



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

LORENA AZEVEDO DE LIMA

PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICAS PRODUZIDAS POR
***Bacillus* spp. DE SOLO AMAZÔNICO**

MANAUS-AM
2013

LORENA AZEVEDO DE LIMA

**PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICAS PRODUZIDAS POR
Bacillus spp. DE SOLO AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Wilson Castro Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Januário Gama dos Santos

**MANAUS-AM
2013**

LORENA AZEVEDO DE LIMA

**PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICAS PRODUZIDAS POR
Bacillus spp. DE SOLO AMAZÔNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Nome:
Instituição:

Nome:
Instituição:

Nome:
Instituição

**MANAUS-AM
2013**

Ficha Catalográfica

L732p Lima, Lorena Azevedo de.
Proteases com atividade colagenolíticas produzidas por *Bacillus* spp de solo Amazônico. – / Lorena Azevedo de Lima -
- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2013.
50f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas
- Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos
Naturais da Amazônia, 2013.
Orientador: Prof^o. Dr. Wilson Castro Silva.
Co-orientador: Prof^a. Dr. Januário Gama dos Santos

1. Protease colagenolítica 2. *Bacillus* spp 3. Planejamento
fatorial 4. Solo I. Título.

CDU: 631.4

Aos meus pais Maria Rozária e Washington Gomes

*“O êxito da vida não se mede pelo caminho
que você conquistou, mas sim pelas
dificuldades que superou no caminho.”*

Abraham Lincoln

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos dar força e velar-nos;

À minha família, pelo apoio e confiança sem indagações sobre minhas decisões;

Aos professores, Dr. Januário Gama dos Santos e Dr. Wilson Castro Silva, pela orientação, conhecimento, amizade, paciência e confiança;

Ao MSc Raimundo Felipe Cruz Filho, pelo apoio e realização dos meus estudos;

À professora Dr^a Maria Francisca Simas Teixeira, pelo apoio e confiança;

Às MSc, Larissa Kirsh e Nelly Vinhote, pela colaboração e paciência;

À Dr^a Hiléia dos Santos Barroso, pela compreensão e confiança;

À minha amiga Alessandra Cavalcante, pelo apoio nos altos e baixos;

Ao meu amigo Diego Freitas, pelo apoio na realização de cálculos e curvas padrões

A todos os meus amigos de mestrado e companheiros de laboratório, em especial ao Átila Souza, Jaqueline Souza, Raiane Áila, Tamiris Fonseca, Jéssica Barroncas, Aaron Machado e Emmerson Bacelar, pela paciência e colaboração no desenvolvimento deste trabalho;

À FAPEAM pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA, pela oportunidade da realização desta pesquisa.

RESUMO

A aplicação das proteases colagenolíticas é de grande importância na área médica e na atividade industrial, apresentando as mais variadas aplicações tanto no âmbito terapêutico como biotecnológico. Proteases colagenolíticas podem hidrolisar tanto colágeno nativo como desnaturado, tornando-se cada vez mais comercialmente importantes. Entre as várias fontes de proteases colagenolíticas, as proteases microbianas desempenham um papel importante na contabilidade de processos biotecnológicos. Este estudo propôs selecionar das amostras de *Bacillus* sp. isoladas de solo, as que apresentaram a melhor produção de proteases colagenolíticas e caracterizar a enzima. Para a seleção de bactérias produtoras de proteases, oito amostras de *Bacillus* sp. foram reativadas em caldo Mueller-Hinton e semeadas em meio Agar gelatina/leite 1%(p/v). Para determinar a atividade de protease colagenolítica, as bactérias foram semeadas em meio de cultura sólido com colágeno insolúvel 0,25% (p/v) de substrato. As colônias que apresentaram halo hialino da degradação foram submetidas a testes bioquímicos para a confirmação taxonômica. Dois sucessivos planejamentos fatoriais completos 2^3 com quatro repetições no ponto central foram elaborados para a análise das faixas de pH, temperatura e concentração de substrato. Das oito amostras reativadas, duas apresentaram atividade de protease colagenolítica. A maior atividade colagenolítica de *Bacillus* sp. foi 86,27 U/mL com atividade específica de 145,18 U/mg em pH 9,0 a 37 °C com 1,5 % (p/v) de concentração de substrato. A máxima atividade enzimática colagenolítica de *Bacillus stearothermophilus* foi 79,38 U/mL com atividade específica de 136,92 U/mg em pH 7,2 a 25 °C com concentração de substrato a 1 % (p/v). Ambos os extratos enzimáticos tiveram atividade ótima em pH 9,0 a 50 °C, mantiveram-se estáveis na faixa de pH alcalino e entre as temperaturas de 45 a 60 °C. Os resultados demonstraram que a produção de enzimas colagenolíticas por *Bacillus* sp. DPUA 1728 e *B. stearothermophilus* DPUA 1729 apresentam potencial biotecnológico .

Palavras-chave: protease colagenolítica, *Bacillus* spp, planejamento fatorial, solo

ABSTRACT

Application of collagenolytic proteases has major importance in medical and industrial activity, with the most varied applications, as far in therapeutic scope as biotechnological. Collagenolytic proteases can hydrolyze both native collagen as denatured collagen, becoming increasingly commercially important. Among the various sources of collagenolytic proteases, the microbial proteases show an important role in biotechnological processes. This study proposed to select samples of *Bacillus* sp. isolated from soil, those which showed the best production of collagenolytic proteases and characterize the enzyme. For selection of bacteria protease producer, eight samples from *Bacillus* sp. were reactivated in Mueller-Hinton broth and plated on Agar gelatin/milk 1 % (w/v). To determine the protease collagenolytic activity, bacteria were plated on solid medium with insoluble collagen 0.25 % (w/v) substratum. The colonies that showed hyaline halo of degradation were subjected to biochemical tests to confirm the taxonomy. Two successive 2^3 full factorial design with four replications at the center point were prepared for analysis of tracks of pH, temperature and substrate concentration. Eight samples reactivated, two had protease collagenolytic activity. The most collagenolytic activity of *Bacillus* sp. was 86.27 U / mL with specific activity 145.18 U / mg at pH 9.0 at 37 ° C with 1.5% (w / v) substrate concentration. Maximum collagenolytic enzyme activity of *Bacillus stearothersophilus* was 79,38 U / mL with specific activity of 136.92 U / mg at pH 7.2 at 25 ° C with substrate concentration of 1% (w / v). Both enzymatic extracts were optimally active at pH 9.0 at 50 ° C, remained stable in the range of alkaline pH and temperatures between 45 to 60 ° C. The results showed that the production of collagenolytic enzymes by *Bacillus* sp. DPUA 1728 and *B. stearothersophilus* DPUA 1729 have potential biotechnological

Keywords: collagenolytic protease, *Bacillus* spp, factorial design, soil

1 LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Tipos de colágenos recentemente identificados XX–XXVIII.....	17
Tabela 2 – Micro-organismos produtores de proteases colagenolíticas.....	21

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3 – Primeiro planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central.....	28
Tabela 4 – Segundo planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central.	28

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5 – Atividade enzimática em meio sólido Agar gelatina/leite 1% (p/v)...	32
Tabela 6 – Testes Bioquímicos realizados para a confirmação da identificação de bactérias	33
Tabela 7 – Produção de protease colagenolítica de <i>Bacillus</i> sp.. no primeiro planejamento fatorial (2^3).....	34
Tabela 8 – Produção de protease colagenolítica de <i>Bacillus</i> sp.. no segundo planejamento fatorial (2^3).....	36
Tabela 9 – Produção de protease colagenolítica de <i>Bacillus stearothermophilus</i> no primeiro planejamento fatorial (2^3).....	37

2 LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Estrutura molecular e helicoidal do colágeno.....	15
Figura 2 – Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e fibras	16
Figura 3 – Classificação das proteases.....	19
Figura 4 – Esquema da degradação do colágeno por protease colagenolítica.....	20

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 5 – Atividade proteolítica em Agar gelatina/leite 1% (p/v).....	31
Figura 6 – Atividade colagenolítica em Agar colágeno 0,25% (p/v).....	32
Figura 7 – Gráfico de Pareto do primeiro planejamento fatorial de <i>Bacillus</i> sp	35
Figura 8 – Gráfico de Pareto do segundo planejamento fatorial de <i>Bacillus</i> sp	36
Figura 9 – Gráfico de Pareto do primeiro planejamento fatorial de <i>Bacillus stearithermophilus</i>	38
Figura 10 – Efeito do pH sobre a atividade proteolítica.....	39
Figura 11 – Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica	39
Figura 12 – Estabilidade do pH sobre a atividade proteolítica	40
Figura 13 – Estabilidade da temperatura sobre a atividade proteolítica	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 Colágeno	14
2.2 Proteases microbianas	17
2.3 Proteases colagenolíticas	18
2.4 Aplicações das proteases colagenolíticas	22
2.5 Bactérias do Gênero <i>Bacillus</i>	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Micro-organismos	27
3.2 Seleção de bactérias como produtoras de protease	27
3.3 Condições de cultivo.....	27
3.4 Ensaio enzimático.....	28
3.5 Atividade proteolítica.....	29
3.6 Efeito e estabilidade do pH sobre a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos.....	29
3.7 Influências do pH e temperatura na estabilidade da atividade preteolítica dos extratos enzimáticos de <i>Bacillus</i> sp. e <i>B. stearothermophilus</i>	29
3.8 Análises estatísticas.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Seleção de bactérias como produtoras de protease	31
4.2 Ensaio Enzimático.....	34
4.3 Efeito e estabilidade do pH sobre a atividade proteolítica do extratos enzimáticos.....	38
4.4 Influência do pH e temperatura na estabilidade da atividade preteolítica do extrato enzimático de <i>Bacillus</i> sp. e <i>B. stearothermophilus</i>	40
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. Tem como principais características sua conformação em hélice tripla e seu conteúdo de aminoácidos, no qual a quantidade de resíduos de hidroxiprolina presente é muito superior à quantidade encontrada nas outras proteínas existentes na natureza (HARRINGTON, 1996). Devido a sua estrutura rígida, apenas um número limitado de proteases pode decompor o colágeno, como as proteases colagenolíticas. As proteases de micro-organismos têm sido amplamente utilizadas em vários campos, como por exemplo, no processo de fabricação industrial de detergentes, indústria de alimentos e farmacêutica, pelo fato que, grandes quantidades podem ser produzidas rapidamente e com um baixo custo.

A aplicação das proteases colagenolíticas é de grande importância na área médica e na atividade industrial, apresentando as mais variadas aplicações no âmbito biotecnológico. Proteases colagenolíticas podem hidrolisar tanto colágeno nativo e desnaturado, tornando-se cada vez mais comercialmente importantes (PARKS, 1999). Estas têm sido aplicadas no mercado significativo da indústria alimentícia, experimentalmente, onde fora demonstrado que a administração oral de peptídeos de colágeno previne a osteoporose, protege contra a úlcera gástrica, relaxa, combate a hipertensão e estimula o metabolismo da pele (WATANABE, 2004). Devido a isso, os peptídeos de colágeno são muitas vezes adicionados a diversos alimentos e bebidas. Além disso, essas proteases podem ser também de grande importância para o biocontrole agrícola (LABADIE et al., 1997).

Entre as várias fontes de proteases colagenolíticas, as proteases microbianas desempenham um papel importante na contabilidade de processos biotecnológicos, aproximadamente 59% do total de enzimas usadas (CHU, 2007), tais como: *Clostridium histolyticum*, *Vibrio alginolyticus* e *Porphyromonas gingivalis* (WU et al., 2010). Estes micro-organismos, no entanto são patógenos, que potencialmente produzem toxinas. Neste caso, podem comprometer a aplicação das proteases colagenolíticas. Na literatura, micro-organismos, que são geralmente considerados seguros para a produção de colagenase, foram selecionados a partir do solo, água e caviar, como *Bacillus alvei* (KAWAHARA et al., 1993), *Bacillus sp.* (OKAMOTO et al., 2001), *Bacillus subtilis* (TRAN e NAGANO, 2002), *Streptomyces sp.* (PETROVA et al., 2006), *Bacillus pumilus* (WU et al., 2010), entre outros. No entanto, a colagenase, comercialmente disponível, é produzida por *Clostridium histolyticum*, mas, devido ao elevado custo comercial na utilização das proteases

colagenolíticas, torna-se necessário a busca de novos micro-organismos produtores desta protease.

