AE_{PEG}) ou sal (AE_{SAL}) sobre a atividade específica do extrato bruto (AE_{bruto}):

$$FP = \frac{AE_{PEG}/AE_{SAL}}{AE_{bruto}}$$

Posteriormente, foi realizado a análise das influências de todas as variáveis (massa molar e concentração do PEG e concentração do sal) sobre a purificação da protease.

Determinação da atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada seguindo o protocolo descrito por Ginther *et al.* (1979). Amostras de 1 mL do ensaio, contendo Tris-HCl 0,2 M (pH 7,2), 10^{-3} M de CaCl_2 , 1,0% (p/p) de azocaseína e 150 μL do extrato bruto com a enzima, foram incubadas a 28°C por 1 hora. A reação será interrompida pela adição de 1,0 mL de uma solução de ácido tricloroacético a 10% (p/v). Após centrifugação a $3000 \times g$ por 15 minutos, uma alíquota de 0,8 mL do sobrenadante foi transferida para um segundo tubo contendo 0,2 mL de NaOH 1,8 N. As amostras foram misturadas em um vórtex, e a absorbância foi medida a 420 nm. A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância por hora.

Avaliação da atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica foi determinada através do ensaio de degradação de fibrina de modo espectrofotométrico conforme a metodologia de Wang, Wu e Liang (2011).

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Efeitos da temperatura e pH na atividade proteásica

O efeito da temperatura foi avaliado adaptando a metodologia de Nascimento *et al.* (2016), incubando a enzima fibrinolítica em diferentes temperaturas variando de 10°C a 70°C por 60 minutos. E para determinação do pH ótimo, foi utilizado diferentes soluções tampão a 0,2 M: acetato-citrato (pH 3, 4 e 5), Tris-HCl (pH 6, 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 8, 9 e 10). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção enzimática

Fatores como umidade, quantidade de resíduos e temperatura foram utilizados para otimizar a produção da protease. Em todos os ensaios houve o crescimento do fungo sob o substrato, apresentando atividades proteolíticas que variaram de 3,36 U/mL a 17,26 U/mL (Tabela 1).

Tabela 01: Resultados da produção de protease fibrinolítica por *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10) utilizando planejamento fatorial 2³ em 72h.

Ensaio	Quantidade de resíduos (g)	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Atividade proteásica
1	3	30	25	8,06
2	7	30	25	11,13
3	3	50	25	13,83
4	7	50	25	17,26
5	3	30	35	11,26
6	7	30	35	10,63
7	3	50	35	11,60
8	7	50	35	12,30
9	5	40	30	10,46
10	5	40	30	5,66
11	5	40	30	3,36
12	5	40	30	8,49

Fonte: Própria (2026).

O maior valor observado (17,26 U/mL) ocorreu no Ensaio 4, conduzido com 7 g de substrato, 25 °C e 50% de umidade, demonstrando que essas condições favoreceram a síntese e a liberação das proteases pelo fungo.

A literatura aponta que fungos filamentosos desse gênero exibem elevada capacidade de secretar enzimas hidrolíticas quando cultivados sobre resíduos agroindustriais, devido à sua versatilidade metabólica e à adaptação às condições de baixa disponibilidade hídrica (Yang *et al.*, 2013; Manzar *et al.*, 2022). Os resíduos utilizados nesta pesquisa são oriundos da atividade extrativista, todavia, assumem a mesmas propriedades dos resíduos agroindustriais comumente utilizados, tendo em vista a origem vegetal.

Barreiro *et al.* (2025), apresentou o *T. koningiopsis* com uma produção significativa de proteases em FES utilizando resíduos de frutos de *Pritchardia pacifica*, reforçando que esse grupo de microrganismos apresenta desempenho robusto em sistemas fermentativos sólidos. Dessa forma, o valor máximo obtido no presente trabalho confirma que condições moderadas de umidade e temperatura favorecem a secreção de proteases por *Trichoderma*, alinhando-se às tendências observadas na literatura.

