

CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS E APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA

PEPTIDASES EM BIOTECNOLOGIA: PRODUÇÃO, APLICAÇÕES E MERCADO

Anderson Fragoso dos Santos
Rafael Messias Gandra
Simone Santiago Carvalho de Oliveira
Lucimar Ferreira Kneipp
Claudia Masini d'Avila-Levy
Cátia Lacerda Sodré
Marta Helena Branquinha
André Luis Souza dos Santos

11.1 INTRODUÇÃO

As enzimas são de fundamental importância à existência da vida sob diferentes aspectos, uma vez que desempenham funções centrais em processos metabólicos essenciais à manutenção da homeostase e dinâmica celular¹. As enzimas (do grego *en*, dentro, e *zyme*, fermento) são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas e aceleram a velocidade de uma reação química. As enzimas têm valor comercial, pois apresentam múltiplas aplicações em diversos setores industriais, como nas indústrias de detergentes, alimentos, têxteis, farmacêuticas, cosméticos, diagnósticos e química fina²⁻⁷. O uso

de enzimas em processos industriais, em detrimento aos métodos químicos convencionais, vem sendo proposto com veemência devido ao fato de os processos enzimáticos não serem tóxicos, o que minimiza o impacto ambiental. A aplicação de enzimas apresenta também como vantagens: a economia de água, energia, produtos químicos e redução do custo no tratamento de efluentes²⁻⁷.

As peptidases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas utilizadas em diferentes processos industriais (Tabela 11.1). Correspondem a aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas industriais, a saber: peptidases alcalinas (25%), tripsinas (3%), reninas (10%) e outras peptidases (21%)²⁻⁷. As principais companhias produtoras de peptidases no mundo estão listadas na Tabela 11.2.

Tabela 11.1 Aplicações de peptidases em processos industriais

INDÚSTRIA	PEPTIDASE	APLICAÇÃO
Panificação	Peptidase neutra	Condicionador de massa
Produção de bebidas	Papaína	Remoção da turvação em bebidas
Indústria de laticínios	Peptidases fúngicas, quimosina, outras peptidases	Substituição do uso da renina de bezerras, processamento das proteínas do soro do leite, produção de enzima modificadora do queijo
Indústria de detergentes	Peptidase alcalina, subtilisina	Detergentes usados em máquinas de lavar roupa para remoção de manchas
Processamento de alimentos	Várias peptidases	Modificação de materiais ricos em proteína, como proteínas da soja ou glúten
Indústria do couro	Tripsina, outras peptidases	Amaciamento do couro, remoção de pelos
Indústria de carne e peixe	Papaína, outras peptidases	Amaciamento da carne, recuperação de proteínas de ossos e restos de peixe
Medicina	Tripsina	Remoção de tecidos necrosados, agente fibrinolítico
Indústria fotográfica	Várias peptidases	Recuperação da prata usada em filmes fotográficos e de raios X
Produção de adoçantes	Termolisina	Hidrólise reversa durante a síntese do aspartame

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)², Rao et al. (2013)⁴ e Ray (2012)⁶.

Tabela 11.2 Principais indústrias produtoras de peptidases

COMPANHIA	PAÍS	PARTICIPAÇÃO DE MERCADO
Novozymes e Novo Nordisk	Dinamarca	40%
Gist-Brocades	Holanda	20%
Genencor International	Estados Unidos da América	10%
Miles Laboratories	Estados Unidos da América	10%
Advance Biochemicals	Índia	
Amano Pharmaceuticals	Japão	
DSM	Holanda	
EKR Therapeutics	Estados Unidos da América	
Enzyme Development	Estados Unidos da América	
Genentech	Estados Unidos da América	
Godo Shusei	Japão	20%
Henkel	Alemanha	
Kao Corporation	Japão	
Nagase Biochemicals	Japão	
Rohm	Alemanha	
Solvay Enzymes GmbH	Alemanha	
Wuxi Synder Bioproducts	China	

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)², Rao et al. (2013)⁴, Ray (2012)⁶ e Gupta et al., 2002.

Os micro-organismos são responsáveis por uma parcela considerável, cerca de dois terços, da produção de peptidases comerciais em todo o mundo^{2,7,8}. As peptidases microbianas são classificadas em vários grupos, dependendo de suas características físico-químicas: por exemplo, atividade ótima em condições ácidas, neutras ou alcalinas de pH, assim como as características do grupamento químico presente no centro ativo da enzima. Nesse contexto, as peptidases alcalinas secretadas por micro-organismos têm destaque em diferentes processos industriais. Diferentes empresas de todo o mundo lançaram com sucesso vários produtos contendo em suas formulações peptidases alcalinas, como detergentes e produtos de limpeza para membranas filtrantes e materiais cirúrgicos^{2,7,8}. As peptidases microbianas para uso industrial são produzidas, principalmente, por diferentes espécies de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* e também por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*⁹. Embora existam muitas fontes microbianas disponíveis para a produção de peptidases, apenas alguns poucos

micro-organismos são reconhecidos como produtores comerciais. A Tabela 11.3 sumariza algumas espécies microbianas produtoras de peptidases alcalinas de interesse biotecnológico.

Tabela 11.3 Principais micro-organismos produtores de peptidases alcalinas de interesse industrial

GÊNEROS	ESPÉCIES
<i>Bacillus</i>	<i>B. alcalophilus</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i> , <i>B. circulans</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. firmus</i> , <i>B. intermedius</i> , <i>B. lentus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. proteolyticus</i> , <i>B. pumilus</i> , <i>B. sphaericus</i> , <i>B. stearothermophilus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. thuringiensis</i> e diferentes cepas de <i>Bacillus</i> sp.
<i>Aspergillus</i>	<i>A. candidus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. mellius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>A. sojae</i> , <i>A. sulphureus</i> , <i>A. sydowi</i> e diferentes cepas de <i>Aspergillus</i> sp.
Outros	<i>Clostridium</i> sp., <i>Cryphonectria parasitica</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Serratia</i> sp.

Fonte: Adaptado de Kumar e Takagi (1999)² e Jisha et al. (2013)⁸.

11.2 CLASSIFICAÇÃO DAS PEPTIDASES

Os termos encontrados na literatura para se referir às enzimas hidrolíticas capazes de clivar ligações peptídicas são peptidases, peptídeo-hidrolases, proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas. Apesar de esses termos serem usados comumente como sinônimos, o termo que melhor representa toda abrangência desta classe enzimática é peptidases. O termo proteinase, por exemplo, refere-se a uma subdivisão das peptidases, as endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas da molécula de proteína, e não as porções amino ou carboxiterminal, que são denominadas exopeptidases (Figura 11.1). Dessa forma, o termo proteinase surge pela inserção da partícula “*in*”, que na língua inglesa significa dentro, para designar a clivagem “dentro” da molécula de proteína. Já os termos proteases ou enzimas proteolíticas, por suas naturezas etimológicas, excluem aquelas enzimas que clivam ligações peptídicas em peptídeos, além de não refletirem a natureza da hidrólise realizada, que se dá sobre a ligação peptídica. Por essas razões, o termo peptidases é o empregado e recomendado pelos comitês de nomenclatura em bioquímica* e pelo banco de dados MEROPS**^{10,11}.

* Ver <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>.

** Ver <http://merops.sanger.ac.uk/>.

Os comitês de nomenclatura enzimática formam a Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN), composta pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) e pela International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). As peptidases pertencem à classe enzimática (do inglês, *enzyme class* – EC) 3 (hidrolases), subclasse 3.4 (peptidases). Essas enzimas são ainda subdivididas em exopeptidases (EC 3.4.11 a 3.4.19) e endopeptidases (EC 3.4.21 a 3.4.25); aquelas com mecanismo catalítico desconhecido são agrupadas temporariamente sob a classe EC 3.4.99 (Figura 11.1). Esses dois subgrupos, endopeptidases e exopeptidases, possuem ainda subclassificações quanto ao aminoácido liberado na catálise e natureza do sítio catalítico. Enzimas hidrolíticas costumam ser classificadas e denominadas em função da natureza de seus respectivos substratos; entretanto, para peptidases essa abordagem não é eficiente. Embora essas enzimas basicamente clivem ligações peptídicas, existem diferenças quanto à posição da ligação hidrolisada na cadeia peptídica e a sequência de aminoácidos de preferência nos dois lados dessa ligação (...-P'3-P'2-P'1—P1-P2-P3-...) (Figura 11.1). Se tais diferenças fossem consideradas, seria praticamente impossível construir um sistema geral de classificação e nomenclatura das peptidases. Devido a isso, o sistema de classificação empregado se baseia no tipo de reação catalisada, natureza química do sítio catalítico e relações evolutivas baseadas na sequência de aminoácidos e estrutura terciária da peptidase. Com base na natureza química do sítio catalítico, as carboxipeptidases, que clivam ligações peptídicas na porção carboxiterminal de substratos proteicos, são subdivididas em serina (EC 3.4.16), metalo (EC 3.4.17) e cisteína-peptidases (EC 3.4.18). As endopeptidases são subdivididas em serina (EC 3.4.21.), cisteína (EC 3.4.22), aspártico (EC 3.4.23), metalo (EC 3.4.24) e treonina-peptidases (EC 3.4.25) (Figura 11.1). Os nomes derivam do aminoácido crítico para a catálise, ao passo que as metalopeptidases dependem de um ou dois íons metálicos para essa função. Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu sítio ativo. Este método de classificação, com base na natureza química do sítio catalítico, foi implementado com sucesso e foi um dos melhores sistemas de classificação desenvolvidos até o presente momento. Entretanto, com a disponibilização de diversos genomas completos, ficou evidente a complexidade da classificação e análise dessa classe enzimática. Por exemplo, há dez anos, dos 90 genomas sequenciados, as peptidases e seus homólogos correspondiam a 3% do total de produtos gênicos em todos os organismos⁹. Entretanto, nas últimas duas décadas, a velocidade

de alimentação dos bancos de dados com novas sequências tem crescido de forma logarítmica¹².