Proteases produzidas por *Bacillus* apresentam-se comercialmente mais disponíveis. O gênero *Bacillus* apresenta-se como uma das mais importante fonte de diversas enzimas microbianas comerciais, podendo ser cultivado sob diferentes condições de temperatura e pH, originando produtos mais estáveis em uma ampla gama de ambientes (GENÇKAL, 2004). Bactérias do gênero *Bacillus* são normalmente encontradas em solo, as linhagens de *Bacillus* possuem capacidade para produzir e secretar grandes quantidades (20-25 g/L) de enzimas extracelulares, características que as coloca entre as mais importantes produtoras de enzimas industriais (SCHALLMEY et al., 2004). Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias do gênero *Bacillus* como produtoras de proteases colagenolíticas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Colágeno

Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas encontradas na matriz extracelular e nos tecidos conectivos. Destacam-se por formar fibras insolúveis que têm uma grande força de tensão. As proteínas fibrosas apresentam propriedades que conferem resistência mecânica, flexibilidade e suporte às estruturas nas quais são encontradas. Essas proteínas possuem cadeias polipeptídicas arranjadas em feixes, consistindo tipicamente um único tipo de estrutura secundária, além de serem insolúveis em água, devido à elevada ocorrência de aminoácidos hidrofóbicos tanto na parte externa como interna da proteína (LEHNINGER, 2002). Essas proteínas são secretadas pelas células do tecido conjuntivo e por uma grande variedade de outros tipos celulares. Como principal componente da pele e dos ossos, elas são proteínas mais abundantes nos mamíferos, constituindo cerca de 25 % da massa proteica total desses animais (ALBERTS et al., 2004).

O colágeno é composto por três cadeias alfa de aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos e é organizada com uma hélice para a esquerda, contendo três aminoácidos por volta, e o terceiro é sempre uma glicina. Desta maneira, a cadeia alfa é composta de vários trípletos de sequências Gly-X-Y, nas quais X e Y podem ser quaisquer aminoácidos porém, comumente, X é uma prolina e Y uma hidroxiprolina, o colágeno é a única proteína existente na natureza que tem elevado conteúdo em hidroxiprolina. Cada cadeia- α combina-se com outras duas para formar uma molécula helicoidal de três fitas de cadeias ligadas por pontes de hidrogênio, chamado procolágeno (figura 1) (ALBERTS et al., 2004). Essa estrutura proteica justifica as propriedades físicas e biológicas dos colágenos: rigidez, solidez e estabilidade. Diferentes tipos celulares podem sintetizar colágeno, dependendo de cada tecido (VARGAS et al., 1997) e esta conformação de tripla hélice faz o colágeno ser resistente à maioria das proteinases.

As enzimas que podem clivar esta estrutura são conhecidas como enzimas colagenolíticas (incluindo as enzimas catepsina K. e a elastase). A catepsina K quebra o colágeno I em um meio ácido especializado primariamente na reabsorção óssea. As elastases consideradas serino proteases são responsáveis pela clivagem das elastinas. As demais enzimas colagenolíticas agem em pH neutro, e são membros da família das metaloproteinases de matriz (MMPs), sendo produzidas por diversos tecidos, incluindo as células estromais, epiteliais, macrófagos e leucócitos (JUCÁ et al., 2008, DABOO et al., 2010). A unidade

estrutural básica do colágeno na sua forma intacta é chamada de tropocolágeno, o qual possui uma massa em torno de 285 kD. A gelatina, um produto alimentar derivado do colágeno apresenta um pequeno valor nutricional como proteína, porque o colágeno é bem pobre em diversos aminoácidos essenciais para a dieta humana. O conteúdo não habitual de aminoácidos do colágeno está relacionado às restrições estruturais e características da hélice (LEHNINGER, 2002).

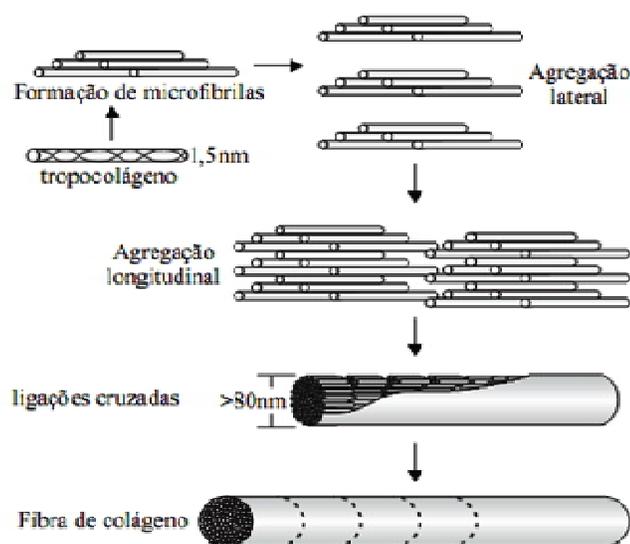


Figura 1 - Estrutura molecular e helicoidal do colágeno. (A) Modelo para uma única cadeia. (B e C) Modelos representativos do procolágeno. Fonte: Vargas et al. (1997); Alberts et al. (2004).

As moléculas de tropocolágeno interagem entre si, formando as microfibrilas, menor unidade estrutural do tecido conjuntivo. Estas, também se agregam formando as fibrilas, que posteriormente se unem para formar as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos (KADLER et al., 1993). Este processo é chamado de fibrilogênese e é dependente da temperatura, pH e força iônica do meio (figura 2).

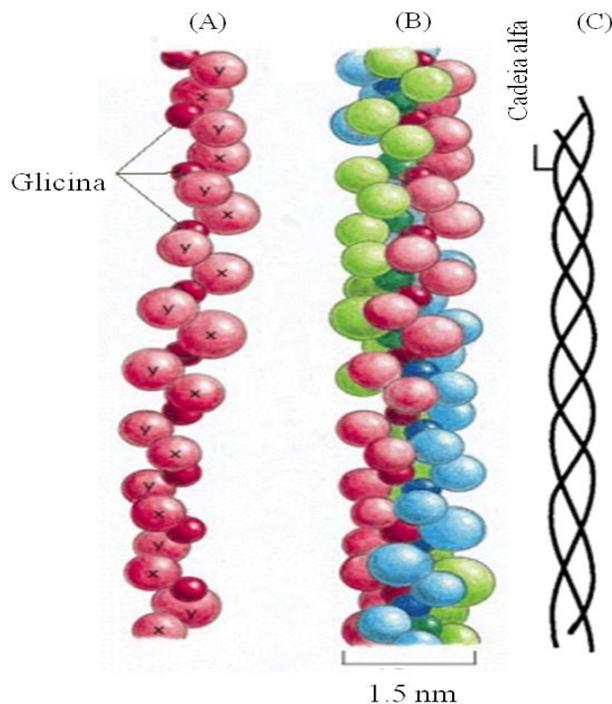


Figura 2 - Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibras. Fonte: Chaudry et al. (1997)

Os vertebrados têm pelo menos 28 tipos de colágeno (HEINO, 2007). Estes tipos diferem baseados no tipo de tecido que a enzima colagenolítica age e na estrutura química da enzima (HARRINGTON, 1996). O colágeno tipo I é o mais comum de tipo, que é encontrado em osso, tendão, pele e ligamentos. Alguns colágenos têm uma distribuição restrita de tecidos, por exemplo; tipo III, encontrado em vasos sanguíneos, medula óssea, tecido linfóide, pulmões e pele fetal; tipos II, IX e XI, que são encontrados quase exclusivamente na cartilagem; tipo X, encontrados apenas na cartilagem hipertrófica; a família de colágenos tipo IV na membrana basal; tipo VII no ancoramento fibrilas de membranas basais; e XVII em hemidesmossomos na pele (MYLLYHARJU e KIVIRIKKO, 2004). Um subgrupo de colágenos, chamado de multiplexins (colágenos XV e XVIII), participa na estabilização das estruturas da membrana basal (HEINO, 2007). No entanto alguns tipos de colágenos são encontrados mais em matrizes extracelulares. Na tabela 1 foram agrupados os tipos de colágenos recentemente identificados e suas respectivas localizações.

Tabela 1 - Tipos de colágenos recentemente identificados XX–XXVIII

Tipo	Localização
XX	Epitélio da córnea, pele, cartilagens e tendões
XXI	Muitos tecidos
XXII	Junções de tecido
XXIII	Metastático de células tumorais
XXIV	Desenvolvimento do osso e córnea
XXV	Neurônios
XXVI	Testículos, ovário
XXVII	Cartilagem, olhos, ouvidos e pulmões
XXVII	Neurônios

Fonte: Myllyharju e Kivirikko (2004); Veit et al. (2007)

A degradação do colágeno ocorre durante várias condições fisiológicas e patológicas: no desenvolvimento ósseo fetal, na invasão de tumor maligno, em ulcerações intestinais, no reparamento de feridas, em artrite reumatoide, na invasão de micro-organismos patogênicos e na inflamação periodontal crônica (WATANABE, 2004). Vários relatos de proteases de micro-organismos têm sido publicados. Trabalhos anteriores com proteases colagenolíticas bacterianas e enzimas que degradam o colágeno têm-se centrado sobre o papel potencial dessas enzimas na biotecnologia (OKAMOTO et al., 2001; TRAN e NAGANO, 2002; ITOI et al., 2006; ADIGÜZEL et al., 2009; LIU et al., 2010; WU et al., 2010).

2.2 Proteases microbianas

A baixa quantidade de proteases de plantas e animais para atender às demandas atuais do mundo tem levado a um maior interesse em proteases microbianas. Proteases provenientes de fontes microbianas são preferíveis às enzimas a partir de fontes vegetais e animais uma vez que eles possuem quase todas as características desejadas para as suas aplicações biotecnológicas. Proteases microbianas correspondem por aproximadamente 40% do total das vendas de enzimas em todo o mundo. Os micro-organismos representam uma fonte atraente de proteases e de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto. Acrescenta-se ainda a vantagem da produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas e pela possibilidade de uso de matérias-primas pouco dispendiosas (ZIMMER et al., 2009).

Os micro-organismos podem ser geneticamente manipulados para gerar novas enzimas com propriedades alteradas que são desejáveis para as suas várias aplicações, possuem grande capacidade em adaptar-se em diferentes ambientes e crescerem em variadas fontes de carbono e nitrogênio, além disso, possuem grande relação superfície área/ volume, o que facilita a rápida absorção de nutrientes para suportar altas taxas de metabolismo e biossíntese (DEMAIN, 2000).

As proteases microbianas constituem um grupo muito grande e complexo de enzimas com propriedades diferentes de especificidade de substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH, atividade de temperatura e perfis de estabilidade. Essa grande diversidade de proteases, em contraste com a especificidade da sua ação, tem atraído a atenção no mundo inteiro para exploração de suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO et al., 2008).

Com base no ponto de clivagem na cadeia polipeptídica, as proteases ou peptidases são divididas em dois grupos: exoproteases e endoproteases. As exoproteases clivam ligações peptídicas próximas às extremidades e as endoproteases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica. As exoproteases são divididas com base no seu mecanismo de ação em: aminoproteases e carboxiproteases, enquanto as endoproteases podem ser classificadas de acordo com o grupo funcional presente no seu sítio catalítico, como: serina proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases e metaloproteases (RAO et al., 1998; FRIEDRICH e KENR, 2003; DABOOR, 2010).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atividade, fundamentando-se nessa característica são classificadas como: ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm atividade na faixa de pH entre 2,0 e 6,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. São ativas na presença de agentes sulfídricos, agentes quelantes, metais pesados e agentes organofosfóricos. As proteases neutras apresentam atividade numa faixa de pH entre 6,0 e 8,0 e são denominadas metaloproteases. São enzimas que necessitam de íons (Zn, Ca) para obter estabilidade e são inibidas por agentes quelantes como o ácido etileno diamino tetracético (EDTA). As proteases alcalinas são ativas em pH entre 8,0 e 13,0 e são inibidas por agentes organofosfóricos, porém não são inibidas por agentes quelantes (PRIEST, 1984; RAO et al., 1998).