A condição ótima registrada neste estudo (50% de umidade) também encontra respaldo na literatura, que destaca a importância da atividade de água como fator essencial para a difusão de nutrientes e manutenção da fisiologia do fungo durante a FES. Londoño-Hernandez *et al.* (2020) enfatizam que valores intermediários de umidade são ideais para maximizar a produção de enzimas microbianas, pois a água em excesso reduz a porosidade do meio, enquanto baixa umidade limita o crescimento micelial.

A temperatura de 25 °C utilizada no ensaio de maior rendimento também se mostra compatível com o comportamento de espécies de *Trichoderma*, visto que Barreiro *et al.* (2025) observaram estabilidade térmica das proteases de *T. koningiopsis* entre 20 °C e 50 °C, indicando que temperaturas moderadas são favoráveis à síntese e manutenção da atividade enzimática. Além disso, a massa de substrato utilizada (7 g) provavelmente favoreceu a formação de um microambiente ideal para o crescimento micelial, fornecendo suporte físico, boa aeração e disponibilidade equilibrada de nutrientes, elementos essenciais para a produção enzimática em FES, conforme discutido por Sousa *et al.* (2024) e Santana *et al.* (2022).

No Ensaio 4, embora o cultivo tenha sido mantido por 72 horas, a maior atividade proteásica foi registrada em 48 horas, indicando que o pico de produção da enzima ocorreu antes do término do período fermentativo. Esse comportamento é esperado em processos de fermentação fúngica, nos quais a síntese de proteases tende a atingir seu máximo durante a fase de crescimento ativo do microrganismo, diminuindo posteriormente em razão do esgotamento nutricional ou de mudanças no metabolismo. Vale ressaltar que o tempo necessário para atingir a produção ideal pode variar conforme o tipo de microrganismo, os substratos utilizados para a indução da síntese da protease e as condições ambientais controladas no processo (Jamilu *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023), o que explica por que o pico ocorreu em 48 horas nas condições avaliadas.

Purificação por Sistema de Duas Fases Aquosas

Dos 12 ensaios (tabela 2) realizados, verificou-se que apenas os ensaios 1 e 2 não formaram duas fases, resultado esperado em sistemas com baixas concentrações de PEG e sal. De acordo com Albertsson (1970), condições de concentração abaixo do ponto crítico impedem a separação de fases, pois não há segregação suficiente entre polímero e sal para estabelecer um sistema bifásico estável. Assim, os resultados iniciais corroboram o comportamento clássico descrito para SDFA.

Nos demais ensaios, a formação clara das fases PEG e sal permitiu a avaliação da partição da protease. Observou-se que, em todos eles, o coeficiente de partição (K) foi superior a 1, evidenciando a migração preferencial da enzima para a fase PEG. Esse comportamento é amplamente descrito na literatura: enzimas com caráter moderadamente hidrofílico tem tendência a interagir com polímeros neutros tendem a migrar para a fase rica em PEG (Asenjo; Andrews, 2011). O desempenho observado no ensaio 7, com o maior valor de K, indica que a combinação entre concentração intermediária de PEG e sal favoreceu a exclusão da protease da fase salina, aumentando sua afinidade pelo PEG.

Em contrapartida, o ensaio 5 apresentou o menor coeficiente de partição dentre os sistemas

bifásicos, embora ainda com $K > 1$. Esse resultado pode estar associado à menor força de segregação entre as fases, já que a literatura mostra que combinações de PEG de baixa massa molar e baixa concentração de sal reduzem a desigualdade de polaridade entre as fases (Rito-Palomares, 2004), diminuindo a eficiência da partição. Quanto à recuperação enzimática, observou-se que a maior parte da atividade permaneceu na fase PEG em praticamente todos os ensaios, com Y_{PEG} significativamente superior ao observado para a fase salina (Y_{SAL}).

Tabela 02: Particionamento da protease fibrinolítica obtida de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10) por SDFA PEG-Sulfato utilizando um planejamento fatorial completo 2^3 .