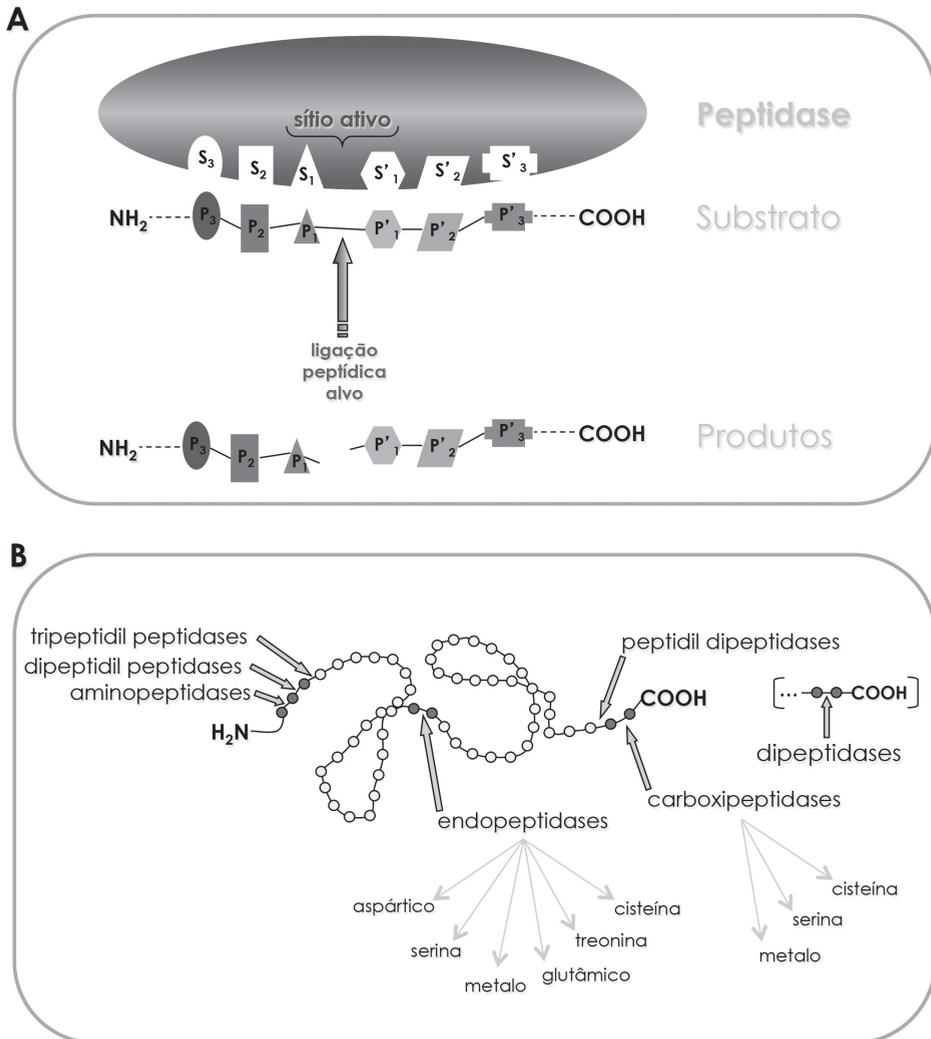


Figura 11.1 (A) Representação esquemática da região de ligação e do sítio catalítico (sítio ativo) de uma peptidase. Esta peptidase hipotética possui seis subsítios (S1, S2, S3 e S'1, S'2, S'3) em seu sítio catalítico e, conseqüentemente, é capaz de reconhecer e ligar-se a uma seqüência de seis aminoácidos (P1, P2, P3 e P'1, P'2, P'3) no substrato proteico. Após a proteólise, pelo menos dois peptídeos menores são gerados como produtos de reação. (B) Classificação das peptidases. Círculos cinza-claros representam os aminoácidos e os círculos cinza-escuros indicam a seqüência de aminoácidos que se ligará à peptidase. As setas grossas apontam para o local de clivagem no substrato proteico. As setas finas indicam a subclassificação de carboxipeptidases e endopeptidases de acordo com o grupamento químico presente no sítio catalítico da enzima.

O banco de dados MEROPS apresenta um sistema de classificação e nomenclatura para as peptidases e seus inibidores que acompanha a velocidade de geração de informação da era conhecida como “pós-genômica”. Esse sistema agrupa as enzimas em famílias de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. As famílias de mesma ancestralidade são, por sua vez, agrupadas em clãs, sendo esse tipo de informação determinada pela estrutura terciária das peptidases¹². Esse banco de dados tem sido amplamente usado pela comunidade científica devido à sua abrangência, completude, integração de informações e interface de uso amigável (“*user friendly*”). Nesse banco de dados, estão reunidas e organizadas uma série de informações críticas para quem deseja aprofundar o conhecimento em peptidases, sendo facilmente acessadas informações como: identificador da sequência no MEROPS; nome científico do organismo no qual foi realizada a caracterização; tamanho da sequência; assinalamento do domínio responsável pela atividade peptidásica; identificação da tríade catalítica presumida (e íons metálicos para as metalo-peptidases); *link* para o número de acesso em outros bancos de dados; sítios de clivagem conhecidos em substratos; lista de substratos degradados; inibidores conhecidos; homologia com peptidases “tipo” (aquelas bem caracterizadas); nome do gene incluindo índice de sinônimos conhecidos e lócus em caso de genomas completos; *link* para referência bibliográfica (atualmente existem mais de 44 mil referências indexadas nesse banco de dados); e visualização da estrutura terciária quando disponível¹². As famílias são representadas por uma letra, que indica o mecanismo catalítico e um número característico de cada enzima. O clã é representado por duas letras: a primeira indica o tipo de mecanismo catalítico e a segunda é adicionada sequencialmente. As letras usadas são “A” (aspártico-peptidases), “C” (cisteína-peptidases), “G” (glutâmico-peptidases), “M” (metalo-peptidases), “S” (serina-peptidases), “T” (treonina-peptidases) ou “U” (tipo desconhecido, do inglês, *unknown*)¹⁰⁻¹².

11.3 INIBIDORES DE PEPTIDASES

Inibidores de peptidases são ferramentas importantes para estudos funcionais e bioquímicos dessa classe de enzimas. O banco de dados MEROPS cataloga informações referente aos inibidores de peptidases, que podem ser classificados em proteicos ou pequenas moléculas. Os inibidores de origem proteica são classificados em famílias e clãs com base na sequência de aminoácidos e estrutura terciária, de forma similar ao que ocorre no próprio

MEROPS com as peptidases. No entanto, os inibidores de peptidases referentes a moléculas pequenas não se encaixam em nenhum tipo de classificação, em função da ampla variedade de estruturas químicas, e, portanto, recebem a letra “J” seguida da numeração que identifica cada composto¹². Os inibidores de peptidases podem reagir com mais de uma classe de peptidase, uma única classe, ou reagir com uma única peptidase. No banco de dados MEROPS, diversas informações úteis de cada inibidor foram organizadas, tais como: nome e sinônimos, estrutura química, peptidases inibidas, mecanismo de inibição, referências bibliográficas, histórico, comentários em geral (incluindo a solubilidade em água ou solventes orgânicos) e classe do inibidor¹².

A inibição seletiva de peptidases é uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de infecções virais e parasitárias; câncer; condições inflamatórias, imunológicas e respiratórias; e distúrbios cardiovasculares e degenerativas, incluindo a doença de Alzheimer. Entretanto, frente a esse enorme potencial, o número de moléculas aprovadas para uso clínico ainda é baixo^{13,14}. Atualmente, entre as classes de peptidases com aplicação para desenvolvimento de fármacos estão as serina, metalo, cisteína, aspártico e treonina-peptidases. A inibição de serina-peptidases tem sido alvo no combate a doenças inflamatórias como asma e artrite reumatoide, além da atuação sobre a cascata de coagulação sanguínea. Já existem compostos com uso clínico aprovado para o tratamento da trombose e doenças inflamatórias (Tabela 11.4). Até o presente momento, não há fármacos disponíveis no mercado para inibição da classe das cisteína-peptidases. No entanto, diversos estudos apontam para o desenvolvimento de drogas contra as cisteína-peptidases, reconhecidas como fatores de virulência, produzidas por protozoários como *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum*, os causadores de doenças negligenciadas como leishmaniose, doença de Chagas e malária, respectivamente¹⁵. Em relação à classe das metalo-peptidases, existem produtos com uso clínico aprovado e que são amplamente utilizados no tratamento de hipertensão e periodontite¹³. Por fim, a inibição da classe das aspártico-peptidases representa um dos primeiros exemplos bem-sucedidos do desenvolvimento de inibidores de peptidases baseados em estudos de modelagem molecular. A partir da descrição da estrutura tridimensional da peptidase do vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* – HIV), agente etiológico da síndrome de imunodeficiência adquirida (*acquired immune deficiency syndrome* – AIDS), os inibidores foram desenhados para se ligarem especificamente ao sítio ativo da enzima viral. Atualmente, existem dez inibidores da aspártico peptidase do HIV com amplo uso

na clínica médica (Tabela 11.4)^{16,17}. Existe ainda uma série de compostos inibidores da β -secretase (do inglês *beta-amyloid-converting enzyme* – BACE) para o tratamento da doença de Alzheimer, que estão em diferentes fases de testes clínicos (exemplo: MK-8931, desenvolvido pela empresa farmacêutica Merck, que iniciou os testes clínicos de fase II/III em dezembro de 2012*), bem como inibidores de renina para o tratamento da hipertensão**.

Tabela 11.4 Lista de inibidores de peptidases utilizados na clínica médica

CLASSE DE PEPTIDASE	ENZIMA-ALVO	INDICAÇÃO	NOME DO FÁRMACO	FABRICANTE
Serina	Trombina	Trombose venosa	Ximelagatran	Astra Zeneca
Serina	Trombina	Trombose arterial	Argatroban	Mitsubishi Pharma
Serina	Elastase	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), inflamação	SivelaSTAT, Elastopol	Ono
Serina	Ampla espectro	Pancreatite, inflamação	Nafamostat, FUT175	Japan Tobacco
Serina	Ampla espectro	Pancreatite	Camostat mesilate	Ono
Treonina	Proteassoma	Câncer (mieloma)	Bortezomib	Millenium
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Ritonavir	Abbott Laboratories
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Lopinavir	Abbott Laboratories
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Nelfinavir	Pfizer
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb Company
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Amprenavir	GlaxoSmithKline
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Saquinavir	Hoffmann-La Roche
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Indinavir	Merck & Co.
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Fosamprenavir	GlaxoSmith Kline
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Tipranavir	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals
Aspártico	HIV-1 peptidase	HIV/AIDS	Darunavir	Tibotec Pharmaceuticals
Metalo	ACE (enzima conversora de angiotensina)	Hipertensão	Trandolapril, Enalapril, Captopril e vários outros	Vários
Metalo	MMP-1 (metalo-peptidase de matriz 1)	Periodontite	Doxycycline	CollaGenex

* Ver <http://www.mercknewsroom.com/press-release/research-and-development-news/merck-initiates-phase-iii-study-investigational-bace-i>.