2.3 Proteases Colagenolíticas

As proteases colagenolíticas são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno, que é a proteína mais abundante nos mamíferos (figura 3). Estas

fazem parte dos grupos das metaloproteínases de matriz (MMPs) e das serina proteases. As metaloproteínases são endopeptidases dependentes de uma forte ligação com zinco para apresentarem suas atividades catalíticas (ZIMMER et al., 2009). A hidrólise pelas metaloproteases ocorre principalmente entre a ligação Gly-Pro e de resíduos X. Elas estão envolvidas na remodelação da matriz extracelular (MEC), e são consideradas como importantes facilitadoras para a invasão e disseminação tumoral (JUCÁ et al., 2008; LIMA et al., 2011).

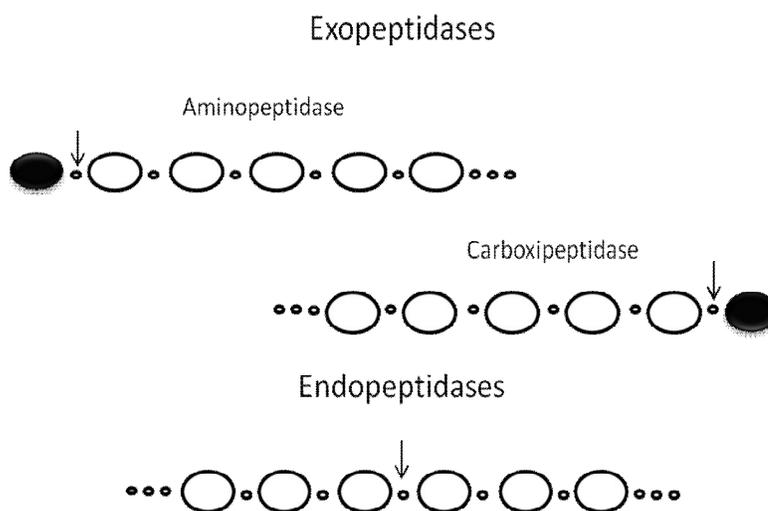


Figura 3 - Classificação das proteases. Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos na cadeia de polipeptídeo. As setas mostram os sítios de ação da enzima. Fonte: Rao et al. (1998)

As metaloproteínases, coletivamente, podem degradar todos os componentes da matriz extracelular e são classificadas em grupos, incluindo colagenases, gelatinases, estromalisinas e metaloproteínases de membrana. A família das MMPs inclui as únicas enzimas capazes de clivar e desnaturar fibras do colágeno. Várias linhas de evidência sugerem que as MMPs regulam o crescimento celular e a sobrevivência, participando diretamente na geração de sinais que induzem à proliferação de células tumorais, ativando os precursores dos fatores de crescimento na superfície celular, liberando e ativando aqueles latentes sequestrados na MEC e alterando a estrutura dos componentes essenciais da matriz extracelular (PARKS, 1999; JUCÁ et al., 2008). Todas elas são inibidas por agentes quelantes como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), mas não por agentes sulfidrílicos ou DFP (diisopropil fluorofosfato) (RAO et al., 1998).

As serina proteases estão envolvidas provavelmente na digestão de alimentos, bem como na produção de hormônios e peptídeos farmacologicamente ativos, e em várias funções celulares, tais como a digestão de proteínas, coagulação do sangue, fibrinólise e fertilização. As proteases serina são caracterizadas pela presença de um grupo de serina em seu sítio ativo. Podem ser exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e em grupos γ -peptidases. São geralmente ativas em pH alcalino e neutro, com um ótimo entre pH 7 e 11. Uma característica das proteases serina é a conservação de resíduo serina catalítica para formas Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly. As enzimas colagenolíticas consideradas proteases serina são as elatases, que juntamente com as colagenases, determinam as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo pela clivagem de ligações peptídicas particulares (RAO et al., 1998; DABOOR et al., 2010). Algumas proteases serina são inibidas por reagentes tíois, tais como p-cloromercuribenzoato (PCMB), devido à presença de cisteína perto do sítio ativo (RAO et al., 1998; FRIEDRICH e KENR, 2003; LIMA, et al., 2011).

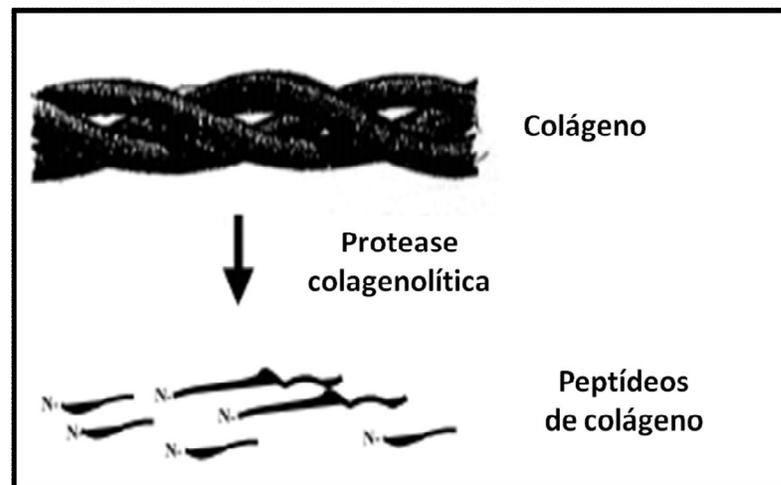


Figura 4 - Esquema da degradação do colágeno por protease colagenolítica.
Fonte: Vargas et al. (1997)

As verdadeiras enzimas colagenolítica clivam regiões helicoidais da molécula de colágeno fibrillar em condições fisiológicas de pH e temperatura. No entanto, sabe-se que numerosas proteases de mamíferos incluindo pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína e outras enzimas teciduais podem degradar gelatina e regiões não helicoidais de moléculas de colágeno. O estudo de proteases colagenolíticas começou no final do século passado com o reconhecimento do envolvimento dos clostrídios proteolíticos em putrefação do tecido e do posterior isolamento de uma enzima extracelular de *Clostridium histolyticum* que foi capaz de digerir tendões (HARRINGTON, 1996). Muitos estudos contribuíram para tornar o *C.*

histolyticum o principal micro-organismo utilizado para a produção industrial de proteases colagenolíticas. Desde então, um número de outras enzimas colagenolíticas, tanto de origem microbiana e animal, foram identificadas e caracterizadas. Comercialmente, há disponível colagenases de *Clostridium histolyticum*, produzida pela Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, na formulação de pomadas para limpeza de feridas infectadas, tratamento de lesões purulentas e necrosadas, abscessos, escaras e queimaduras (KUMAR e TAKAGI, 1999). Entretanto essas enzimas são também obtidas de outras espécies microbianas (ZIMMER et al., 2009), conforme tabela 2.

Tabela 2 - Micro-organismos produtores de protease colagenolítica

Micro-organismos	Referências
<i>Bacillus cereus</i>	Liu et al. (2010) Suphatharaprateep et al. (2011)
<i>Bacillus pumilus</i>	Wu et al. (2010)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Asdornnithee et al. (1994) Baehaki et al. (2012)
<i>Candida albicans</i>	Houle et al. (2009) Lima et al. (2009)
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Lima et al. (2011)
<i>Geobacillus collagenovorans</i>	Itoi et al. (2006)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Kang et al. (2005)
<i>Prevotella bivia</i>	Doust e Mobares (2004)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Hamdy, (2008)
<i>Streptococcus mutans</i>	Jackson et al. (1997)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Miyoshi et al. (2008)
<i>Vibrio vulnificus</i>	Nagano e To. (1999)

Existe um grande interesse na busca de protease colagenolíticas de outras fontes que não animal. Pois a enzima colagenolítica de origem animal possui a capacidade de clivar somente o colágeno nativo, isto é, são enzimas que clivam a cadeia helicoidal do colágeno resultando em dois fragmentos acessíveis a poucas proteases específicas, o tropocolágeno A (TCA) e o tropocolágeno B (TCB). Diferentemente das anteriores, as enzimas colagenolíticas de micro-organismos possuem a capacidade de hidrolisar tanto o colágeno nativo quanto o

colágeno desnaturado. Além disso, as enzimas colagenolíticas microbianas possuem afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (JUNG et al., 1998).

2.4 Aplicações das proteases colagenolíticas

Quanto à utilização das proteases colagenolíticas, pode-se afirmar que as possibilidades são bastante variadas. Uma delas é o desbridamento enzimático de ferimentos pela capacidade dessas enzimas degradarem o colágeno dos tecidos necrosados e facilitarem a cicatrização (ÖZCAN et al., 2002). Muito frequente também é a utilização destas proteases colagenolíticas nas técnicas que envolvem culturas de tecidos e células animais. Seu uso é citado em vários métodos, na composição de protocolos de trabalho de diversas áreas de pesquisa científica, como no isolamento de células endoteliais de cérebro, de células cardíacas, da pele, do tecido ocular e estudos de células tronco, tanto em humanos quanto em animais diversos. Como parte da resposta imune, as infecções bacterianas (macrófagos e neutrófilos) também produzem proteases colagenolíticas que são liberadas durante a resposta inflamatória (WOLBURG et al., 1994; SUPP et al., 2002; LI et al., 2007; ZIMMER et al., 2009).

Tem sido sugerido que proteinases bacterianas podem ser capazes de ativar proteases colagenolíticas latentes em mamíferos, contribuindo assim para a degradação do colágeno indiretamente (HARRIGTON, 1996). Tem-se encontrado proteases colagenolíticas na remoção de cicatrizes hipertróficas, no uso de terapias de queimados; na composição de pomadas cicatrizantes; na prevenção de tratamento de lesões; em estudos pré-clínicos terapêuticos de vários tipos de fibrose destrutiva, como cirrose hepática e fibrose pulmonar (KUŞCU et al., 2002; ÖZCAN et al., 2002; JIN et al., 2005; OUCHI et al., 2008).

A remoção de cicatrizes pode ser constatada com o estudo de Özcan et al. (2002), no qual os resultados demonstraram a remoção total de escaras de queimaduras tratadas por desbridamento enzimático com colagenase. Kuşcu et al. (2002), por sua vez, deram importância ao uso das colagenases ao tratamento de lesões em mamilos causados durante a amamentação, havendo eficácia da colagenase, com resultados similares comparado aos tratamentos convencionais. Estudos pré-clínicos foram relatados por Jin et al. (2005) e Ouchi et al. (2008), utilizando a colagenase para a regressão da cirrose hepática e verificando o papel da colagenase como anti-fibrótico no modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina, respectivamente.

Estudos relatam que marcadores de formação e reabsorção óssea derivados de colágeno podem ser úteis para o diagnóstico e acompanhamento de uma série de doenças caracterizadas por alterações no metabolismo ósseo (VARGAS et al., 1997). Constatou-se que a concentração sérica de dois peptídeos derivados de protocógeno tipo I e III podem ser úteis como marcadores para avaliar a atividade fibrogênica em pacientes com hipertensão, sendo a doença caracterizada pelo acúmulo miocárdio de colágeno tipo I e II (DÍEZ e LAVIADES, 1995). Resultados interessantes foram obtidos em estudos realizados com colagenase injetável no tratamento de contratura de Dupuytren. Os autores sugerem o uso da colagenase como tratamento viável para a contratura de Dupuytren, uma condição que usualmente requer tratamento cirúrgico e intervenções recorrentes (BADALAMENTE e HURST, 2007; HURST, 2009).

O uso das proteases colagenolíticas com fins terapêuticos recentemente gerou patentes de invenção, como o estudo de Wegman et al. (2000), no qual as colagenases são utilizadas, opcionalmente, combinadas com outras proteinases no tratamento para redução do tecido adiposo em locais selecionados no corpo. Os autores afirmam que, ao ser introduzida no tecido adiposo, a colagenase provoca a dissociação do tecido na localização em que ocorre, podendo resultar em redução significativa do tecido adiposo em 24 horas. Outro estudo que gerou patente de invenção foi de Badalamente et al. (2010), no qual a colagenase foi utilizada como método para o tratamento de epicondilite lateral. O estudo buscou as injeções de colagenases em áreas atingidas como método para tratamento não cirúrgico.