Ensaios	MM_{PEG}	$C_{PEG}(\%)$	$C_{SAL}(\%)$	AP_{PEG} (U/ml)	AP_{SAL} (U/ml)	K	$Y_{PEG}(\%)$	$Y_{SAL}(\%)$	FP_{PEG}	FP_{SAL}
1	1500	9,0	5,0	*	*	*	*	*	*	*
2	10000	9,0	5,0	*	*	*	*	*	*	*
3	1500	15,0	5,0	9,86	8,66	1,13	114,29	20,07	0,80	0,13
4	10000	15,0	5,0	6,66	5,00	1,31	57,92	20,54	0,13	0,08
5	1500	9,0	6,6	12,40	5,20	2,38	132,86	18,07	1,01	0,10
6	10000	9,0	6,6	5,40	5,30	1,02	44,32	30,89	0,12	0,09
7	1500	15,0	6,6	12,40	2,50	4,89	143,64	7,33	0,74	0,03
8	10000	15,0	6,6	5,80	5,40	1,07	54,36	18,99	0,12	0,07
9	20000	12,0	5,8	16,50	5,06	3,26	153,21	26,41	0,76	0,08
10	20000	12,0	5,8	8,30	6,13	1,43	79,00	24,86	0,80	0,10
11	20000	12,0	5,8	10,50	4,20	2,46	97,61	19,77	0,52	0,07
12	20000	12,0	5,8	24,53	5,60	4,38	227,35	25,94	1,43	0,08

Legenda: * ensaio que não ocorreu a formação de fases

Fonte: Própria (2026).

MM_{PEG} - massa molar do PEG (g/mol); C_{PEG} - concentração do PEG (% m/m); C_{sal} – concentração do sulfato de magnésio (% m/m); AP_{PEG} – Atividade proteásica na fase PEG; AP_{SAL} – Atividade proteásica na fase Sal; K - coeficiente de partição; Y_{PEG} – recuperação enzimática no PEG; Y_{SAL} – recuperação enzimática no SAL; FP_{PEG} – fator de purificação da protease na fase PEG; FP_{SAL} – fator de purificação da protease na fase SAL.

Atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica foi avaliada utilizando como material a fase que apresentou maior atividade proteásica no SDFA, correspondente ao ensaio 12 da tabela 2. O ensaio foi incubado por 60 minutos; foi possível observar a dissolução do coágulo já a partir dos primeiros 20 minutos, indicando, de modo qualitativo, uma ação fibrinolítica rápida do extrato enzimático. Ao término do período experimental (60 min), a atividade fibrinolítica quantificada apresentou valor igual a 0,458 U/mL.

O fato de a fase escolhida ter apresentado elevada atividade proteásica e, simultaneamente,

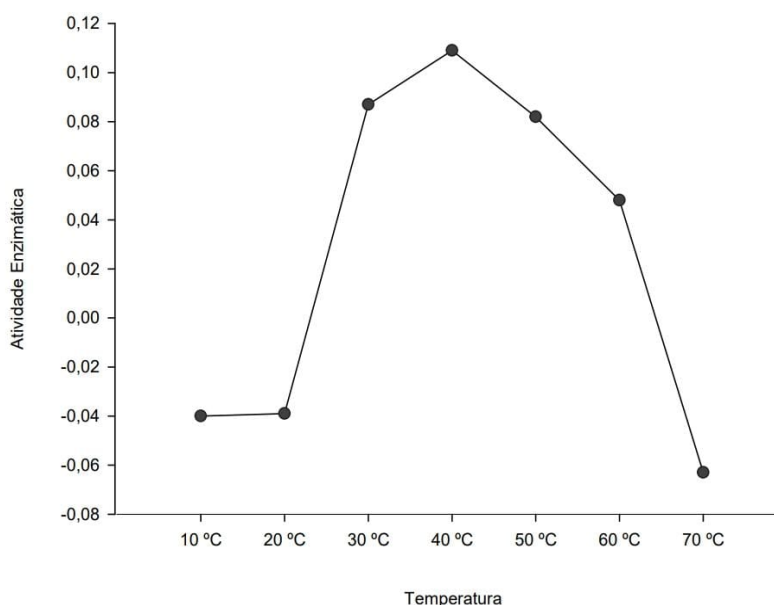
demonstrado atividade fibrinolítica substancial, sugere que a enzima ou o conjunto de enzimas presentes possui especificidade suficiente para agir sobre a fibrina, característica desejável quando se busca agentes com potencial terapêutico anti-trombótico.