** Ver <http://www.actelion.com>.

CLASSE DE PEPTIDASE	ENZIMA-ALVO	INDICAÇÃO	NOME DO FÁRMACO	FABRICANTE
Metalo	MMP-2 (metalo-peptidase de matriz 2)	Doenças periodontais	Periostat	Vários
Metalo	MMP-8 (metalo-peptidase de matriz 8)	Osteoartrite	Glucosamine	Rottapharm

Fontes: Adaptado de Dash et al. (2003)¹⁶ e Santos e Braga-Silva (2013)¹⁷.

11.4 MERCADO, APLICAÇÃO E PRODUÇÃO DE PEPTIDASES: VISÃO GLOBAL

O principal objetivo desta seção é apresentar uma análise abrangente e atual do mercado, aplicação e produção de peptidases, bem como uma projeção futura no mercado mundial de enzimas.

Dentre as enzimas empregadas para fins industriais, 75% pertencem à classe das hidrolases e, nesse universo, as peptidases representam aproximadamente 60%⁴. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated* denominado *World Enzyme*, o mercado mundial de peptidases foi avaliado em 975 milhões de dólares em 2000, 1,2 bilhões de dólares em 2005 e 1,6 bilhões de dólares em 2010. O mercado estimado para 2015 é de cerca de 2,2 bilhões de dólares, com uma projeção de crescimento anual de aproximadamente 6%, chegando a aproximadamente 2,8 bilhões de dólares até o ano de 2020 (Tabela 11.5).¹⁸⁻²⁰ O mercado de peptidases está dividido em peptidases industriais (usadas em produtos de limpeza, alimentos e bebidas, entre outras aplicações) e peptidases especiais (usadas em produtos farmacêuticos, por exemplo). Em 2010, as peptidases de uso industrial representaram cerca de 67% da demanda mundial de peptidases, chegando à vultosa quantia de aproximadamente 1,12 bilhões de dólares.¹⁸⁻²⁰

A demanda mundial por enzimas foi avaliada em 5,7 bilhões de dólares em 2010, e o mercado de peptidases correspondeu a cerca de 29% deste montante (Tabela 11.5). As peptidases executam uma ampla variedade de funções nos mais diversos setores industriais, com importantes aplicações na formulação de detergentes, na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil,

* Ver <http://www.freedoniagroup.com/>.

de cosméticos e de produtos de higiene pessoal, bem como em rações para animais, papel e celulose, pesquisa, biotecnologia e processos de biorremediação^{2,5,7,18-22}. A utilização de peptidases em um conjunto diversificado de aplicações significa que uma grande variedade de empresas oferecem essas enzimas. Enquanto muitas empresas, como Genentech e EKR Therapeutics, restringem suas ofertas a mercados específicos, a Novozymes e Novo Nordisk, líderes mundiais no mercado de enzimas, oferecem peptidases para quase todas as aplicações industriais*.¹⁸⁻²⁰

Tabela 11.5 Demanda mundial de peptidases

ANO	2000	2005	2010	2015	2020
Produto interno bruto mundial (bilhões de US\$)	53.660	63.890	75.350	92.800	113.800
US\$ peptidases/milhões de US\$ PIB	18	20	22	24	25
Demanda mundial de peptidases (milhões de US\$)	975	1.260	1.675	2.200	2.850
Industrial:	715	852	1.120	1.479	1.951
Produtos de limpeza	415	480	600	760	940
Alimentos e bebidas	222	285	415	585	825
Outros produtos industriais	78	87	105	134	186
Especial:	260	408	555	721	899
Produtos farmacêuticos	215	352	485	625	760
Outros produtos especiais	45	56	70	96	139
Demanda mundial de enzimas (milhões de US\$)	2.625	3.830	5.750	7.980	11.250
% peptidases	37,1	32,9	29,1	27,6	25,3

Fonte: Adaptado de Freedonia Group Incorporated.¹⁸⁻²⁰

O mercado com maior projeção de crescimento na demanda por peptidases para os próximos anos é o de alimentos e bebidas. A estimativa de aumento é de aproximadamente 99% até 2020, chegando a 585 milhões de

* Ver [<http://www.freedoniagroup.com/>]

dólares e 825 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5).¹⁸⁻²⁰ O crescimento vertiginoso de produção de peptidases nesses dois setores compensará os avanços mais modestos na maioria dos outros mercados. Nesse setor, as peptidases têm aplicação cada vez maior na melhoria de alimentos proteicos em relação ao seu sabor, aroma, textura, funcionalidade e a sua qualidade nutricional. As proteínas modificadas enzimaticamente podem também substituir gorduras e glicídios, fornecendo ao alimento a textura e a qualidade desejadas. Na indústria de queijos, por exemplo, as peptidases atuam no sentido de prevenir a coagulação do leite durante a produção, hidrolisando proteínas específicas chamadas caseínas⁵. Na indústria de carne, uma peptidase denominada papaína foi utilizada pela primeira vez como amaciante. A papaína foi extraída originalmente de folhas e frutos verdes da planta *Carica papaya*; porém, atualmente são mais usuais as de origem microbiana. Peptidases são também usadas na produção de extrato de carne, ingrediente muito comum no preparo de sopas e molhos²³, e têm papel importante nas formulações de alimentos infantis e de produtos dietéticos específicos^{24,25}. Além disso, as peptidases têm sido cada vez mais utilizadas para reduzir a viscosidade na fabricação de cerveja e para auxiliar na limpeza de membranas filtrantes usadas em processamento de suco de frutas, tendo também relevante papel na fortificação dessas bebidas, atuando na preparação de hidrolisados proteicos com elevados valores nutritivos. Dentre todas as aplicações citadas no setor de alimentos e bebidas, o uso na coagulação para fabricação de queijos constitui a maior utilização.

A aplicação de peptidases na indústria farmacêutica tem uma projeção de crescimento de 57% até 2020, chegando a 625 milhões de dólares e 760 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5). A maior demanda por peptidases nesse setor tem sido, historicamente, para o tratamento de enfermidades como infarto agudo do miocárdio e outras doenças relacionadas à formação de coágulos sanguíneos. Essas enzimas são utilizadas na formulação de trombolíticos, que são fármacos empregados para dissolver os trombos. A maior fabricante de enzimas trombolíticas é a Genentech, seguida por EKR Therapeutics, que produz a Retavase[®]. No entanto, a concorrência com outras drogas e o crescimento de tratamentos alternativos vêm alterando o mercado nos últimos anos, refletindo no uso cada vez maior de drogas como Botox[®] (Allergan Inc.) e Dysport[®] (Ipsen), formuladas à base da toxina botulínica²⁶. Esse novo mercado tem ultrapassado trombolíticos como o maior setor de aplicação de peptidases em produtos farmacêuticos. Peptidases também são componentes importantes e úteis em produtos biofarmacêuticos, tais como soluções enzimáticas para

remoção de impurezas em lentes de contato²⁷. As peptidases também são usadas em tratamentos de pele, ajudando no processo de cura natural de ulcerações, removendo de forma eficiente o material necrosado²⁸. O potencial de introdução de enzimas recombinantes com maior eficácia nesse setor ajudará a impulsionar o crescimento, reduzindo a média de preços desses produtos. Associado a isso, um número cada vez maior de consumidores está se voltando para o uso de enzimas digestivas como suplementos nutricionais, o que vem proporcionando um crescimento promissor nessa área²⁸.

Outro grande mercado em que as peptidases vêm sendo aplicadas é a indústria de couro, onde são utilizadas nas etapas de imersão, depilação e amaciamento. Por razões ambientais, esse setor industrial vem substituindo o uso de processos à base de sulfeto de hidrogênio e outros produtos químicos por bioprocessos à base de enzimas, que oferecem outras vantagens, como: fácil controle, aumento da velocidade de reação e redução na geração de rejeitos^{7,5,29}. Nesse contexto, as peptidases alcalinas com atividade elastinolítica e queratinolítica são as que vêm sendo mais utilizadas³⁰. Tradicionalmente, era mais comum o uso de enzimas pancreáticas nesses processos, porém há algum tempo o uso de peptidases microbianas vem substituindo essas enzimas de origem animal³¹.

O mercado com maior aplicação de peptidases é o de produtos de limpeza, que em 2010 correspondeu a cerca de 35% de toda a demanda mundial por peptidases, podendo chegar a um montante de 760 milhões de dólares e 940 milhões de dólares em 2015 e 2020, respectivamente (Tabela 11.5). Essas enzimas têm encontrado uso extensivo em detergentes tanto para máquinas de lavanderia quanto de louças. Atualmente, os principais mercados nesse setor estão nas regiões mais desenvolvidas da América do Norte e da Europa Ocidental, havendo forte pressão sobre os preços em consequência da grande concorrência entre as empresas líderes no mercado. O que ajudará a sustentar o crescimento na área será o uso de enzimas novas e com maior valor, que possam atender às preocupações ambientais e aos altos custos de energia, limpando melhor em temperaturas mais baixas. Em 2011, a Novozymes lançou Evity Blaze[®], uma nova peptidase voltada para aplicações em máquinas de lavar louças. Entre os outros mercados de enzimas industriais, o de produtos de limpeza tem como tendência um forte crescimento à medida que novas enzimas sejam lançadas nos países desenvolvidos e uma maior inserção no mercado seja alcançada nos países em desenvolvimento, como o Brasil, por exemplo.