Tem sido experimentalmente demonstrado que a administração oral de peptídeos de colágeno previne a osteoporose, protege contra a úlcera gástrica, relaxa a hipertensão e estimula o metabolismo da pele, devido a isso, os peptídeos de colágeno são muitas vezes adicionados a diversos alimentos e bebidas (VARGAS et al., 1997; WATANABE, 2004). Moskowitz (2000) relata que o colágeno hidrolisado é de interesse como um agente terapêutico de utilidade no tratamento de osteoartrite e osteoporose. Estudos sugerem que a ingestão de colágeno hidrolisado reduz a dor de pacientes com osteoartrite no joelho ou no quadril e melhora o metabolismo ósseo em pessoas com osteoporose, no qual a inibição da degradação do colágeno é maior com a dieta dos hidrolisados de colágeno com calcitonina. A eficácia da administração oral de peptídeos também foi avaliada no tratamento de artrite reumatóide (AUSAR et al., 2001). Wu et al. (2004) relatam a eficácia dos peptídeos no metabolismo ósseo, aumentando a massa óssea, sem efeitos indesejáveis e que podem proporcionar efeitos benéficos na osteopenia que ocorre com o envelhecimento.

As proteases colagenolíticas apresentam potencial para o emprego em outras áreas além da terapêutica e de pesquisa. Seu uso pode ser expandido para o setor alimentício, como amaciadores de carnes, no emprego da indústria de cosméticos; e também podem ser utilizadas como auxiliar no tingimento de couros. Kim et al. (2007) relatam em um estudo, que as proteases de gengibre podem ser utilizadas como uma alternativa para a papaína, em aplicações comerciais, tais como no amaciamento de carne, em que o substrato alvo é o colágeno. No emprego da indústria de cosméticos, a suplementação de peptídeos de colágeno na dieta pode aumentar o teor de colágeno, resultando em uma pele mais saudável e menos enrugada (LINTNER e PESCHARD, 2000). Além disso, um estudo com o isolamento de polipeptídeos de elastina e colágeno constata o uso como matéria-prima para a indústria cosmética (LANGMAIER et al., 2002). Na indústria de couro, as colagenases têm sido estudadas como biocatalisadores, auxiliando o tingimento de couro, que é um substrato difícil de tingir, devido à natureza única da matéria-prima que tem variação dentro da matriz. No estudo de Kanth et al. (2008), observou-se a absorção do corante em 99% pelo tratamento com colagenases, no qual a resistência e a suavidade do couro não sofreram alteração.

De acordo com Labadie (1997), podem ser também de grande importância para a degradação da cutícula exterior dos nematóides que, frequentemente, infestam plantas. Os importantes componentes estruturais desta cutícula são colágenos (KINGSTON, 1991). A degradação da cutícula pode ser uma eficaz maneira de controlar formas pré-parasitárias e parasitárias de galhas nematóides. O papel da atividade colagenolítica sobre fitonematóides demonstrou, por exemplo, a capacidade da enzima para danificar as cutículas do nematóide *Meloidogyne javanica* (GALPER et al., 1991; SELA et al., 1998). Com esse amplo campo de utilização, observa-se que a produção dessas enzimas colagenolíticas pode ser muito vantajosa.

2.5 Bactérias do Gênero *Bacillus*

A Amazônia é uma região que possui uma das maiores e mais ricas biodiversidades do mundo, apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos, pois é inigualável a quantidade e variedade de produtos naturais, incluindo a notável biodiversidade microbiana disponível para transformação em produtos úteis de maior valor agregado. Entretanto pouco se sabe sobre a composição das suas comunidades bacterianas (JESUS et al., 2009).

Algumas pesquisas na Amazônia e em outros ambientes tropicais relatam a composição das comunidades bacterianas do solo (JESUS et al., 2009). Bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas em diversos ambientes, principalmente, no solo. Além disso, estas podem ser encontradas em ambientes aquáticos, vegetação, alimentos e no trato gastrointestinal de vários animais. Membros do gênero *Bacillus* são bactérias Gram-positivas, aeróbias e formadoras de endósporo, que são caracterizados por sua morfologia das células em forma de bastonete, produção de catalase e sua distribuição ubíqua (NICHOLSON, 2002).

Espécies de *Bacillus* são fenotipicamente e genotipicamente heterogênea e, conseqüentemente, exibem diversas propriedades fisiológicas, tais como a capacidade de degradar muitos diferentes substratos derivados de plantas e fontes animais, incluindo celulose, amido, proteínas, ágar, hidrocarbonetos e também os biocombustíveis (ABRIOUEL et al., 2010).

A diversidade nas propriedades fisiológicas, que é refletida pela grande diversidade de estirpes de *Bacillus*, permite que essas bactérias colonizem variedades de habitats ecológicos, explorando uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos como fontes de nutrientes (ALCARAZ et al., 2010). Esta capacidade de diversificação ecológica foi potencializada pela produção de esporos, que são caracterizados pela sua notável capacidade de resistência e de dormência (ABRIOUEL et al., 2010).

O gênero é composto predominantemente de espécies não patogênicas, resultando, por exemplo, na administração de alimentos e drogas pela concessão do organismo geralmente considerado como estado seguro. No entanto o gênero também inclui um número de espécies patogênicas de animais e insetos, incluindo *Bacillus anthracis*, o agente causador do antraz; *Bacillus cereus*, um patógeno oportunista humano; e *Bacillus thuringiensis*, um patógeno de insetos (THWAITE et al., 2008).

Atualmente, cerca de 60% das enzimas disponíveis comercialmente são produzidas por espécies de *Bacillus*, principalmente, sendo proteínas homólogas que são naturalmente secretadas no meio de crescimento (WESTERS, 2004). Proteases comerciais, principalmente, neutra e alcalina, são produzidas por organismos pertencentes ao gênero *Bacillus*. Proteases neutras de bactérias são ativas em uma faixa de pH estreita (pH 5-8) e têm relativamente baixa termotolerância. Neutrase, uma protease neutra, é insensível aos inibidores de proteinase de plantas naturais e é útil na indústria cervejeira. Algumas das proteases neutras pertencem ao tipo metaloprotease e requerem íons metálicos divalentes para sua atividade, enquanto outros são proteinases serina, que não são afetados por agentes quelantes. Proteases alcalinas bacterianas são caracterizadas por sua alta atividade em pH alcalino, por exemplo,

pH 10, e sua especificidade de substrato amplo. Sua temperatura ideal é em torno de 60 °C. Estas propriedades de proteases alcalinas de bactérias são adequadas para uso na indústria de detergentes (RAO et al., 1998). Além disso, as linhagens de *Bacillus* possuem capacidade para produzir e secretar grandes quantidades (20-25 g/L) de enzimas extracelulares. As enzimas extracelulares ou exoenzimas são completamente dissociadas da célula, encontradas no meio circundante e aumentam a habilidade das bactérias em obter nutriente. As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande variedade de exoenzimas, dentre elas as amilases e proteases são as mais presentes (PRIEST, 1977), estando entre as mais importantes produtoras de enzimas industriais (SCHALLMEY et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismos

Os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Estado do Amazonas (UEA). Foram estudadas oito amostras do gênero *Bacillus* provenientes do solo amazônico, estas amostras são pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia (UFAM) e foram catalogadas e depositadas na coleção de cultura de Micro-organismos do Departamento de Parasitologia DPUA/UFAM.

3.2 Seleção de bactérias como produtoras de protease

Para a seleção de bactérias produtoras de proteases, as amostras foram reativadas em caldo Mueller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C. Em seguida, as colônias bacterianas foram inoculadas em meio Agar gelatina/leite 1 % (p/v) e incubados a 37 °C por 24h. A atividade enzimática (Pz) em meio sólido foi medida por meio da razão entre o diâmetro da colônia sobre o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação. Quanto menor valor de (Pz), maior atividade enzimática, sendo os resultados apresentados em códigos: valor 1 quando (Pz) = 1,0 (ausência de atividade enzimática), valor 2 quando $0,64 < (Pz) > 1,0$ (atividade enzimática positiva) e valor 3 quando (Pz) $\leq 0,64$ (atividade enzimática fortemente positiva) (PRINCE et al., 1982; SANTOS et al., 2009). As colônias que apresentaram halo hialino da degradação enzimática com Pz abaixo de 0,64 foram inoculadas em meio sólido de acordo Wu et al. (2010), com algumas modificações. O meio foi composto de 0,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄; 0,2 g.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g.L⁻¹ ZnSO₄.H₂O; 1 g.L⁻¹ de NaCl, colágeno insolúvel a 0,25 % (p/v) e Agar a 1,5 % (p/v), pH 7,2. Após 24 horas de incubação, a 37 °C, o colágeno digerido foi revelado com a adição de Coomassie brilliant blue G (LUPAN et al., 1986; DOUST et al., 2004). As amostras que apresentaram halo de degradação foram submetidas a testes bioquímicos segundo Barrow e Feltham (1993) para a confirmação taxonômica e posteriormente realizado o ensaio enzimático.

3.3 Condições de cultivo

Dois sucessivos planejamentos fatoriais completos 2^3 com quatro (04) repetições no ponto central (tabelas 3 e 4) foram elaborados para a análise das faixas de pH, temperatura e concentração de substrato. O meio de fermentação utilizado descrito por Tran e Nagano (2002), com modificações, composto de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 ; $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ de CaCl_2 e concentrações variadas de gelatina. Foi elaborada uma suspensão celular na escala 1,0 de MacFaland e $200 \mu\text{L}$ foram adicionados em Erlenmeyers de 125 mL com 25 mL de meio de fermentação. Em seguida, a cultura foi submetida à agitação de 160 rpm durante 24 horas nas temperaturas estabelecidas em planejamento fatorial. Após o período de agitação, o sobrenadante foi separado por centrifugação $10.000 \times g$ durante 10 minutos e foi feita a filtração em membrana de $0,22 \mu\text{m}$.

Tabela 3 - Primeiro planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	5,0	6,0	7,2
Temperatura (°C)	25	37	45
Concentração de gelatina (% m/v)	0,25	0,5	1,0

Tabela 4 - Segundo planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	7,0	8,0	9,0
Temperatura (°C)	37	45	50
Concentração de gelatina (% m/v)	0,5	1,0	1,5

3.4 Ensaio Enzimático

O ensaio enzimático foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Moore e Stein (1948), com algumas modificações. A mistura foi composta de 0,2 mL do sobrenadante enzimático, 0,8 mL de 50 mM Tris-HCl contendo 4 mM CaCl e colágeno insolúvel a 1 % (p/v) em faixas de pH estabelecidas pelo planejamento fatorial. Posteriormente, foi incubado durante 5 horas nas temperaturas estabelecidas pelo planejamento fatorial. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 0,2 mL de ácido tricloroacético a 10 % (p/v). Tubos contendo a mistura foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 10 minutos e o extrato enzimático foi filtrado em $0,22 \mu\text{m}$. Uma unidade de grupo amino livre de colágeno foi mensurada pelo

método de ninidrina, no qual 0,5 mL de solução ninidrina a 2 % (p/v) e 0,2 mL do sobrenadante foram aquecidos por 10 minutos. Em seguida, foram submetidos a resfriamento por cinco minutos. Foi feita uma diluição com 5 mL de 1-propanol a 50 % (p/v). A mistura foi centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos e a absorbância foi medida em 570 nm. A atividade colagenolítica foi expressa como um μmol de glicina equivalente liberado por minuto. A atividade expressa em U/mL foi calculada de acordo com a equação:

$$U/mL = \frac{(\mu\text{mol de glicina}) \times (df) \times (Vt)}{(Ve) \times (Vn)}$$

onde, df é o fator de diluição (ml), Vt é o volume total (ml), Ve é o volume do extrato enzimático (ml) e Vn = volume de ninidrina (ml). A concentração de proteínas foi determinada segundo Bradford (1976). A atividade específica foi calculada pela razão entre a atividade (U/mL) e a quantidade de proteína na amostra (mg/mL) e expressa em U/mg.