Os sistemas aquosos bifásicos constituem uma alternativa econômica e eficiente para a recuperação e purificação inicial de proteases fibrinolíticas, como demonstrado por estudos com *Mucor subtilissimus* (PEG/sulfato) e por revisões sobre fungos produtores de enzimas trombolíticas (Nascimento *et al.*, 2016; Nascimento *et al.*, 2017; Cardoso, *et al.*, 2022). No presente trabalho, a migração preferencial da protease para a fase PEG e a recuperação enzimática satisfatória indicam que a fração obtida no ensaio 12 é adequada para ensaios de lise de coágulo. A dissolução visível do coágulo já aos 20 minutos e a atividade fibrinolítica quantificada de 0,458 U/mL aos 60 min demonstram que, mesmo com purificação preliminar, a enzima mantém capacidade trombolítica.

Caracterização da enzima purificada

A atividade proteásica foi avaliada em diferentes temperaturas, variando de 10 °C a 70 °C (Figura 04). Observou-se que a temperatura de 40 °C proporcionou a maior atividade enzimática, caracterizando-se como a temperatura ótima para o sistema estudado. Acima desse valor, especialmente a 70 °C, a enzima apresentou perda total da atividade proteásica, indicando sensibilidade térmica em condições mais elevadas. A estabilidade térmica em 40 °C foi monitorada durante 60 minutos, com medições a cada 15 minutos. A enzima manteve-se estável até aproximadamente 45 minutos, apresentando declínio gradual de atividade entre 45 e 60 minutos.

Figura 04: Avaliação da temperatura ótima da enzima fibrinolítica purificada.



Fonte: Própria (2026).

Comparando os resultados deste estudo com os de Barreiro *et al.* (2025), observa-se que, embora a temperatura ótima tenha diferido entre as pesquisas, 40 °C neste trabalho e 50 °C no estudo da autora, ambas as proteases de *T. koningiopsis* apresentaram melhor desempenho em temperaturas moderadas. A menor temperatura ótima verificada neste experimento pode estar relacionada ao substrato utilizado, uma vez que diferentes fontes nutricionais podem induzir a produção de enzimas com distintas sensibilidades térmicas. Além disso, a estabilidade observada a 40 °C por até 60 minutos demonstra desempenho térmico consistente, superando o padrão descrito por Barreiro *et al.* (2025), que relatou apenas estabilidade dentro de uma faixa térmica específica (20–40 °C).

A atividade proteásica apresentou variação expressiva ao longo dos diferentes valores de pH avaliados, evidenciando a sensibilidade da enzima às condições ácido-básicas do meio. Observou-se que a atividade foi baixa em pH muito ácido, apresentou aumento progressivo até atingir seu valor máximo em pH 6 e voltou a diminuir em pH mais elevados, incluindo a queda significativa em pH 9 e valores modestos em pH 10 e 11 (Tabela 03)

Tabela 03: Avaliação do pH ótimo da enzima fibrinolítica purificada.

pH	Atividade proteásica
3	13,11
4	14,22
5	25,55
6	45,73
7	31,91
8	24,48
9	10,80
10	11,37
11	16,22

Fonte: Própria (2026).

Esse comportamento está de acordo com o que afirmam Pacheco e Mendes (2021), segundo os quais cada enzima possui um pH ótimo específico, no qual sua atividade catalítica é maximizada. Quando o pH se afasta desse valor ideal, a atividade tende a diminuir porque ocorre alteração no estado de ionização dos grupos funcionais dos aminoácidos constituintes da enzima. Tais mudanças na ionização podem modificar a conformação tridimensional da proteína, afetando diretamente o sítio ativo e reduzindo sua capacidade de ligação e de transformação do substrato.

Assim, o pH 6 se destaca como o ponto em que os grupos funcionais relevantes para a catálise proteolítica se encontram em estado de ionização adequado para manter a conformação mais ativa da enzima. Já os valores extremos, tanto ácidos quanto alcalinos, provavelmente promovem protonações ou desprotonações inadequadas, levando a alterações estruturais que diminuem a eficiência catalítica, o que justifica os baixos níveis de atividade observados nesses pH.