O Brasil responde por cerca de 60% do consumo total de enzimas na América Latina e, mesmo assim, o país importa muito mais (86%) do que

exporta (14%)³². Isso mostra um atraso tecnológico em relação à produção nacional de biocatalisadores, mas, ao mesmo tempo evidencia que a expansão da biocatálise é particularmente relevante para o Brasil, não somente pelo tamanho promissor do mercado interno para esse setor, como também porque existe no país o conhecimento necessário das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, por processos fermentativos e extrativos, assim como a maior biodiversidade do planeta como fonte de biocatalisadores³³. Além disso, a tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com o uso de matérias-primas renováveis e com a preservação ambiental, questão fundamental para o país, visto que o meio ambiente brasileiro é um ativo de valor incalculável e que contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional. Agregar valor a essa biodiversidade parece ser uma das únicas formas que restaram para preservá-la. Nesse contexto, para que a biocatálise seja considerada uma ferramenta de rotina em processos economicamente sustentáveis e apresente vantagens competitivas, devem ser preenchidas condições básicas relacionadas à disponibilidade das enzimas, à previsibilidade do seu desempenho e seu custo³⁴. Portanto, para que isso ocorra, a produção de enzimas deve acontecer da forma mais econômica possível. Em processos biotecnológicos, uma estratégia para a condução de etapas de conversão microbiológica de baixo custo é a fermentação em estado sólido (FES)³⁵. Estima-se que por volta de 30% a 40% do custo envolvido na produção de peptidases devam-se ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos³⁶. Soma-se a isso o fato de que a economia brasileira é uma das mais importantes economias baseadas na agricultura no mundo e que o país tem papel de destaque na produção de biocombustíveis, colocando-se como um grande produtor agroindustrial³⁷. Consequentemente, essa grande produção é responsável pela geração de uma quantidade muito elevada de resíduos que causam sérios problemas ambientais^{38,39}. Portanto, a produção de peptidases e outras enzimas por FES pode ser uma estratégia promissora para o reaproveitamento desses coprodutos.

11.5 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE DETERGENTES

O primeiro detergente a utilizar enzimas, o Burnus®, é datado do ano de 1914, quando dois pesquisadores alemães, Rohm e Haas, usaram inicialmente peptidases produzidas por pâncreas de animais. Somente após 42 anos foi lançado o primeiro detergente contendo enzimas de origem bacteriana,

com o nome comercial de Bio-40^{®7}. Entretanto, foi só a partir dos anos 1960 que o mercado de detergentes enzimáticos despontou. As empresas Biotex, Denmarkunder Biotex, Novozymes e Novo Nordisk começaram a comercializar um poderoso detergente contendo em sua composição uma peptidase alcalina, a alcalase. O detergente produzido pela Novo Nordisk recebeu o nome comercial de Biotex[®] e contém em sua formulação uma peptidase produzida por *Bacillus licheniformis*. Após meados dos anos 1960, o mercado cresceu ainda mais devido à utilização de *pools* de diferentes enzimas na composição dos detergentes, tornando sua ação ainda mais eficiente, principalmente sobre manchas provenientes de alimentos complexos, que anteriormente requeriam a utilização de grandes quantidades de detergentes tradicionais. No entanto, por volta dos anos 1970, o mercado retrocedeu um pouco devido às reações alérgicas que alguns desses produtos provocaram em seus consumidores, problema que foi posteriormente resolvido com a introdução de produtos encapsulados.

Nos últimos 20 anos, o mercado de enzimas em detergentes cresceu quase dez vezes⁵. Em 2010, o setor de detergente representou 34% da venda total de peptidases, enquanto os setores de fármacos, alimentos e bebidas e outros produtos representaram 32%, 24% e 10%, respectivamente¹⁸⁻²⁰. Segundo estudos realizados por analistas de mercado da Freedonia Group Incorporated,¹⁸⁻²⁰ o mercado mundial de peptidases em produtos de limpeza foi avaliado em 415 milhões de dólares e 480 milhões de dólares em 2000 e 2005, respectivamente, tendo atingido cerca de 600 milhões de dólares em 2010. O mercado estimado para 2015 é de cerca de 760 milhões de dólares, com uma projeção de crescimento anual de mais ou menos 6,5%, chegando a 940 milhões de dólares até 2020 (Tabela 11.5).

As peptidases oriundas de micro-organismos são as enzimas mais amplamente exploradas no setor de detergentes⁴⁰⁻⁴². Nos últimos 30 anos, a importância dessas enzimas na formulação de detergentes aumentou significativamente, passando de pequenos aditivos a ingredientes-chave⁵. Atualmente, a grande maioria das peptidases usadas em detergentes é produzida por bactérias, principalmente do gênero *Bacillus*, sobretudo as do tipo serina-peptidases, como as subtilisinas e/ou peptidases ativas e estáveis em pH alcalino. Alguns dos produtos comerciais que contêm essas enzimas em sua formulação estão listados na Tabela 11.6^{5,7,43,44}. Novozymes, Novo Nordisk e Genencor International são os principais fornecedores de enzimas para detergentes, suprindo aproximadamente 95% do mercado global de peptidases (Tabela 11.6).

Tabela 11.6 Peptidases comerciais em formulações de detergentes

NOME COMERCIAL	FONTE	INDÚSTRIA	FORMULAÇÃO PADRÃO	PROPRIEDADES
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk Novozymes	Granulado Líquido	Atuação em baixo pH (6,5 a 8,5) Utilização em lâ
Alcalase Ultra	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	Atuação em baixo pH (6,5 a 8,5) Utilização em lâ Substitui a utilização de borato
Durazym	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	–
Easzyzyme	Não especificado	Novozymes	Líquido	Estabilidade em sabão em barras Utilização em produtos de baixa qualidade
Esperase	<i>Bacillus lentus</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	–
Everlase	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Granulado Líquido	Compatibilidade com outras enzimas Utilização em detergentes multienzimáticos Tolerante a alvejantes
Kannase	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	Lavagem a frio
Liquanase	Não especificado	Novozymes	Líquido	Atuação em baixas temperaturas Remoção de manchas sanguíneas
Liquanase Ultra	Não especificado	Novozymes	Líquido	Branqueador Agente antirre deposição Elimina a necessidade de borato
Ovozyme	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	Detergente para lava-louças
Polarzyme	<i>Bacillus sp.</i>	Novozymes	Granulado	Atuação em baixa temperatura Utilização em detergentes para mãos
Properase	<i>Bacillus sp.</i>	Genencor International	Líquido	Atuação em baixa temperatura e elevado pH
Purafect	<i>Bacillus lentus</i>	Genencor International	Líquido	Atuação em elevado pH
Savinase	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Granulado Líquido	Atuação em baixa temperatura e elevado pH Utilização em detergentes em pó
Savinase Ultra	<i>Bacillus sp.</i>	Novo Nordisk Novozymes	Líquido	Atuação em baixa temperatura e elevado pH Utilização em detergentes em pó Substitui a utilização de borato

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Kirk et al (2002)⁴³, Kumar et al. (2008)⁴⁴.

As peptidases consideradas ideais para aplicação em detergentes devem possuir uma ampla especificidade para diversos substratos, facilitando a remoção de uma grande variedade de manchas provenientes de diferentes tipos de alimentos, sangue e outras secreções corporais^{5,45}. As peptidases atuam melhorando o desempenho na remoção de manchas sem afetar a cor dos tecidos, degradando componentes específicos nas menores partes solúveis em água, o que facilita a remoção da sujeira durante a lavagem. Diferentemente dos clareadores, que apenas encobrem as manchas, as peptidases realmente as degradam. Essa característica é bastante importante porque os resíduos dessas manchas podem atuar como uma espécie de cola e atrair partículas de sujeira presentes na água de lavagem, resultando no envelhecimento do tecido e em roupas sujas. Além disso, as enzimas combinadas com surfactantes são excelentes na remoção de manchas, pois degradam a sujeira, enquanto os surfactantes removem essa sujeira degradada. Outros pontos positivos relacionam-se à diminuição do uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao usuário e ao meio ambiente. Existem, também, vantagens com relação ao consumo de água e de energia⁴⁵. Para a avaliação do desempenho de um detergente são realizados testes com roupas manchadas, e a eficiência do produto é mensurada visualmente ou por quantificação da refletância luminosa do tecido⁴⁶⁻⁴⁹.

O detergente necessita de peptidases capazes de ter atividade em condição de alcalinidade e em uma ampla faixa de temperatura. Um importante parâmetro na escolha das peptidases para detergentes é o valor do seu ponto isoelétrico (*pI*), porque essas enzimas agem melhor quando o valor do pH das soluções de detergentes é semelhante ao *pI* da enzima. Além disso, outros parâmetros devem ser levados em consideração para a seleção de peptidases com possibilidades de aplicação em detergentes, tais como: compatibilidade com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores)⁵⁰⁻⁵², eficiência na remoção das manchas, boa estabilidade para tempo de prateleira e boa atividade na temperatura de lavagem a quente. Contudo, com o aumento do uso de materiais sensíveis a temperaturas elevadas, tais como fibras sintéticas na fabricação de roupas, o setor foi incentivado a buscar novas enzimas que atuassem em temperaturas baixas^{47,53,54}. Nesse sentido, já existe no mercado um produto denominado Kannase[®], comercializado pela empresa Novo Nordisk, que contém uma peptidase eficiente e com capacidade de atividade em uma faixa de temperatura variando entre 10 °C e 20 °C⁵. Como as enzimas utilizadas na formulação de detergentes precisam ser estáveis nas diferentes condições citadas anteriormente, a

demanda tem direcionado o interesse industrial para a engenharia genética e de proteínas, para a obtenção de enzimas modificadas com maior estabilidade^{3,55}. Considerando, porém, a infinita diversidade microbiana, sempre há uma chance de encontrar micro-organismos que produzam novas enzimas com propriedades mais adequadas para essa exploração comercial.

11.6 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

O uso de enzimas como agentes modificadores de propriedades funcionais de proteínas tem sido amplamente difundido na indústria de alimentos. Dentro desse contexto, as peptidases têm um papel de destaque devido às suas aplicações no campo comercial, bem como as inúmeras vantagens que apresentam em relação a outros agentes utilizados com o mesmo propósito, como os catalisadores químicos. As fontes tradicionais de peptidases empregadas na indústria de alimentos são as obtidas de tecidos animais e vegetais, como exemplificado na Tabela 11.7. Entretanto, como as enzimas de origem animal e vegetal não conseguem atingir a grande demanda mundial⁴, esse fato tem promovido um aumento da utilização de peptidases de origem microbiana (Tabela 11.8)^{3,5,40}.