3.5 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se 150 μL do extrato bruto e como substrato 250 μL de azocaseína a 1,0 % (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em Tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,2. A reação foi mantida em câmara escura e após 60 minutos, adicionou-se 1,2 mL de ácido tricloroacético a 10 % (p/v). O resíduo remanescente foi removido por centrifugação (8000xg), a 4 °C por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 0,8 mL e adicionado a 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida por Leighton (1973), como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos, sendo expressa em U/mL.

3.6 Efeito e estabilidade do pH sobre a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos

A determinação o efeito do pH ótimo da enzima foi realizada de acordo com a metodologia descrita do item 5.5. O pH da mistura de 1% azocaseína foi variado ao longo das faixas de 5,0-10,0. Os tampões utilizados foram: 50 mM citrato (5,0-6,0), 50 mM Tris-HCl (pH 7,2-9,0) e 50 mM carbonato-bicarbonato (pH 10,0). Determinaram-se as atividades relativas considerando-se 100 % o pH no qual foi observada a maior atividade enzimática. A estabilidade do pH foi analisada por 150 minutos, considerando a atividade relativa da enzima expressa em porcentagem. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7 Influências do pH e temperatura na estabilidade da atividade proteolítica do extrato enzimático

A determinação da temperatura ótima para a atividade da enzima foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.5 com 1 % de azocaseína em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,2), o extrato enzimático foi incubado nas temperaturas 25, 37, 45, 50, 60 e 80°C por 60 minutos. A estabilidade da temperatura foi analisada por 105 minutos, considerando a atividade relativa da enzima expressa em porcentagem. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.8 Análises estatísticas

Os planejamentos fatoriais e gráficos de Pareto foram elaborados utilizando o programa estatístico Minitab 16 e os gráficos de efeito e estabilidade dos extratos enzimáticos foram elaborados utilizando o programa Excel 2007.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de bactérias como produtoras de protease

As amostras bacterianas foram inoculadas em meio sólido Agar gelatina/leite a 1% (p/v) para a determinação da atividade proteolítica qualitativa, no qual houve formação de halos translucido ou zona de precipitação (figura 5). A atividade enzimática (Pz) em meio sólido foi medida em milímetro, de acordo com o item 3.2 e apresentada na tabela 5.

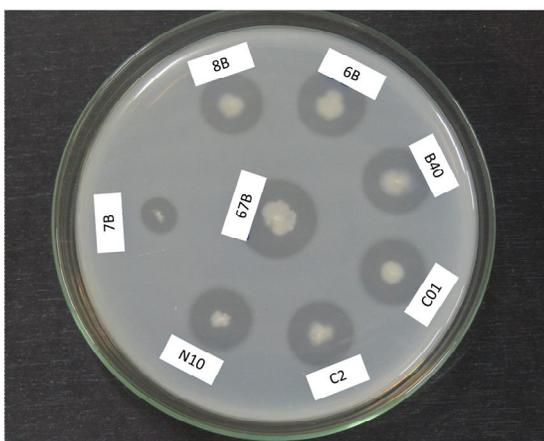


Figura 5 - Atividade proteolítica das amostras bacterianas provenientes de solo em Agar gelatina/leite 1 % (p/v). Placas incubadas à 37 °C durante 24 horas. Fonte pessoal.

Tabela 5 - Atividade enzimática em meio sólido Agar gelatina/leite 1 % (p/v).

Bactérias	Dc (mm)	Dh	
		(mm)	Pz
B6	6	16	0,375
B7	1	07	0,143
B8	6	14	0,428
B40	6	17	0,353
B67	8	18	0,444
C01	5	15	0,333
C02	5	16	0,313
N10	4	14	0,285

Dc = diâmetro da colônia; Dh = Diâmetro do halo acrescido do diâmetro da colônia; Pz = atividade enzimática

Em seguida, as bactérias que apresentaram $Pz > 0,64$ foram semeadas em meio Agar colágeno a 0,25 % (p/v) e a partir da revelação com adição de Comassie brilliant blue G, apresentaram zonas claras ao redor das colônias no meio (figura 6) sugerindo a produção da enzima colagenolítica. Duas amostras N10 e B40 apresentaram halo de degradação de colágeno.

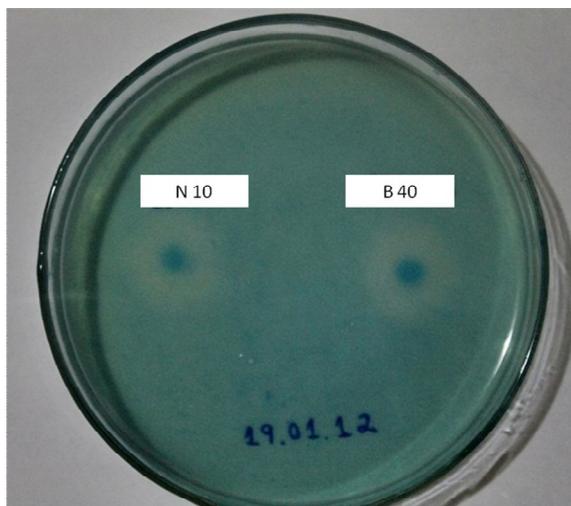


Figura 6 - Atividade colagenolítica após 24 horas de incubação, a 37 °C. O colágeno digerido foi revelado com a adição de Comassie brilliant blue G. Zonas claras indicadas pelas setas.

Para a confirmação das características taxonômicas (tabela 6), as amostras das bactérias N10 e B40 foram submetidas à identificação bioquímica. As duas amostras selecionadas foram identificadas como Gram-positivas, esporuladas com produção de catalase pertencentes ao gênero *Bacillus*, confirmando as espécies desse gênero como *Bacillus* sp. e *Bacillus stearothermophilus*, respectivamente, segundo Barrow e Feltham (1993), Nazina et al. (2004), Schaffer et al. (2004), Ettoumi et al. (2009) e Sharma et al. (2009). As amostras foram depositadas na coleção de cultura de micro-organismos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas DPUA/UFAM catalogadas como *Bacillus* sp. DPUA1728 e *Bacillus stearothermophilus* DPUA1729.

Tabela 6 - Testes Bioquímicos realizados para a confirmação da identificação de bactérias.

Testes	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> <i>stearothermophilus</i>
Gram	+	+
Esporos 24 hs	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Citrato	-	-
Motilidade	+	+
Urease	-	-
Indol	-	-
Reação de VP	-	-
Hidrólise de:		
Amido	+	+
Caseína	+	+
Gelatina	+	+
Produção de ácido de:		
Glicose	+	+
Lactose	+	-
Manitol	+	-
Arabinose	+	+
Xilose	+	+
Galactose	+	+
Frutose	+	+
Redução de Nitrato	+	+
Crescimento anaerobico	+	+
NaCl 7 % (m/v)	-	+
NaCl 10 % (m/v)	-	F
Crescimento a 50 °C	+	+
Crescimento a 60 °C	+	+
DNAase	F	F

F=fraco VP= Reação de Voges Proskauer

4.2 Ensaio Enzimático

Na tabela 7 estão apresentados os dados referentes ao primeiro fatorial 2^3 da atividade enzimática com a amostra *Bacillus* sp. DPUA1728. O maior valor da atividade colagenolítica obtido para *Bacillus* sp. DPUA1728 após 24 h de fermentação foi 64,29 U/mL com atividade específica de 110,89 U/mg em pH 7,2 a 45 °C com 1,0 % (p/v) da concentração de substrato. Para cada planejamento fatorial foi elaborado um gráfico de Pareto, onde foi compreendida a relação entre os fatores e nos permitiu avaliar as melhores condições para a produção enzimática. Os valores de efeito significativo das variáveis estudadas foram analisados, visando verificar a produção do extrato enzimático de *Bacillus* sp. DPUA1728 que estão ilustrados no gráfico de Pareto (figura 7).

Tabela 7 - Produção de protease colagenolítica de *Bacillus* sp. DPUA1728 no primeiro planejamento fatorial (2^3).

Fatores	pH	T (°C)	S (%)	Ac (Um/L)	PT (mg/mL)	Ae (U/mg)
1	5,0	25	0,25	21,16	0,42	50,34
2	7,2	25	0,25	19,89	0,46	42,88
3	5,0	45	0,25	34,92	0,38	92,66
4	7,2	45	0,25	33,40	0,72	46,09
5	5,0	25	1,00	21,37	0,75	28,36
6	7,2	25	1,00	54,40	0,52	104,27
7	5,0	45	1,00	60,92	0,84	72,47
8	7,2	45	1,00	64,29	0,58	110,89
9*	6,0	37	0,50	25,97	0,70	37,34
10*	6,0	37	0,50	23,44	0,71	33,00
11*	6,0	37	0,50	27,60	0,71	38,87
12*	6,0	37	0,50	23,62	0,71	33,26

pH = pH inicial do meio; T = temperatura; S = concentração de substrato; Ac = Atividade colagenolítica; PT = proteína total; Ae = Atividade colagenolítica específica.

A linha vermelha é usada para avaliar quais efeitos foram significativos e as barras que se estendem além dessa linha são correspondentes aos efeitos em nível de 5% de significância estatística. Os dados revelam que todas as condições foram significativas e os valores significativos indicam que a produção de protease colagenolítica aumenta quanto os fatores pH, temperatura e concentração de substrato estão em seus maiores níveis. Embora, a interação entre os fatores pH e temperatura tenham efeito negativo, a relação entre os três

fatores testados tiveram influencia positiva (5, 2541), o que significa que o aumento simultâneo nos níveis destas variáveis favorece melhor a produção de pretease colagenolítica (Fig. 7).

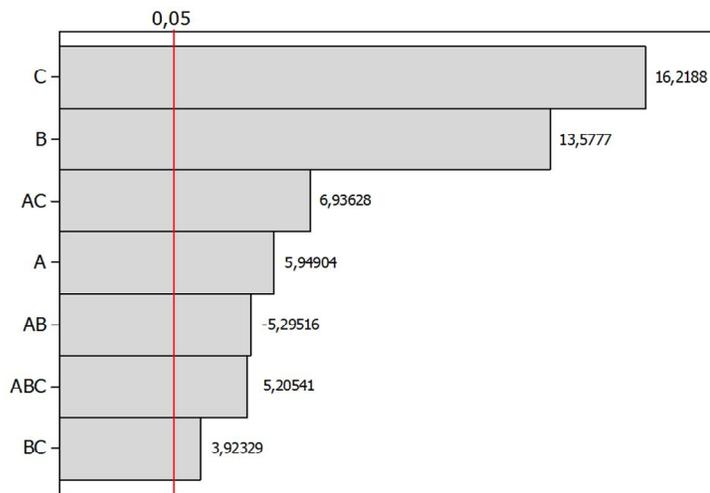


Figura 7 - Gráfico de Pareto definindo as inter-relações entre as variáveis independentes, demonstrando a afinidade entre as escalas mais elevadas das inter-relações. A = pH, B= Temperatura e C = Concentração do substrato.

A estratégia utilizada para atingir o objetivo desta etapa do trabalho foi explorar mais detalhadamente um domínio em todas as condições experimentais previamente selecionadas para produção da protease. A partir dos dados obtidos no experimento fatorial utilizando *Bacillus* sp. DPUA1728, foi realizado um segundo planejamento fatorial para verificar as melhores condições para produção de colagenase (tabela 4).

Na tabela 8 foram demonstrados os valores da atividade enzimática realizado no segundo ensaio para *Bacillus* sp. DPUA1728, a maior atividade colagenolítica em 24 h foi de 86,27 U/mL com atividade específica de 145,18 U/mg em pH 9,0 a 37 °C com 1,5 % (p/v) de concentração de substrato. Resultados semelhantes foram verificados por Patel et al. (2005) utilizando gelatina em fermentação de *Bacillus* sp. observaram que o aumento gradual da concentração de substrato influencia na máxima produção de protease. Nos estudos de Lima et al. (2009) utilizando *Candida albicans* URM3622 e de Lima et al. (2011) usando *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 observaram que o pH do meio fermentado também influencia no aumento da produção de protease, mostrando a importância do pH inicial para a otimização da produção.