CONCLUSÕES

A protease fibrinolítica foi obtida de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT10) em condições controladas que favoreceram a síntese e a liberação das enzimas pelo fungo. O cultivo em substrato proveniente de resíduo extrativista regional evidencia uma alternativa sustentável e promissora para bioprospecção enzimática e a etapa de otimização por meio de um planejamento fatorial possibilitou compreender melhor os fatores que influenciam no rendimento enzimático. A utilização de sistemas aquosos bifásico permitiu purificar parcialmente a enzima fibrinolítica e selecionar a fração mais adequada para caracterização bioquímica parcial que confirmou condições favoráveis de atividade enzimática e, o ensaio fibrinolítico demonstrou que a enzima possui capacidade de atuar sobre coágulos *in vitro* testados. Assim, os resultados apresentados constituem uma base sólida, mas ainda preliminar, para investigações futuras que deverão incluir análises toxicológicas e abordagens *in vivo* antes que se possa propor qualquer uso terapêutico concreto.

REFERÊNCIAS

- ALBERTSSON, Per-Åke. Partition of cell particles and macromolecules in polymer two-phase systems. **Advances in protein chemistry**, v. 24, p. 309-341, 1970.
- ALENCAR, V. N. S. *et al.* Purification and characterization of fibrinolytic protease from *Streptomyces parvulus* by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20210335, 2021.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826-8835, 2011.
- ATANASOVA, L. Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. In: **Biotechnology and biology of trichoderma**. Elsevier, p. 25-40, 2014.
- BARREIRO, M. E. L. *et al.* Caracterização parcial de uma nova protease proveniente de *Trichoderma koningiopsis* (UFPIT03) isolado do ecótono caatinga-cerrado piauiense obtida através de fermentação em estado sólido. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, v. 23, n. 2, p. e9060-e9060, 2025.
- BLATKIEWICZ, M. *et al.* Partitioning of laccases derived from *Cerrena unicolor* and *Pleurotus sapidus* in polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 165-174, 2018.

CARDOSO, K. B. B. *et al.* Systematic analysis on the obtaining of fibrinolytic fungi enzymes. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e13611225449-e13611225449, 2022.

CARVALHO, C.S.; LIMA, H.C.; CARDOSO, D.B.O.S. *Dipteryx* in Flora e Funga do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83123>. Acesso em: 1 de jul. de 2026.

CARVALHO, M. G. *et al.* Avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais de amêndoas de chichá, sapucaia e castanha-do-gurguéia. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 04, p. 517-523, 2008.

CASTRO, A. A. J. F. *et al.* Cerrados marginais do Nordeste e ecótonos associados. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. S1, p. 273-275, 2007.

CAVALCANTE, I. H. L. *et al.* Gurguéia nut: a new and potential fruit crop. **Comunicata Scientiae**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2015.

SANTANA, R.; S. *et al.* Cultivation conditions and biochemical characterization of the proteolytic enzymes with fibrinolytic action obtained from mushrooms in the last ten years. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e530111436652-e530111436652, 2022.

DIAZ, A. B. *et al.* Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 9555-9566, 2016.

ELEGBEDE, J. A. *et al.* Biofabrication of Gold Nanoparticles Using Xylanases Through Valorization of Corn cob by *Aspergillus niger* and *Trichoderma longibrachiatum*: Antimicrobial, Antioxidant, Anticoagulant and Thrombolytic Activities. **Waste Biomass Valor** 11, 781–791, 2020.

FERREIRA, M. *et al.* Valorization of Gelidium corneum by-product through solid-state fermentation. **Food and Bioproducts Processing**, 2024.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. ISBN: 9788527729420.

GINTHER, Charles L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 4, p. 522-526, 1979.

HAZARE, C. *et al.* Diverse origins of fibrinolytic enzymes: A comprehensive review. **Heliyon**, 2024.

HOLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - are there any biotechnological advantages?. **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301-306, 2005.

International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), 2022. Disponível em: <https://www.worldthrombosisday.org/>. Acesso em: 1 de jul. de 2026.