Algumas peptidases obtidas de plantas e animais continuam amplamente em uso devido à sua eficácia bem estabelecida em alguns processos fundamentais na produção de queijos e carnes processadas (Tabela 11.7). Dentre estas, destacam-se: (1) a papaína, bem como a bromelina e a ficina, no amaciamento da carne; e (2) a quimosina, em conjunto com a pepsina, na fase de coagulação do leite para a produção de queijos. A quimosina (extraída do abomaso, que é o quarto estômago dos ruminantes) é substituída em alguns países pela quimosina recombinante, produzida pela fermentação de leveduras e fungos contendo genes clonados para essa peptidase. Contudo, a quimosina natural ainda é a preferida por muitos produtores tradicionais de queijo, apesar das vantagens da oferta e da pureza do produto produzido por fermentação^{4,43,56}. As tripsinas de origem bovina e suína ainda são utilizadas para a produção de hidrolisados proteicos como ingredientes flavorizantes; no entanto, existem alternativas de origem microbiana disponíveis atualmente no mercado, como as serina-peptidases clássicas (Tabela 11.8).

Tabela 11.7 Peptidases provenientes de animais e plantas utilizadas na indústria de alimentos

ENZIMA	FONTE	APLICAÇÃO
Papaína	Látex dos frutos verdes de papaia (<i>Carica papaya</i>)	Amaciamento de carnes; prevenção de turvação na cerveja
Bromelina	Suco do talo do abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	Amaciamento de carne
Ficina	Látex de figueiras tropicais (<i>Ficus carica</i>)	Idem à bromelina e a papaína, mas não amplamente utilizada devido ao custo
Tripsina	Bovina/suína	Produção de hidrolisados de aromas alimentícios (principalmente substituído por peptidases microbianas)
Quimosina	Abomaso de bezerro	Coagulação do leite para produção de queijos
Pepsina	Abomaso de bovino	Usualmente presente com quimosina como parte do coalho

Fonte: Adaptado de Rao et al. (2013)⁴, Ray et al. (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Birschbach et al. (2004)²³ e Kirk et al. (2002)⁴³.

Tabela 11.8 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas na indústria de alimentos

NOME COMERCIAL	FONTE	INDÚSTRIA	PROPRIEDADES
Accelerezyme	Não especificada	DSM	Desenvolvimento de sabor durante preparo de queijo
Acid fungal Protease	<i>Aspergillus</i> sp.	Genencor International	Hidrólise de proteínas
Acid protease A	<i>Aspergillus niger</i>	Amano Pharmaceuticals	Hidrólise de proteínas em pH 3,0
Acid protease DS	<i>Aspergillus niger</i>	Amano Pharmaceuticals	Suplemento dietético
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk Novozymes	Processamento de carne, melhoria da fermentação do álcool combustível
BakeZyme B500BG	<i>Aspergillus</i> sp. ou <i>Bacillus</i> sp.	DSM	Panificação
Biofeed pro	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk	Alimentação
Enzeco neutral bacterial Protease	<i>Bacillus subtilis</i>	Enzyme Development	Alimentos, amaciamento de carne
Enzeco neutral bacterial Protease	<i>Bacillus subtilis</i>	Enzyme Development	Hidrólise de proteínas vegetais (pH 6,0-9,5)

NOME COMERCIAL	FONTE	INDÚSTRIA	PROPRIEDADES
Flavorzyme	<i>Aspergillus oryzae</i>	Novo Nordisk	Hidrolisado proteico (mistura de exo e endopeptidases)
Fromase	<i>Rhizomucor miehei</i>	DSM	Coagulante fúngico para preparo de queijo
Fungal protease	<i>Aspergillus</i> sp.	Genencor International	Hidrólise de proteínas de laticínios
HT proteolytic	<i>Bacillus</i> sp.	Genencor International	Hidrólise de proteínas em elevadas temperaturas
Kojizyme	Não especificada	Novo Nordisk	Hidrolisado proteico
Multifect neutral	<i>Bacillus</i> sp.	Genencor International	Hidrólise de proteínas em pH neutro
Neutrase	<i>Bacillus subtilis</i>	Novo Nordisk	Panificação e cervejaria
Newlase F	<i>Rhizopus niveus</i>	Amano Pharmaceuticals	Hidrólise de proteínas em pH 3,0
Protamex	Complexo de peptidases de <i>Bacillus</i>	Novo Nordisk	Produção de hidrolisados proteicos, desenvolvimento de sabor e processamento de carne.
Protease A-DS	<i>Aspergillus oryzae</i>	Amano Pharmaceuticals	Suplemento dietético
Protex	<i>Bacillus</i> sp.	Genencor International	Hidrólise de proteínas em pH alcalino
Suparen/ Surecurd	<i>Cryphonectria parasitica</i>	DSM	Coagulante fúngico para preparo de queijo

Fonte: Adaptado de Rao et al. (2013)⁴, Ray et al. (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸, Birschbach et al. (2004)²³ e Kirk et al. (2002)⁴³.

11.6.1 Produção de queijos

As enzimas que atuam na coagulação do leite podem ser agrupadas em três categorias: (i) coalhos de origem animal, (ii) coagulantes de origem microbiana e (iii) quimosina obtida por engenharia genética. Tanto as peptidases de origem animal quanto as microbianas que agem na coagulação do leite são peptidases ácidas⁴. Na produção de queijos obtidos por coagulação enzimática, a principal função das peptidases é a desestabilização da estrutura das moléculas de caseína, que são fosfoproteínas insolúveis em pH 4,6, e que existem no leite na forma de estruturas coloidais, as micelas, cuja principal função é fluidificar as moléculas de caseína e solubilizar os íons

cálcio e fosfato⁵⁶. A hidrólise específica da ligação peptídica da caseína entre os resíduos de fenilalanina 105 e metionina 106 resulta na para- κ -caseína insolúvel (resíduos de aminoácidos de 1 a 105), que permanece associada à micela de caseína, e um peptídeo solúvel (denominado de glicomacropeptídeo, que corresponde aos resíduos de aminoácidos 106 a 169). Devido à alta especificidade por caseína, a quimosina é preferida neste processo. Contudo, peptidases produzidas por micro-organismos como *Mucor michei*, *Bacillus subtilis* e *Cryphonectria parasitica* estão sendo incorporadas nesse tipo de produção⁴ (Tabela 11.8).

11.6.2 Produtos da soja e hidrolisados proteicos

Peptidases alcalinas e neutras de origem fúngica são capazes de atuar no processamento das proteínas da soja, promovendo modificações estruturais, que aumentam suas propriedades funcionais. Tais alterações resultam em maior solubilidade dos hidrolisados, culminando com maior rendimento proteico e baixo amargor (Tabela 11.8). Os hidrolisados são empregados em bebidas enriquecidas com proteínas e na formulação de alimentos dietéticos^{4,24}.

Os hidrolisados proteicos são utilizados, ainda, em formulações para lactantes, em suplementos dietéticos clínicos e em agentes aromatizantes. Todavia, uma das principais barreiras para o uso de hidrolisados proteicos em produtos dietéticos é o sabor amargo que possuem, sendo que a intensidade desse sabor é proporcional ao número de aminoácidos hidrofóbicos e resíduos de prolina no centro do peptídeo. Peptidases capazes de hidrolisar ligações peptídicas envolvendo aminoácidos hidrofóbicos e resíduos de prolina, como a carboxipeptidase A, são capazes de diminuir o sabor amargo desses hidrolisados^{4,24}.

11.7 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE QUÍMICA FINA

Peptidases de animais e plantas, incluindo papaína, quimiotripsina, termolisina e subtilisina, vêm sendo utilizadas como catalisadores na síntese de peptídeos⁵⁷. Dessa forma, em condições apropriadas, peptidases catalisam não somente a hidrólise de peptídeos, mas também a formação de ligações peptídicas, gerando oligopeptídeos. Vários peptídeos biologicamente ativos foram sintetizados usando peptidases como catalisadores, através de reações

de condensação⁵⁸. Na síntese enzimática de peptídeos, geralmente são obtidos polímeros de baixa massa molecular como di ou tripeptídeos. Tais biomoléculas têm aplicação reconhecida na indústria farmacêutica e agroquímica, bem como na nutrição animal e humana. Alguns exemplos incluem: (1) a produção do adoçante aspartame, um dipeptídeo composto por L-ácido aspártico e metil-éster da L-fenilalanina, que é enzimaticamente produzido através de catálise reversa, utilizando-se preparações de termolisina (uma metalo-peptidase) derivada de *Bacillus thermoprotolyticus*; e (2) a síntese de fármacos como quiotorfina, encefalina, dinorfina e angiotensina⁵⁹. Outro exemplo da aplicação de peptidases na química fina é a produção enzimática de insulina humana semissintética a partir de insulina suína⁶⁰.

A síntese enzimática de peptídeos apresenta vantagens em relação à síntese química, como: a elevada estereo e regioespecificidade, a ausência de racemização e de outras reações secundárias típicas da síntese química, a proteção parcial das cadeias laterais dos substratos e o uso de condições mais brandas e seguras de reação⁶¹. Contudo, o fato de não existir uma enzima universal para essa finalidade faz com que a metodologia não seja geral ou aplicável a qualquer sequência peptídica. Portanto, o uso de peptidases na síntese de peptídeos tem limitações. As reações de catálise ocorrem geralmente em meios não aquosos, o que pode levar à desnaturação e desativação da enzima. Neste contexto, vários métodos vêm sendo descritos para estabilização enzimática, tais como: imobilização química, engenharia de proteína e evolução direcionada. A descoberta de peptidases estáveis em solventes orgânicos também surge como um fato promissor para a biocatálise na indústria de química fina^{62,63}.