Nos dados referente ao segundo ensaio fatorial, observou-se que os valores de efeito significativo indicaram em média as maiores atividades obtidas quando temperatura foi

selecionado em seu menor nível e as interações pH e concentração de substrato foram selecionados no seu nível mais elevado. Observou-se que o aumento da concentração do substrato é o único que individualmente favorece melhor a produção de protease colagenolítica. No entanto, as interações entre pH temperatura e concentração de substrato apresentaram efeito não significativo (figura 8).

Tabela 8 - Produção de protease colagenolítica de *Bacillus* sp. DPUA1728 no segundo planejamento fatorial (2^3).

Fatores	pH	T (°C)	S (%)	Ac (U/mL)	PT (mg/mL)	Ae (U/mg)
1	7,2	37	0,50	35,22	0,59	71,13
2	9,0	37	0,50	53,31	0,48	111,47
3	7,2	50	0,50	19,02	0,30	62,49
4	9,0	50	0,50	16,38	0,33	49,13
5	7,2	37	1,50	70,12	1,06	66,27
6	9,0	37	1,50	86,27	0,66	145,18
7	7,2	50	1,50	22,31	0,55	40,52
8	9,0	50	1,50	17,28	0,35	49,68
9*	8,0	45	1,00	33,76	0,70	43,14
10*	8,0	45	1,00	36,47	0,70	52,43
11*	8,0	45	1,00	35,32	0,65	54,15
12*	8,0	45	1,00	32,85	0,65	50,37

pH = pH inicial do meio; T = temperatura; S = concentração de substrato; Ac = Atividade colagenolítica; PT = proteína total; Ae = Atividade colagenolítica específica.

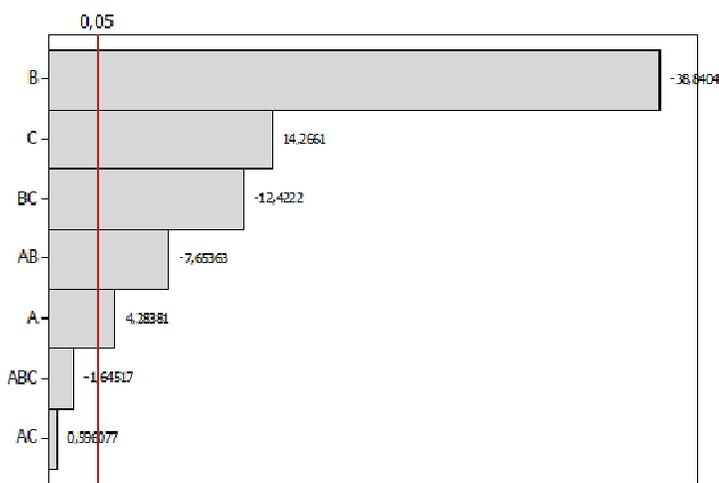


Figura 8 - Gráfico de Pareto definindo as inter-relações entre as variáveis independentes, demonstrando a afinidade entre as escalas mais elevadas das inter-relações. A = pH, B = Temperatura e C = Concentração do substrato.

Na tabela 9 são apresentados os dados referentes ao primeiro fatorial 2^3 da atividade enzimática com a amostra *B. stearothermophilus* DPUA1729. O valor de maior atividade enzimática colagenolítica foi 79,38,15 U/mL com atividade específica de 136,92 U/mg em pH 7,2 a 25 °C com concentração de substrato a 1 % (p/v). Resultados similares foram obtidos por Suphatharaprateep et al. (2011) utilizando *Bacillus cereus* CNA1 na produção de protease colagenolítica, diversas fontes de carbono em diferentes pH's foram testadas. Na qual as melhores condições para máxima produção da protease colagenolítica foram em seus menores níveis, em pH 7,5 com 1 % (p/v) de concentração de gelatina a 37 °C.

Resultados semelhantes às condições foram obtidos por Lima et al. (2011) utilizando *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, nos quais a máxima produção foi nas condições onde a temperatura esteve em seu maior nível e a concentração de substrato e faixas de pH em seus menores níveis. No estudo de Zambare et al. (2011) com *Pseudomonas aeruginosa* MCM-327 constatou que a temperatura apresenta influencia negativa na atividade colagenolítica. Neste contexto, observou-se que essas proteases produzidas por *B. stearothermophilus* DPUA1729 possuem baixa tolerância à temperatura, que segundo Rao et al. (1998) proteases com baixa tolerância são consideradas proteases bacterianas neutras e são ativas na faixa de pH de 5,0 a 8,0.

Tabela 9 - Produção de protease colagenolítica de *B. stearothermophilus* DPUA1729 no primeiro planejamento fatorial (2^3).

	pH	T (°C)	S (%)	Ac (U/mL)	PT (mg/mL)	Ae (U/mg)
1	5,0	25	0,25	35,20	0,38	93,40
2	7,2	25	0,25	29,14	0,43	67,02
3	5,0	45	0,25	15,95	0,04	220,08
4	7,2	45	0,25	15,20	0,59	25,59
5	5,0	25	1,00	44,04	0,14	303,87
6	7,2	25	1,00	79,38	0,58	136,92
7	5,0	45	1,00	19,78	0,13	151,61
8	7,2	45	1,00	16,36	0,06	225,72
9*	6,0	37	0,50	39,10	0,22	158,69
10*	6,0	37	0,50	39,28	0,26	150,59
11*	6,0	37	0,50	40,40	0,22	154,86
12*	6,0	37	0,50	43,18	0,30	165,54

pH = pH inicial do meio; T = temperatura; S = concentração de substrato; Ac = Atividade colagenolítica; PT = proteína total; Ae = Atividade colagenolítica específica.

Os dados apresentados na figura 9 referentes aos ensaios utilizando a amostra *B. stearothermophilus* DPUA1729 indicam que, os valores dos efeitos e as interações foram significativos em todos os ensaios, no qual o pH e a concentração de substrato e a sua respectiva interação apresentou influência positiva. Entretanto, neste presente trabalho, a temperatura de fermentação utilizando a amostra *B. stearothermophilus* DPUA1729, teve um efeito negativo (-22,5881) (figura 9) sobre a produção de protease colagenolítica.

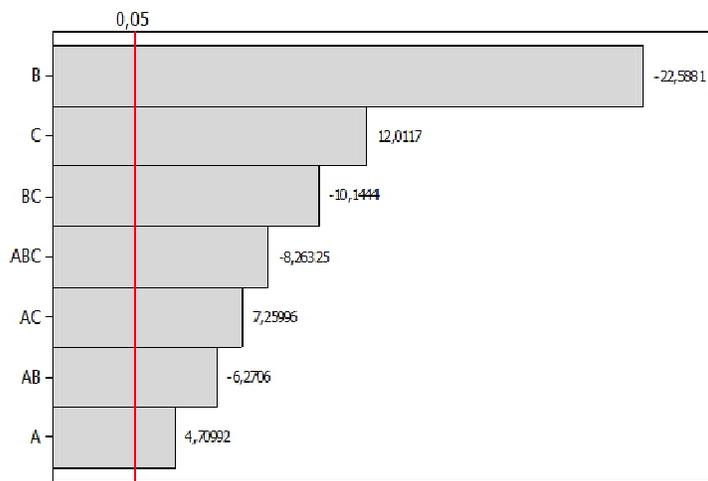


Figura 9 - Gráfico de Pareto definindo as inter-relações entre as variáveis independentes, demonstrando a afinidade entre as escalas mais elevadas das inter-relações. A = pH, B = Temperatura e C = Concentração do substrato.

4.3 Efeitos do pH e da temperatura sobre a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos de *Bacillus* sp. DPUA1728 e *B. stearothermophilus* DPUA1729.

No efeito do pH sobre a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos de *Bacillus* sp. DPUA1728 e *B. stearothermophilus* DPUA1729., verificou-se que ambas as bactérias apresentaram atividade em faixas de pH (5,0-10,0) por 60 minutos. Porém, a atividade máxima dos extratos enzimáticos tanto de *Bacillus* sp. DPUA1728 quanto de *B. stearothermophilus* DPUA1729 foi em pH 9,0 (figura 10). Contudo 80% da atividade de protease para ambas as bactérias foram na faixas de pH de 7,2 e 9,0 e acima de 60% dessa atividade foi entre pH 6,0 a 10,0.

Resultados similares foram observados no estudo de Lima et al. (2011) na produção de protease, porém utilizando *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, cuja máxima atividade foi expressada no pH 9,0. Por conseguinte, nos trabalhos de Liu et al. (2010) usando *Bacillus cereus* MBL13 e de Zambare et al. (2011) fermentando *Pseudomonas aeruginosa* MCM-327,

obtiveram máxima produção de protease em pH 8,0, isto é, dentro da faixa dos 80 % dos pHs ótimos supracitados. Entretanto, no estudo de Nakawahara et al. (1993) com *Bacillus alvei* DC-1, os resultados de atividade proteolítica máxima foram em pH 6,0.

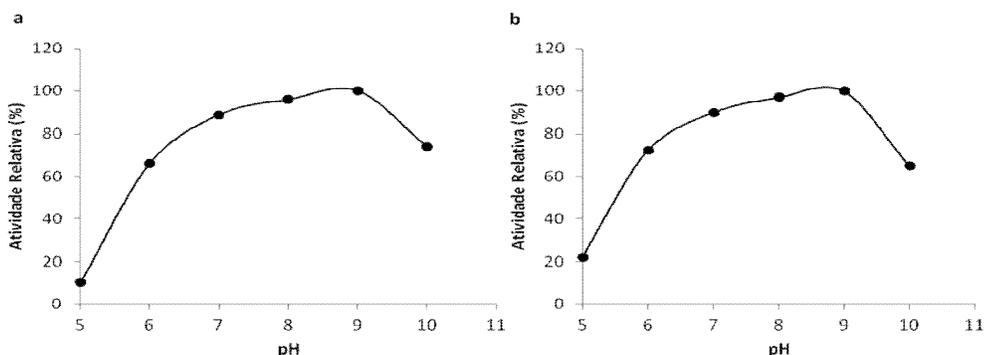


Figura 10 - Efeito do pH a 50 °C sobre a atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp. DPUA1728 (9a) e *Bacillus stearothermophilus* DPUA1729 (9b).

Os dados referentes ao efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica dos extratos enzimáticos das bactérias *Bacillus* sp. DPUA1728 e *B. stearothermophilus* DPUA1729 apresentaram máxima atividade enzimática em 50 °C (figura 11). O perfil de temperatura de *Bacillus* sp. DPUA1728 apresenta mais de 50 % da atividade enzimática entre 45 e 60 °C (figura 11a). Porém, a atividade proteolítica de *B. stearothermophilus* DPUA1729 mantém mais de 50 % de ação enzimática entre 45 e 50 °C. Contudo, o aumento da temperatura acima de 60 °C reduz a atividade da protease abaixo de 20 % (figura 11b).

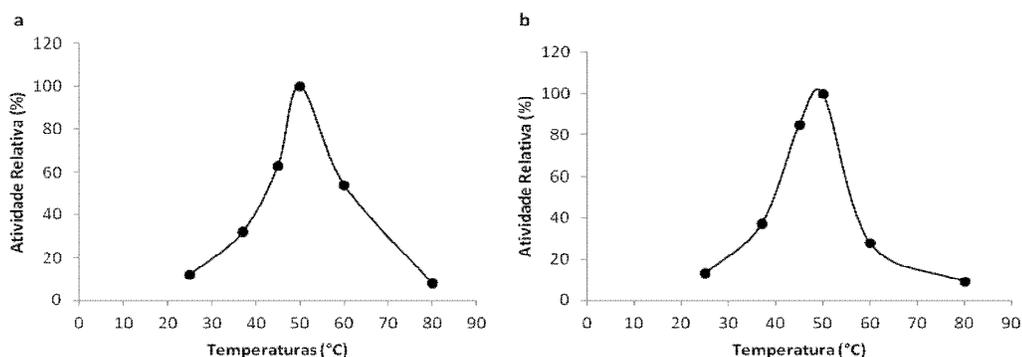


Figura 11 - Efeito da temperatura em pH 7,2 sobre a atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp. DPUA1728 (11a) e *Bacillus stearothermophilus* DPUA1729 (11b).