JAMILU, H. *et al.* Isolation, optimization and characterization of lipase producing bacteria from abattoir soil. **Int J Adv Sci Technol**, v. 3, p. 2708-7972, 2022.

KHASWAL, A. *et al.* Microbial enzyme production: Unlocking the potential of agricultural and food waste through solid-state fermentation. **Bioresource Technology Reports**, p. 101880, 2024.

LONDOÑO-HERNANDEZ, L. *et al.* Advantages and Progress innovations of solid-state fermentation to produce industrial enzymes. In: **Microbial enzymes: roles and applications in industries**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 87-113.

MANZAR, N. *et al.* Trichoderma: advent of versatile biocontrol agent, its secrets and insights into mechanism of biocontrol potential. **Sustainability**, v. 14, n. 19, p. 12786, 2022.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (orgs.). **Trichoderma: uso na agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 538 p, 2019. ISBN: 978-85-7035-943-8.

MUNOZ-SEIJAS, N. *et al.* Potential use of frass from edible insect *Tenebrio molitor* for proteases production by solid-state fermentation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 144, p. 146-155, 2024

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**, v. 1025, p. 16-24, 2016.

NASCIMENTO, T. P. *et al.* Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 40, n. 8, p.1209-1219, 2017.

OLIVERAS, I.; MALHI, Y. Many shades of green: the dynamic tropical forest–savannah transition zones. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1703, p. 20150308, 2016.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2021. ISSN 2177-4439.

PENG, Y.; YANG, X.; ZHANG. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, p. 126-132, 2005.

PERIAYAH, M. H.; HALIM, A. S.; SAAD, A. Z. M. Mechanism action of platelets and crucial blood coagulation pathways in hemostasis. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 11, n. 4, p. 319, 2017.

POLMANN, G. *et al.* Chemical characterization of gurguéia nut (*Dipteryx lacunifera* Ducke) and press cake oil obtained by hydraulic pressing and supercritical extraction. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 14, n. 16, p. 19065-19080, 2024.

RITO-PALOMARES, Marco. Practical application of aqueous two-phase partition to process development for the recovery of biological products. **Journal of Chromatography B**, v. 807, n. 1, p. 3-11, 2004.

ROBBINS, S.; COTRAN, R. S. **Patologia Bases patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro - RJ: Elsevier, 2016. ISBN 978-85-352-5577-5.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RUIZ, H. A. *et al.* Pectinase production from lemon peel pomace as support and carbon source in solid-state fermentation column-tray bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 65, p. 90-95, 2012.

SANTOS, P. S. *et al.* Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, p. 0181–0188, 2018.

SHAO, J. *et al.* Separation and Purification of a Tissue-Type Plasminogen Activator from *Trichoderma reesei*. **BioPharm International**, 2018.

SILVA, L. H. M. DA .; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.

SILVA, T. A. F. D. *et al.* Cost-effective fibrinolytic enzyme production by microalga *Dunaliella tertiolecta* using medium supplemented with corn steep liquor. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 95, p. e20220552, 2023.

SOBREIRA, Marcone Lima *et al.* Diretrizes sobre trombose venosa profunda da Sociedade Brasileira de Angiologia e Cirurgia Vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 23, p. e20230107, 2024.

SOUSA, T. O *et al.* Potencial biotecnológico de extratos metabólicos frente ao tratamento de sementes de *Urochloa brizantha* cv. MG-5. **OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA**, v. 22, n. 6, p. e5492-e5492, 2024.

VIEIRA-JÚNIOR, G. M. *et al.* Terpenes and fatty acids from *Dipteryx lacunifera* Ducke. **Química Nova**, v. 30, p. 1658-1662, 2007.

WANG, S. L.; WU, Y. Y.; LIANG, T. W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 196–202, 2011.

YANG, X. *et al.* Heterologous expression of an aspartic protease gene from biocontrol fungus *Trichoderma asperellum* in *Pichia pastoris*. **World Journal of microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 11, p. 2087-2094, 2013.

ZOU, L. *et al.* Advanced anaerobic digestion of household food waste pretreated by in situ-produced mixed enzymes via solid-state fermentation: Feasibility and application perspectives. **Environmental Research**, p. 119137, 2024.