11.8 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA E COSMÉTICA

Pode-se afirmar que, atualmente, a indústria farmacêutica representa um dos maiores produtores e usuários de enzimas. O mercado de enzimas é considerado hoje o mais promissor para as indústrias farmacêuticas e uma única enzima com aplicação terapêutica pode, por exemplo, custar 5 mil dólares por grama⁶⁴. Nesse contexto, a aplicação de peptidases na indústria farmacêutica e de cosméticos vem crescendo a cada ano, devido à pesquisa de novas aplicações e da descoberta de novas fontes produtoras dessas enzimas. O uso de peptidases em medicamentos e cosméticos se justifica pela sua alta especificidade e eficiência catalítica, além de envolver a diminuição do uso de compostos químicos, muitas vezes tóxicos. Assim sendo, a relevância

do uso de enzimas como medicamento relaciona-se com o fato de que pequenas quantidades do catalisador biológico podem produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas⁶⁵. No entanto, ainda existem dificuldades na aplicação de enzimas em geral na indústria farmacêutica e de cosméticos, em função da dificuldade em conciliar a segurança da formulação, evitando reações irritantes ou sensibilizantes e a possível imunogenicidade das enzimas, com a funcionalidade e a estabilidade das enzimas na presença dos diferentes componentes da formulação e no seu armazenamento⁶⁶. Além desses fatores, as peptidases precisam ter alta atividade e estabilidade em pH fisiológico, sem danos causados pelos componentes dos diversos fluidos corporais⁶⁷. De acordo com a finalidade, as formulações que contêm enzimas podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral, sendo que para as enzimas utilizadas em aplicações digestivas e tópicas não são fundamentais critérios como pureza e fonte da enzima. No entanto, o uso parenteral de enzimas requer alto grau de pureza, o que pode aumentar o custo de produção^{65,66}.

Apesar da longa lista de micro-organismos produtores, envolvendo bactérias e fungos, apenas uma minoria pode ser empregada como fonte de peptidases para a indústria farmacêutica e de cosméticos, devido à necessidade de não serem espécies patogênicas ao homem, o que é reconhecido pela sigla GRAS (do inglês, *generally recognized as safe*), que pode ser traduzido como “geralmente considerado como seguro” e implica na complexa ausência de toxinas microbianas².

Peptidases apresentam diversas aplicações na indústria farmacêutica e de cosméticos, sendo utilizadas na produção de medicamentos e no desenvolvimento de novos produtos. Na indústria de cosméticos, a denominada “enzimocosmética” tem como principal alvo a pele, seja para sua limpeza profunda (esfoliação e tratamento de acne e caspa), cicatrização ou tratamento depilatório. Na indústria de cosméticos, buscam-se peptidases de baixa massa molecular e alta lipofilicidade para sua maior penetração na pele, características que normalmente não são encontradas em enzimas em geral⁶⁸. Atualmente, a diversidade de aplicação de peptidases na indústria farmacêutica vai desde auxiliar a digestão até o debridamento e a cicatrização de feridas (Tabela 11.9).

Tabela 11.9 Peptidases utilizadas na indústria farmacêutica

ENZIMA	FONTE	USO
Bromelaína	Caule de <i>Ananas comosus</i>	Empregada em processos inflamatórios (de origem traumática, cirúrgico-infecciosa, vascular e reumática), digestão e tratamento auxiliar de queimaduras de grau elevado
Colagenase	<i>Clostridium histolyticum</i>	Úlceras de pele
Estreptoquinase	<i>Streptococcus</i> β -hemolítico	Coágulo sanguíneo (agente fibrinolítico)
Papaína	Látex de <i>Carica papaya</i>	Digestão (principalmente pacientes com dispepsia crônica e gastrite), vermífugo (nematicida)
Pepsina	Estômago suíno	Auxiliar de digestão
Quimiotripsina	Pâncreas bovino	Auxiliar de digestão
Serrapeptase	<i>Serratia</i> E15	Inflamação
Tripsina	Pâncreas bovino	Auxiliar de digestão, debridamento de úlceras

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Jisha et al. (2013)⁸ e Craik et al. (2011)¹⁴.

11.8.1 Peptidases como auxiliares digestivos: função anti-inflamatória e tratamento de cáries

O uso de peptidases como auxiliares na digestão de proteínas é o mais tradicional e emprega diversas peptidases, como a pepsina de estômago suíno, a quimiotripsina e a tripsina obtidas de pâncreas bovino, a bromelaína obtida do caule da planta do abacaxi e a papaína do látex do mamoeiro. A papaína também é auxiliar digestivo em pacientes com dispepsia crônica e gastrite e tem atividade nematicida⁶⁷.

Algumas das peptidases usadas como auxiliares digestivos apresentam outras aplicações terapêuticas. A bromelaína também pode ser utilizada na medicina popular como agente cicatrizante. Além disso, atua no bloqueio tópico de alguns metabólitos pró-inflamatórios que aceleram e agravam o processo inflamatório, como cininogênio e bradicinina. É, por isso, um agente anti-inflamatório, podendo ser utilizado no caso de lesões desportivas, traumas, artrites e outros tipos de inflamações, como sinusites⁶⁹. Também foi demonstrado que a bromelaína, quando administrada por via oral, reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, o que

explicaria sua atuação na colite ulcerativa, na síndrome do cólon irritável e na doença de Crohn⁶⁹, que é uma doença crônica inflamatória intestinal (que se apresenta sob três formas principais: inflamatória, fistulosa e fibroestenose) capaz de atingir geralmente o íleo e o cólon (mas pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal). Uma peptidase produzida pela cepa de *Serratia* denominada E-15, normalmente encontrada no intestino do bicho-da-seda, também apresenta ação anti-inflamatória e fibrinolítica. Conhecida comercialmente como Peptizyme[®]SP ou Danzen[®], a denominada serratiopeptidase é administrada por via oral e rapidamente absorvida pelo epitélio intestinal, porém a falta de evidências científicas quanto à sua eficácia, segurança e tolerabilidade não preconizam o seu uso⁷⁰.

A papaína também pode atuar como agente anti-inflamatório e pode ser usada no tratamento de cáries. As lesões de cárie na dentina surgem como consequência da ação de bactérias acidogênicas. Esta camada da dentina mostra-se amolecida e sem possibilidade de reorganização devido à desnaturação irreversível das fibras de colágeno. A papaína interage com o colágeno parcialmente degradado do tecido necrosado da lesão da cárie, provocando um amolecimento adicional deste tecido e facilitando sua retirada mecânica. Essa ação enzimática se dá apenas no tecido necrosado, pois tecidos saudáveis contêm um inibidor de peptidase que impede a ação dessa classe de enzimas. Assim, a dentina não necrosada, com possibilidade de regeneração, é preservada. O produto, denominado PapaCarie[®], associa a enzima com a cloramina, um agente antisséptico⁷¹. A papaína também pode ser incorporada a pastas dentífricas, auxiliando a remoção de resíduos alimentares e da placa bacteriana pouco aderida⁶⁸.

11.8.2 Peptidases usadas como agentes fibrinolíticos e na coagulação

Algumas peptidases também são usadas como agentes fibrinolíticos, tendo como alvo principal o processo de coagulação sanguínea que leva à formação de trombos. Embora a formação de coágulos e sua degradação sejam mantidas em equilíbrio em sistemas biológicos, o bloqueio da sua lise leva aos processos de trombose. A uroquinase, enzima normalmente purificada da urina humana (ou ativador de plasminogênio tipo uroquinase), tem como principal substrato o plasminogênio, que é a forma inativa da plasmina, uma serina-peptidase. A ativação da plasmina desencadeia uma cascata proteolítica que, dependendo do ambiente fisiológico, participa do processo

de trombólise ou degradação da fibrina (presente no coágulo). Devido ao seu papel ativador da plasmina, a uroquinase (Abbokinase®) é usada como um agente trombolítico/fibrinolítico para o tratamento de doenças vasculares, como trombose venosa, embolismo pulmonar, infarto do miocárdio e isquemias ou derrames cerebrais⁷². Sua administração intravenosa deve ser realizada de forma imediata, para que se atinja a eficácia terapêutica. Outra enzima usada com a mesma atividade é o ativador tecidual de plasminogênio, uma serina-peptidase encontrada em células endoteliais que apresenta a mesma atividade da uroquinase, porém com maior afinidade pela trombina. Atualmente, é mais utilizada uma de suas formas recombinantes, Alteplase® ou Reteplase®, expressa em *Escherichia coli*, sendo que a Reteplase® apresenta maior meia-vida⁷³.

Micro-organismos também podem ser fontes de enzimas com atividade fibrinolítica. A administração oral de uma enzima fibrinolítica, nattokinase, produzida por uma cepa de *Bacillus* em uma tradicional comida fermentada japonesa, Natto®, elevou a atividade fibrinolítica no plasma e a produção do ativador tecidual de plasminogênio, o que sugere sua possível utilização na profilaxia de trombozes⁷⁴. A estreptoquinase, obtida do sobrenadante de cultivo de bactérias do gênero *Streptococcus* (beta-hemolítico), é outra enzima utilizada na ativação do plasminogênio humano, de modo que se trata de um medicamento fibrinolítico de menor custo em comparação aos anteriores, sendo comercializado com o nome Streptase®. No entanto, uma das principais limitações dessa terapia é a resposta antigênica, que pode chegar a reações anafiláticas graves⁷². A estreptoquinase também é útil na prevenção de aderências pós-operatórias, uma complicação cirúrgica muito comum, principalmente em intervenções abdominais, e que leva a obstruções abdominais. A liberação contínua de estreptoquinase na cavidade peritoneal, quando imobilizada em uma membrana, é capaz de reduzir de forma significativa os casos de aderência⁷⁵.

Neste mesmo tópico, também é importante realçar que o Fator VIIa da coagulação sanguínea, uma serina-peptidase que inicia o processo de formação de coágulos, tem sido usado na terapia de reposição enzimática, especificamente em pacientes hemofílicos. Uma forma recombinante do Fator VIIa, NovoSeven®, tem sido aplicada em pacientes com deficiência congênita dessa proteína ou em casos de sangramentos descontrolados⁷⁶. Dessa forma, o tratamento de deficiências enzimáticas torna-se um campo de aplicação dos mais relevantes para as enzimas terapêuticas⁶⁷.

11.8.3 Aplicações das queratinases

Além das peptidases já mencionadas que são utilizadas na indústria farmacêutica e de cosméticos, as collagenases, elastases e queratinases apresentam grande aplicação, por atuarem em componentes de matriz extracelular e do extrato córneo, e cuja hidrólise pode facilitar tratamentos dermatológicos e cosméticos³⁰.