Resultado semelhante foi expresso no estudo de Nagano e To, (1999) utilizando *Bacillus subtilis* FS-2, confirmando 50 °C como temperatura ótima na produção de protease. Todavia, nos trabalhos de Lima et al. (2009), utilizando *Candida albicans* URM3622,

Suphatharaprateep et al. (2010) com *Bacillus cereus* CNA1 e Wu et al. (2010) usando *Bacillus pumilus* Col-J, os resultados expressaram atividades ótimas na produção protease a 45 °C, dentro da faixa de 60 % da atividade ótima relativa obtida neste estudo.

4.4 Influências do pH e temperatura na estabilidade da atividade proteolítica do extrato enzimático de *Bacillus* sp. e *B. stearothersophilus*

Os dados referentes à estabilidade do pH da atividade proteolítica do extrato enzimático da amostra *Bacillus* sp. DPUA1728 foi expressa acima de 74 % da atividade máxima relativa nas faixas de pH alcalino (7,2-10,0) (figura 12a). Porém, estes resultados divergem dos obtidos por Lima et al. (2009), nos quais a atividade de protease de *Candida albicans* URM3622 teve estabilidade acima de 90 % na faixa de pH 6,0 a 8,2 em 90 minutos, com redução a menos de 60 % em pH 10,0. Os valores obtidos com *B. stearothersophilus* DPUA1729 referentes à estabilidade frente ao pH da atividade proteolítica foram mantidos acima de 66% em faixas de pH 6,0 a 9,0, com redução menor que 20 % em pH 10,0 (figura 12b). Resultados similares observados nos estudos realizados por Petrova et al. (2006) produzindo protease utilizando *Streptomyces* sp. Strain 3B e por Sela et al. (1998) usando *Bacillus cereus* na produção protease, estes estudos verificaram a estabilidade da atividade enzimática em faixas de pH (6,5 - 9,0) e (5,6-8,2) respectivamente.

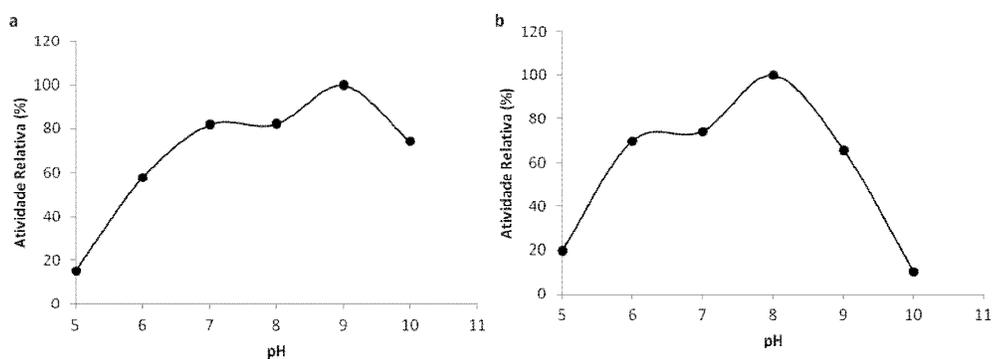


Figura 12 - Estabilidade do pH a 50 °C sobre a atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp. DPUA1728 (12a) e *B. stearothersophilus* DPUA1729 (12b).

Quanto à estabilidade da temperatura sobre a atividade proteolítica de *Bacillus* sp. DPUA1728 e *B. stearothersophilus* DPUA1729 (figura 13) foi constatado que ambos os extratos enzimáticos expressaram atividade em todas as temperaturas testadas (25 °C-80 °C) por 105 minutos. A estabilidade para o extrato de *Bacillus* sp. DPUA1728 foi mantida acima de 97 % entre a faixa de temperatura de 45 °C a 60 °C (figura 13a). Porém, a estabilidade para

o extrato de *B. stearothermophilus* DPUA1729 em relação à temperatura manteve-se acima de 85 % da atividade relativa (figura 13b). Resultado similar à estabilidade da temperatura de *B. stearothermophilus* foi obtido por Nagano e To, (1999), no qual a produção de protease por *Bacillus subtilis* FS-2 foi na faixa de temperaturas de 55 °C a 60 °C.

Os resultados apresentados nesse trabalho referente à estabilidade da atividade enzimática são divergentes dos obtidos por Gupta et al. (2005) que utilizou protease produzida por *Bacillus* sp. DPUA1728, obtendo atividade acima de 80 % a 50 °C e acima de 92 % a 45 °C utilizando um tempo inferior (40 minutos), com redução da atividade relativa a 18% com temperaturas acima de 55 °C e de Suphatharaprateep et al. (2010), usando proteases de *Bacillus cereus* CNA1 e *Klebsiella pneumoniae* CNL3 quando submetidas a 50 °C por um tempo de 60 minutos apresentaram menos de 60 % da atividade relativa, com redução da atividade a 40 % depois de incubado a 55 °C.

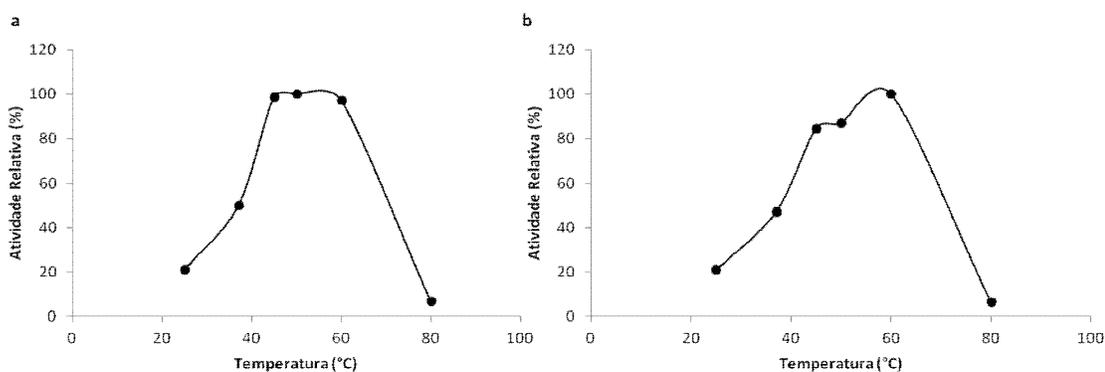


Figura 13 - Estabilidade da temperatura em pH 7,2 sobre a atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp. DPUA1728 (13a) e *B. stearothermophilus* DPUA1729 (13b).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, duas amostras de bactérias do gênero *Bacillus* originárias de solo amazônico, *Bacillus* sp. DPUA1728 e *Bacillus stearothermophilus* DPUA1729, apresentaram produção de proteases colagenolíticas quando submetidas ao meio sólido contendo apenas colágeno solúvel como fonte de carbono. Suas respectivas atividades máximas foram expressas em condições distintas de fermentação (pH, temperatura e concentração de substrato) quando submetidas a um planejamento fatorial 2^3 completo.

Com base nos dados obtidos, na detecção da produção de proteases colagenolíticas e em estudos voltados para essa enzima específica, tanto *Bacillus* sp. DPUA1728 quanto *B.*

stearotherophilus DPUA1729 podem ser micro-organismos de grande potencial para produção de enzimas industriais, em aplicações médicas, cosméticos e alimentos e em processos que utilizam colágeno e couro.

Sugere-se novos trabalhos, como a purificação de enzima mais refinada, efeitos de inibidores, estimação do peso molecular e verificação da citotoxicidade devem ser realizados, a fim de elucidar a utilização desses micro-organismos e suas aplicações biotecnológicas.

6. REFERÊNCIAS

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C. M.A.P.; OMAR, N.B.; ALVEZ, A. G.. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*. *FEMS Microbiol Rev*, v.35, p.201–232, 2011.

ADIGÜZEL , A.C.; BITLISLI, B. O.; YASA, I.; ERIKSEN, N. T.. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.226–234, 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. *Biologia Molecular da Célula*, 4.ed., p.1096-1100, 2004.

ALCARAZ, L. D.; MORENO-HAGELSIEB, G.; EGUIARTE, L. E.; SOUZA, V.; HERRERA-ESTRELLA, L.; OLMEDO, G.. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*, v.11, n.332, p.02-17, 2010.

ASDORNNITHEE, S.; AKIYAMA, K.; SASAKI, T.; TAKATA, R.. Isolation and Characterization of a Collagenolytic Enzyme from *Bacillus licheniformis* N22. *Journal of Fermentation And Bioengineering*, v.78, n.4, 283-287. 1994.

AUSAR, S.; BELTRAMO, D.; CASTAGNA, L.; QUINTANA, S.; SILVERA, E.; KALAYAN, G.; REVIGLIONO, M.; LANDA, C.; BIANCO, I.. Treatment of rheumatoid arthritis by oral administration of bovine tracheal type II collagen. *Rheumatology International*, v. 20, n. 4, p. 138-144, 2001.

BAEHAKI, A.; SUHARTONO, M. T.; SUKARNO; SYAH, D.; SITANGGANG, A. D.; SETYAHADI, S.; MEINHARDT, F. Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *African Journal of Microbiology Research*, v.6, n.10, p. 2373-2379, 2012.

BALADAMENTE, M.A.; HURST, L.C.. Efficacy and Safety of Injectable Mixed Collagenase Subtypes in the Treatment of Dupuytren's Contracture. *The Journal of Hand Surgery*, v.32, n.6, p.767-774, 2007.

BADALEMENTE, M. A.; WANG, E.. Method for treating lateral epicondylitis using collagenase. The Research Foundation of State University of New York (Albany, NY, US). 7854929. Dezembro/2010. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/7854929.html>>. Acesso: 25/01/2012.

BARROW, G. I; FELTHAM, R. K. A.. *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 1993.

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, 248–254, 1976.

- CHAUDRY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G.. Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos. *Polímeros*, São Carlos, v. 7, n. 2, p. 40-46, 1997.
- CHAVIRA, R.J.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN J.H.. Assaying proteinases with azocoll. *Anal. Biochem*, v.136, p.4446–4450, 1984.
- CHU, K. H.. Collagenase chemonucleolysis via epidural injection. A review of 252 cases. *Clin Orthop*, v.215, p.99–104, 1987.
- DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S.; DAVE, D.. Extraction and Purification of Collagenase Enzymes: A Critical Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v.6, n.4, p.239-263, 2010.
- DEMAIM, A. L.. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, v.18, p.499-514, 2000.
- DÍEZ, J.; LAVIADES, C.; MAYOR, G.; GIL, M. J.; MONREAL, I. Increased Serum Concentrations of Procollagen Peptides in Essential Hypertension. *Circulation*. v.91, p.1450-1456, 1995.
- DOUST, R. H.; MOBAREZ, A. M.. Collagenase activity in *Prevotella Bivius* Isolated from patients with premature rupture of membranes. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, v.18, n.1, p. 61-66, 2004.
- ETTOUMI, B.; RADDADI, N.; BORIN, S.; DAFFONCHIO, D.; CHERIF, A.. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments, *Journal of Basic Microbiology*, v.49, p.S13–S23, 2009.
- FRIEDRICH, J.; KERN, S.. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces* microspores. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n.21, p.35–37, 2003.
- GALPER, S.; COHN, E.SPIEGEL, Y.; CHET, I.. A Collagenolytic Fungus, *Cunninghamella elegans*, for Biological Control of Plant-parasitic Nematodes, *Journal of Nematology* v. 25, n.3, p.269-274, 1991.
- GENÇKAL, H.. Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus sp.*. *Master dissertation*. İzmir Institute of Technology, İzmir, Turkey, 2004.
- GUPTA, A.; ROY, I.; PATEL, R. K.; SINGH, S. P.; KHARE, S. K.; GUPTA, M. N.. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus sp.*, *Journal of Chromatography A*, v.1075, p.103–108, 2005.
- HAMDY, H. S.. Extracellular collagenase from *Rhizoctonia solani*: Production, purification and characterization. *Indian Journal of Biotechnology*, v.7, p.333-340, 2008.
- HARRINGTON, D. J.. Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease. *Infection and Immunity*, v.64, n.6, p.1885–1891, 1996.

- HEINO, J.. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bio Essays*, n.29, p.1001-1010, 2007.
- HOULE, MARIE-ANDRE; GRENIER, D.; PLAMONDON, P.; NAKAYAMA, K.. The collagenase activity of *Porphyromonas gingivalis* is due to Arg-gingipain. *FEMS Microbiology Letters*, v.221, p.181-185, 2003.
- HURST, L. C.; BADALAMENTE, M. A.; HENTZ, V. R.; HOTCHKISS, R. N.; KAPLAN, F. T. D.; MEALS, R. A.; SMITH, T. M.; RODZVILLA, J.. Injectable Collagenase *Clostridium Histolyticum* for Dupuytren's Contracture. *N Engl J Med*, v. 361, n.10, p.968-979, 2009.
- ITOI, Y.; HORINAKA, M.; TSUJIMOTO, Y.; MATSUI, H.; WATANABE, K.. Characteristic Features in the Structure and Collagen-Binding Ability of a Thermophilic Collagenolytic Protease from the Thermophile *Geobacillus collagenovorans* MO-1. *Journal of Bacteriology*, v.188, n.18, p.6572-6579, 2006.
- JACKSON, R. J.; LIMA, D. V.; DAO, M. L. Identification and Analysis of a Collagenolytic Activity in *Streptococcus mutans*. *Current microbiology*, v.34, p.49-54, 1997.
- JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S.. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. *The ISME Journal*, v.3, p.1004-1011, 2009.
- JIN, B., H. J; ALTER, Z. C; ZHANG, J. W; SHIH, J. M.; ESTEBAN, T.; SUN, Y. S; YANG, QIU, Q.; LIU, X.L.; YAO, L.; WANG, H. D; CHENG, L. F.. Reversibility of experimental rabbit liver cirrhosis by portal collagenase administration. *Lab. Invest.*, v.85, p.992-1002, 2005.
- JUCÁ M.; NUNES B.L.B.B.P.; MENEZES H.L.; GOMES, E.G.A.; MATOS D.. Metaloproteinases 1 e 7 e Câncer Colorretal. *Rev bras Coloproct*, v.28, n.3, p.353-362, 2008.
- JUNG, W., WINTER, H.. Considerations for the use of clostridial collagenase in practice from clinical drug investigation. *Clin. Drug Invest.*, v.15, n.3, p.245-252,1998.
- KADLER, K. E.; HOLMES, D. F.; TROTTER, J. A.; CHAPMAN, J. A.. Collagen fibril formation, *Biochem. J.*, v. 316, p.1-11, 1996.
- KANG, S.I.; JANG, Y. B.; CHOI, Y. J.; KONG, J. Y.. Purification e properties of a Collagenolytic protease produced by Marine bacterium *Vibrio vulnificus* CYK279H. *Biotechnology an Bioprocess Engineering*, v.10, p.593-598, 2005.
- KANTH, S.V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N. K.; SADULLA, S.. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. *Dyes and Pigments*, v.76, n.2, p.338-347, 2008.
- KAWAHARA, H.; KUSUMOTO, M.; OBATA, H.. Isolation and Characterization os a New Type of Collagenase Producing Bacterium, *Bacillus alvei* DC-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.57, n.8, p.1372-1373, 1993.

KIM, M.; HAMILTON, S.E.; GUDDAT, L.W.; OVERALL, C.M.. Plant collagenase: Unique collagenolytic activity of cysteine proteases from ginger. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1770, n.12, p. 627-1635, 2007.

KINGSTON, I. B.. Nematode Collagen Genes. *Parasitology Today*, v.7, n.1, P.11-15, 1991.

KUŞCU, N. K.; KOYUNCU, F.; LAÇIN. S.. Collagenase treatment of sore nipples. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 76, p. 81-82, 2002.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H.. Microbial alkaline proteases. *Biotechnology Advance*, v.17, n.7, p.561-594,1999.

LABADIE, J.; HEBRAUD, M.. Purification and characterization of a collagenolytic enzyme produced by *Rathayibacter* sp. strains isolated from cultures of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Journal of Applied Microbiology*, v.82, p.141-148, 1997.

LANGMAIER, F.; MLADEK, M.; KOLOMAZN, K.; SUKOP, S.. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for the cosmetic industry. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 24, p.273-279, 2002.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H. R.; WARREN A. J.; LELEN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA poly-merase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol*, v.76, p.103-122, 1973.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M.. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 3a. Edição, Editora Sarvier, p.133-135, 2002.

LI, W.; SABATER, A. L.; CHEN, Y.; HAYASHIDA, Y.; CHEN, S.; HE, H.; TSENG, S. C. G.. A novel method of isolation, preservation, and expansion of human corneal endothelial cells, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 48, n. 2, p. 614-620, 2007.

LIMA, C. A.; RODRIGUES, P. M.B.; PORTO, T. S.; VIANA, D. A.; LIMA FILHO, J. L.; PORTO, A. L.F.; CUNHA, M. G. C.. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM362. *Biochemical Engineering Journal* , v.43 , p.315–320, 2009.

LIMA, C. A.; RODRIGUES, LIMA FILHO, J. L.; NETO, B. B.; CONVERTI, A.; CUNHA, M. G.; PORTO, A. L. F.. Production and Characterization of a Collagenolytic Serine Proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial Study. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.16, p.549-560, 2011.

LINTNER, K.; PESCHARD, O.. Biologically active peptides: from a laboratory bench curiosity to a functional skin care product. *International Journal of Cosmetic Science*, v.22, p. 207-218, 2000.

LIU, L.; MA, M.; CAI, Z; YANG, X, WANG, W.. Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain. *Food Technol. Biotechnol*, v.48, n.2, p.151–160, 2010.

- LUPAN, D. M.; NZIRAMASANGA, P.. Collagenolytic Activity of *Coccidioides immitis*. *Infection and Immunity*, v.51, n.1, p.360-361, 1986.
- MIYOSHI, S.; NITANDA, Y.; FUJII, K.; KAWAHARA, K.; LI, T.; MAEHARA, Y.; RAMAMURTHY, T.; TAKEDA, Y.; SHINODA, S.. Differential gene expression and extracellular secretion of the collagenolytic enzymes by the pathogen *Vibrio parahaemolyticus*, *FEMS Microbiol Lett*, v.283, p.176–181, 2008.
- MOORE, S.; STEIN, W. H.. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* v.176, p.367-388, 1948.
- MOSKOWITZ, R. W.. Role of collagen hydrolysate in Bone and Joint disease. *Seminars of arthritis and Rheumatism*, v.30, n.2, p.87-99, 2000.
- MYLLYHARJU, J.; KIVIRIKKO, K. I.. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics*, v.20, n.1, p.33-43, 2004.
- NAGANO, H.; TO, K.. A. Purification of Collagenase and Specificity it related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2, *Biosci.Biotechnol. Biochem*, v.63, n.7, p.181-183, 1999.
- NAZINA, T. N.; LEBEDEVA, E. V.; POLTARAUS, A. B.; TOUROVA, T. P.; GRIGORYAN, A. A.; SOKOLOVA, D. S.; LYSENKO, A. M.; OSIPOV, G. A.. *Geobacillus gargensis* sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of *Bacillus vulcanias* as *Geobacillus vulcani* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.2019–2024, 2004.
- NICHOLSON, W. L.. Roles of Bacillus endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci*, v. 59, p.410-416, 2002.
- OKAMOTO, M.; YONEJIMA, Y.; TSUJIMOTO, Y.; SUZUKI, Y.; WATANABE, K. A.. Thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic *Bacillus* sp.. strain MO-1. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.57, p.103–108, 2001.
- OUCHI, H.; FUJITA, M.; IKEGAME, S.; YE, Q.; INOSHIMA, I.; HARADA, E.; KUWANO, K.; NAKANISHI, Y.. The role of collagenases in experimental pulmonary fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, v.21, p.401–408, 2008.
- ÖZCAN, C.; ERGÜNO, C., ELIK, M.; ÇÖRDÜK, N.; ÖZOK, G.. Enzymatic debridement of burn wound with collagenase in children with partial-thickness burns. *Burns*, v.28, p.791–794, 2002.
- PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S. P.. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization Process *Biochemistry*, v.40, p.3569-3575, 2005.
- PARKS, W.C. Matrix metalloproteinases in repair. *Wound repair and regeneration*, v.7, n.6 p.423-432, 1999.

- PETROVA, D.H.; SHISHKOV, S.A.; VLAHOV, S.S.. Novel thermostable serine collagenase from *Thermoactinomyces* sp. 21E: Purification and some properties. *J. Basic Microbiol.* v.46, p.275–285, 2006.
- PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, I. O.. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, *Sabouraudia*. v.20, p.7-14, 1982.
- PRIEST, F. G. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, v.41, n., p.711, 1977.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V.. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v.62, n.3, p.597-635, 1998.
- SANTOS, J. G.; CRUZ FILHO, R. F.; LIMA, L. A.; FERNANDES, O. C. C.; TEIXEIRA, M. F. S. E PORTO, A. L. F.. Produção de Proteases Alcalinas por *Bacillus* sp. Isolado do Solo Contendo Resíduos Industriais de Couro. *Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Natal, 2009.
- SCHAFFER, C.; FRANCK W. L., SCHEBERL, A.; KOSMA, P.; MCDERMOTT, T. R.; MESSNER, P.. Classification of isolates from locations in Austria and Yellowstone National Park as *Geobacillus*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.2361–2368, 2004.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A. AND WARD, O. P.. Developments in the use of *Bacillus* sp.pecies for industrial production. *Can. J. Microbiol.* v.50, n.1, p1-17, 2004.
- SELA, S.; SCHICKLER, H.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins. *European Journal of Plant Pathology*, v.104, p.59–67, 1998.
- SHARMA, A.; PANDEY, A.; SHOUCHE, Y. S.; KUMAR, B.; KULKARNI, G.. Characterization and identification of *GeoBacillus* sp.p. isolated from Soldhar hot spring site of Garhwal Himalaya, India, *Journal of Basic Microbiology New Biotechnology*, v.49, p.187-194, 2011.
- SUPHATHARAPRATEEP, W.; CHEIRSILP, B.; JONGJAREONRAK, A.. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. *New Biotechnology*, v.00, n. 00,7 p.01-07, 2011.
- SUPP, D.M.; WILSON-LANDY, K.; BOYCE, S.T.. Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. *FASEB Journal*, v. 16, n. 8, p. 797-804, 2002.
- THWAITE, J.E.; LAWS, T.R.; ATKINS, T.P.; ATKINS, H. S.. Differential cell surface properties of vegetative *Bacillus*. *Letters in Applied Microbiology*, v.48, p.373–378, 2009.
- TRAN, K. A.; NAGANO, H.. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. *J. Food Sci.* v. 67, p.1184–1187, 2002.

- VARGAS, D.M.; AUDÍ, L.; CARRASCOSA, A.. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev Ass Med Brasil*, n.43, v.4, p.367-70, 1997.
- VEIT, G.; KOBBE, B.; KEENE, D. R.; PAULSSON, M.; KOCH, M.; WAGENER, R.. Collagen XXVIII, a Novel vonWillebrand Factor A Domain containing Protein with Many Imperfections in the Collagenous Domain, *The journal of biological chemistry*, v.281, n.06, p.3494–3504, 2006.
- WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.63, p.520–526.
- WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J.. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1694, p.299– 310, 2004.
- WEGMAN, E. H.; BRONSTHER, B.; JACOB, E. T.. Reduction of adipose tissue using collagenase. advance biofactures of Curacao N.V. (Industrial Park, Brievengat, Curacao, AN). EP0721781. Março/2002. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/EP0721781.html>> Acesso: 25/01/2012.
- WOLBURG, H. et. al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. *Journal of Cell Science*, v.107, p.1347-1357, 1994.
- WU, J.; FUJIOKA, M.; SUGIMOTO, K.; MU, G.; ISHIMI, Y.. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats, *J Bone Miner Metab*, v.22, p.547–553, 2004.
- WU, Q.; LI, C. H.; LI, C.; CHEN, H.; SHULIANG, L.. Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* Col-J. *Appl Biochem Biotechnol*, v.160, p.129–139, 2010.
- ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P.. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 enzyme production and its partial characterization, *New Biotechnology*, v.28, n.2, p. 173-181, 2011.
- ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; JÚNIOR, C. W.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J.. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico, *Revista Liberato*, v.10, n.14, p.123-137, 2009.