As queratinases formam uma classe particular de peptidases pela sua capacidade em hidrolisar a queratina, uma proteína estrutural insolúvel de difícil degradação. A forte compactação da queratina se deve à estabilização por várias ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, além das diversas pontes dissulfeto que conferem estabilidade mecânica e resistência à degradação pela maioria das peptidases, como papaína, tripsina e pepsina⁷⁷. A queratina está presente em diversos materiais, como couro, cabelo, unhas, lâ, penas e extrato córneo da pele, e, apesar da queratina do cabelo e da unha ter a mesma estrutura da encontrada na epiderme, existem diferenças na quantidade de pontes dissulfeto, o que faz a primeira ser bem mais resistente à hidrólise³⁰. Embora apresentem elevada resistência à degradação, queratinas podem ser hidrolisadas por queratinases de origem microbiana, apresentando importante papel biotecnológico³⁰ e crescente impacto nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos⁷⁸.

As queratinases podem ser úteis em formulações tópicas para a eliminação da queratina na acne e psoríase e remoção de calos⁷⁹. A acne é uma inflamação das glândulas sebáceas da pele, responsáveis pela produção do sebo, formado por diversos tipos de gordura. O sebo é normalmente liberado pelos folículos pilossebáceos, compostos por um pelo e uma glândula sebácea, presentes na camada intermediária da derme. Quando um espessamento da pele provoca a obstrução do folículo, o sebo fica retido e forma um cravo ou comedão, que é seguido pela proliferação de bactérias anaeróbias, dando origem à acne ou espinhas. Para o tratamento da acne, é preciso promover a abertura dos poros, regularizando o funcionamento das glândulas sebáceas pela remoção de substâncias do próprio sebo, restos proteicos e a queratina da pele – neste ponto, entram em ação queratinases e peptidases em geral, além das lipases. As queratinases atuam promovendo a abertura dos poros, removendo a queratina que normalmente bloqueia a saída do conduto da glândula sebácea, o que contribui para o controle da acne. Além disso, as queratinases também podem ser incluídas em sabonetes faciais para o tratamento da acne, pois células mortas podem fechar os poros e criar um ambiente favorável ao desenvolvimento da acne. Essas enzimas também

podem atuar na remoção de manchas e na regeneração do epitélio, acelerando o processo de cicatrização⁷⁷. Para a cicatrização, é frequente a ação de peptidases em tecidos com lesões, em que podem ser encontradas secreções e diferentes micro-organismos, e que por isso apresentam dificuldades na cicatrização. A presença de diferentes peptidases, como papaína, bromelaína, queratinases e colagenases, facilita a hidrólise proteica, o que acelera o processo de cicatrização⁶⁸.

Vários produtos para *peeling* enzimático, visando à renovação celular, têm, em sua composição, Arazyme[®], uma peptidase termorresistente de amplo espectro (capaz de degradar albumina, queratina, colágeno e elastina) produzida pela bactéria *Serratia proteamaculans*, que vive mutuamente dentro do trato digestório da aranha *Nephila clavata*, de origem coreana. Esse produto promove a esfoliação gradual e progressiva do extrato córneo da pele, removendo a queratina de peles secas e suavizando as imperfeições da superfície da pele⁸⁰. Outras enzimas usadas em *peeling* enzimático são tripsina, papaína e bromelaína, que diminuem o espessamento da pele.

O processo de esfoliação envolve a renovação celular da pele e, para tal, normalmente é utilizada uma combinação de peptidases e lipases, que em conjunto facilitam o processo natural de descamação da epiderme. Na pele classificada como normal, queratinócitos produzidos na camada basal da epiderme são eliminados pelo extrato córneo, camada mais externa, através de descamação; no entanto, qualquer alteração nesse equilíbrio, seja pela maior produção de queratinócitos ou por falhas na descamação, pode levar a uma maior coesão dessas células na superfície. Um dos principais componentes responsável por essa coesão é o desmossoma, no qual várias proteínas transmembranares de células adjacentes interagem entre si, aumentando a coesão⁸¹. Para manter a integridade tecidual durante a descamação normal da pele, as proteínas do desmossoma são progressivamente degradadas por peptidases do tipo tripsina e quimotripsina^{82,83}. Na pele seca, há uma diminuição da atividade dessas peptidases em relação à pele normal, com o respectivo aumento no nível de proteínas de desmossomas, ocasionando uma maior coesão celular seguida de liberação das células na forma de agregados⁸⁴. Dessa forma, a suplementação com peptidases aplicadas de forma tópica representa um potencial tratamento para aliviar o aspecto da pele seca⁸⁵. É também possível o uso de queratinases, devido ao grande acúmulo de queratina nas células da epiderme, mas diferentes peptidases podem ser utilizadas. O mesmo ocorre no tratamento da caspa, ou dermatite seborreica, em que ocorre a descamação excessiva do couro cabeludo devido ao crescimento do fungo *Malassezia furfur*. Esse fungo é um componente

comum do couro cabeludo, porém pode ter seu crescimento aumentado pela presença de sebo secretado pelos folículos pilosos no couro cabeludo. Esse crescimento causa uma irritação que acelera a descamação, misturando-se ao sebo e formando placas de células do extrato córneo visíveis a olho nu. Seu tratamento envolve também o uso de peptidases e lipases⁸⁶. Xampus anticaspa também incluem queratinases, pois a atividade queratinolítica permite a remoção de células mortas no couro cabeludo em descamação, em associação com antifúngicos.

A queratina é o principal componente do calo, espessamento da pele devido ao excesso dessa proteína e também denominado hiperqueratose. A degradação da queratina nessa condição por *Kytococcus sedentarius* já foi observada, o que possibilita o seu uso. Essa bactéria é produtora de duas peptidases com atividade queratinolítica, e já foi observado que essas enzimas são responsáveis pela doença conhecida como queratólise erosiva, caracterizada pela descamação da camada córnea da epiderme, principalmente na palma das mãos e planta dos pés, pela hidrólise da queratina⁸⁷.

Queratinases também têm participação como enzimas depilatórias, solubilizando a queratina do pêlo, e para alisamento capilar; neste último caso alterando a disposição das pontes dissulfeto na queratina do cabelo. Nesse sentido, as queratinases também têm atraído o interesse das indústrias farmacêuticas e de cosméticos porque muitas dessas enzimas não são capazes de hidrolisar gelatina e colágeno, e então sua ação depilatória não afeta a pele, embora sua atividade seja mais lenta do que a dos depiladores convencionais⁸⁸.

O uso de queratinases para a administração de medicamentos também está sendo investigado. A eficácia da terapia tópica para doenças de unhas é normalmente limitada pela baixa permeabilidade das drogas a esse epitélio. Nesse sentido, o uso de queratinases aumenta a penetração de drogas pelo epitélio ao reduzir a integridade da unha por meio da hidrólise da queratina⁸⁹. Esses resultados sugerem que as enzimas queratinolíticas aumentam a permeabilidade da unha a drogas aplicadas de forma tópica, o que é muito necessário no caso do tratamento da psoríase. Nessa doença, há uma grande reciclagem e descamação das células da epiderme.

Algumas queratinases de amplo espectro já demonstraram atividade hidrolítica contra proteínas do príon, responsáveis por várias doenças neurodegenerativas transmissíveis pelo contato com tecido infectado, fluidos corporais ou instrumentos médicos contaminados e que normalmente são resistentes à hidrólise pela maioria das peptidases e aos processos tradicionais de esterilização^{90,91}. Dessa forma, as enzimas queratinolíticas

apresentam enorme potencial de aplicação na indústria farmacêutica, como, por exemplo, na descontaminação de instrumentos médicos e equipamentos laboratoriais.

11.8.4 Aplicações das collagenases e elastases

As collagenases e as elastases, outras duas enzimas importantes para as indústrias farmacêuticas e de cosméticos, atuam respectivamente sobre as fibras de colágeno e elastina, que em combinação determinam as propriedades mecânicas do tecido conjuntivo de animais. Como a queratina, a elastina e o colágeno são proteínas insolúveis e recalcitrantes à hidrólise pela maioria das peptidases, porém suas estruturas são bem diferentes. Além da ausência de inúmeras pontes dissulfeto, o colágeno é uma proteína fibrosa, enquanto a elastina não apresenta essa característica, e ambas as estruturas quaternárias são estabilizadas por ligações peptídicas entre unidades de lisina, o que dá a resistência à hidrólise. As collagenases e elastases são enzimas que atuam na remoção de cicatrizes e queloides, debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas, e muitas vezes são associadas com bromelina e papaína⁶⁸. A cicatrização de uma ferida envolve uma sucessão de etapas, que incluem migração de queratinócitos, angiogênese, deposição de fibroblastos e remodelamento de tecido de granulação, todas necessitando da degradação controlada da matriz extracelular. Qualquer alteração no balanço entre a produção de matriz extracelular e sua degradação leva à formação de úlceras crônicas, situação em que há excessiva degradação da matriz extracelular, ou leva à formação de fibrose, com cicatrizes hipertróficas ou queloides, caracterizados pelo acúmulo de componentes da matriz extracelular⁹². Preparações de elastases purificadas da bactéria *Bacillus subtilis* foram imobilizadas em bandagens, denominadas Elastoterase[®], para aplicações terapêuticas em queimaduras, edemas, furúnculos e abscessos^{2,93}. Uma collagenase purificada do crescimento da bactéria *Clostridium histolyticum* é utilizada em pomadas (Santyl[®]) para o tratamento de feridas, como úlceras crônicas e queimaduras, facilitando a cicatrização. Sua atuação visa promover o debridamento ou remoção do tecido em necrose, sem danificar o tecido sadio ao redor⁹⁴. Essa bactéria é a principal produtora de collagenases com aplicações terapêuticas, embora outros micro-organismos também sejam capazes de produzir essa classe de peptidases⁶⁵. Outras preparações enzimáticas comerciais de uso tópico contendo peptidases são empregadas na cicatrização de feridas, dentre as quais a Fibrase[®], contendo plasmina (fibrinolisinase) de origem

bovina que é capaz de hidrolisar a fibrina presente no tecido necrosado, sem afetar o tecido sadio ao redor⁶⁴.

Ao atuar sobre as fibras de colágeno, as collagenases também geram peptídeos com diversas atividades biológicas²; neste aspecto, foi comprovado que o colágeno é um dos antígenos envolvidos com o desenvolvimento da artrite reumatoide humana, e a ação de collagenases libera um peptídeo imunodominante cuja administração oral em modelo murino sugere o seu potencial uso imunoterapêutico no tratamento dessa patologia⁹⁵. As collagenases com atividade em pH alcalino estão sendo cada vez mais estudadas para aplicações terapêuticas nas quais se deseja a formulação de preparações de liberação lenta².

O produto conhecido como Xiaflex[®] é uma injeção composta pela collagenase purificada de *Clostridium histolyticum* usada no tratamento de adultos com contratura de Dupuytren, uma doença que provoca o progressivo espessamento e o encurtamento da matriz extracelular ao redor das fibras musculares da palma da mão, com conseqüente contração e encurvamento dos dedos. A enzima, ao ser injetada, provoca a hidrólise do colágeno e, assim, o relaxamento das fibras musculares, evitando o processo cirúrgico⁹⁶. As collagenases também são investigadas como uma opção de tratamento não cirúrgico para a doença de Peyronie, através de injeções que promoveriam a hidrólise do excesso de colágeno, diminuindo o tamanho das placas que provocam a doença⁹⁷. A doença de Peyronie é um distúrbio do tecido conjuntivo que envolve o crescimento de placas fibrosas no tecido do pênis, afetando cerca de 1% a 4% dos homens. O processo de fibrose ocorre na túnica albugínea, uma camada fibrosa que circunda os corpos cavernosos do pênis. A doença causa o aparecimento de uma curvatura no pênis em ereção.

11.8.5 Peptidases no tratamento da doença celíaca

Outras peptidases, além de collagenases, elastases e queratinases, podem apresentar aplicação na indústria farmacêutica. Peptidases capazes de hidrolisar ligações peptídicas adjacentes a unidades de prolina, como as prolil-endopeptidases, têm importância na terapia da diarreia celíaca⁹⁸. A doença celíaca é uma doença causada pela ingestão de proteínas do glúten (trigo, centeio e cevada) e tem diferentes sintomas, como diarreia crônica e distensão abdominal, cuja única opção de tratamento é a exclusão das proteínas do glúten da alimentação. O principal componente tóxico do glúten do trigo é a proteína gliadina, com regiões ricas em prolina e glicina⁹⁹, que

é relativamente resistente à hidrólise por peptidases presentes no trato gastrointestinal e leva a uma resposta inflamatória em indivíduos suscetíveis. As prolil-endopeptidases tornam-se, assim, um agente profilático oral para a doença celíaca.

11.8.6 Aplicações da toxina botulínica

A toxina botulínica do tipo A é uma proteína obtida do crescimento da bactéria anaeróbia *Clostridium botulinum*, responsável pela doença conhecida como botulismo. Nessa patologia, a toxina bloqueia a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular e, como resultado, o músculo perde a capacidade de contração. Para fins médicos, é utilizada uma forma injetável da toxina botulínica purificada; aplicada diretamente nos músculos comprometidos, é um tratamento farmacológico local para a hiperatividade muscular, provocando um relaxamento e bloqueando a atividade motora involuntária. Dessa forma, a toxina botulínica interfere seletivamente na capacidade de contração da musculatura. A dosagem aplicada para fins terapêuticos e estéticos é muito pequena e incapaz de desencadear as reações do envenenamento alimentar do botulismo. Quando sintetizada pela bactéria, a neurotoxina apresenta-se com uma cadeia polipeptídica simples de aproximadamente 150 kDa, cuja ativação ocorre com a clivagem em dois fragmentos polipeptídicos unidos por uma ponte dissulfeto. Essa divisão gera uma cadeia leve, uma metalo-peptidase dependente de zinco, e uma cadeia pesada, esta contendo domínios funcionais, um de ligação a receptores e outro de translocação membranar. A toxina botulínica bloqueia a liberação de acetilcolina nas junções neuromusculares por um mecanismo que envolve três etapas. A etapa inicial é a ligação da toxina a receptores específicos localizados na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular. A segunda etapa envolve a internalização da toxina por endocitose mediada pelo receptor. Contudo, é no citoplasma do neurônio-alvo que ocorre a terceira etapa, a inibição da liberação de acetilcolina, através da atividade peptidásica da cadeia leve, que inativa alguns peptídeos necessários para a liberação das vesículas de acetilcolina¹⁰⁰.

Dentre as indicações da toxina botulínica tipo A estão estrabismo, blefaroespasmos (contração involuntária dos músculos do olho), espasmo hemifacial, distonias e espasticidade. A distonia é a contração muscular involuntária em diferentes partes do corpo, e a espasticidade é a contração permanente que leva ao encurtamento de tendões e músculos, também causando dores

e posturas anormais. A toxina botulínica pode ser também utilizada para o tratamento de crianças com problemas musculares. Nesses casos, a toxina permite maior flexibilidade muscular e redução do uso de medicação antiespástica. A toxina botulínica tipo A também é usada no tratamento de incontinência urinária, aplicada diretamente na parede da bexiga, fazendo com que haja um relaxamento temporário da musculatura, um controle da vontade de urinar, e, acima de tudo, uma melhora na qualidade de vida do paciente. Além das indicações terapêuticas, o medicamento é amplamente conhecido no tratamento de linhas faciais hiperdinâmicas e para o tratamento da hiper-hidrose palmar e axilar. A toxina botulínica interfere seletivamente na capacidade de contração da musculatura e, por isso, as linhas de expressão são suavizadas. A marca americana Botox[®] foi a primeira a ser liberada para uso estético, mas atualmente outras marcas estão disponíveis, como Dysport[®] e Prosigne^{®101}.

11.8.7 Peptidases como ativadoras de pró-fármacos

As peptidases também podem ser utilizadas na indústria farmacêutica como ativadores de pró-fármacos. Nessa tecnologia, procura-se evitar um dos principais obstáculos ao emprego de quimioterápicos em uma neoplasia: a limitação de dose devido à toxicidade do quimioterápico, em função da sua baixa seletividade para células neoplásicas em comparação com as células normais, não neoplásicas. A estratégia denominada ADEPT, sigla em inglês que significa *antibody-directed enzyme prodrug therapy*, implica a administração de um pró-fármaco, molécula antineoplásica em sua forma quimicamente inativa, e sua posterior conversão na forma ativa *in vivo*, exclusivamente nas proximidades do local de ação. A ativação envolve a administração prévia de uma enzima capaz de promover a ativação da droga, e normalmente essa enzima é direcionada para as células tumorais através da associação com um anticorpo específico para os componentes superficiais das células neoplásicas. Dessa forma, a enzima se acumula no local do tumor e só então promove a ativação do fármaco, de modo a minimizar a ação do antineoplásico sobre as células não neoplásicas⁶⁸. Para que estas estratégias terapêuticas sejam bem-sucedidas, a enzima, ou uma homóloga dela, não deve estar presente em tecidos humanos ou, se estiver, deve ser expressa somente em baixas concentrações nos demais tecidos. Essa é uma das razões pelas quais têm sido utilizadas enzimas de origem microbiana.

Entre as enzimas que são empregadas nessa tecnologia, encontra-se a carboxipeptidase G2 (CPG2), uma metalo-peptidase obtida do meio de cultura de *Pseudomonas putida*. A função normal dessa enzima é catalisar a conversão de folato reduzido e não reduzido em ácido pteróico e ácido glutâmico. Fármacos podem ser transformados em pró-fármacos através de uma ligação amida com o substrato da enzima, o ácido glutâmico; na presença de CPG2, a ligação amida é clivada, liberando os fármacos ativos e o ácido glutâmico. Os resultados obtidos em casos de tumor de cólon sugerem que o sistema ADEPT, baseado em CPG2, é uma promissora terapia antineoplásica. No entanto, se uma enzima não humana é utilizada, podem ocorrer reações de hipersensibilidade induzidas por intensa resposta imune e consequente falha na terapia. Para minimizar a imunogenicidade induzida pelo sistema ADEPT, duas estratégias podem ser utilizadas. A primeira consiste na utilização de formas mutantes de enzimas humanas, as quais podem proporcionar menor toxicidade sistêmica que enzimas endógenas e menor imunogenicidade que as não humanas. Uma forma de enzima humana mutante de carboxipeptidase A1 (CPA1), conjugada a um anticorpo com afinidade para células tumorais, foi capaz de ativar um pró-fármaco de metotrexato, que não foi um bom substrato para a enzima endógena CPA126. A outra estratégia consiste no uso de tecnologia DNA recombinante, combinando regiões variáveis da cadeia leve e pesada de anticorpos não humanos, responsáveis pelo reconhecimento do antígeno-alvo, com regiões constantes de anticorpos humanos¹⁰².

11.8.8 Estratégias para o uso crescente de peptidases

Sendo uma área tão promissora, o uso de peptidases pela indústria farmacêutica e de cosmético preconiza a produção de novos fármacos mais específicos e mais individualizados, principalmente na terapia de reposição enzimática e vacinas, além de grandes avanços na área de terapia cosmética antienvhecimento. As dificuldades no uso de peptidases podem ser contornadas por diferentes estratégias de formulação, como a conjugação com polímeros para diminuir a imunogenicidade de enzimas, além da incorporação de enzimas a lipossomos visando diminuir a toxicidade, direcionando o acesso ao órgão-alvo⁶⁷. No entanto, o potencial benefício não é compensatório se o custo de obtenção dessas enzimas for superior aos processos químicos convencionais e se for necessário um maior controle de produção e de purificação final. O crescente conhecimento das doenças e dos processos bioquímicos envolvidos irá possibilitar a produção heteróloga de enzimas

em diferentes modelos celulares, o que permitirá a obtenção de maiores rendimentos com custos mais convenientes⁶⁷.

11.9 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA TÊXTIL

As principais enzimas utilizadas na indústria têxtil são as hidrolases e as oxidoredutases. No grupo das hidrolases, podemos destacar não só as peptidases, como também as amilases, as pectinases, as celulases e as lipases⁴³. A aplicação de peptidases na indústria têxtil ainda é limitada devido à instabilidade térmica e química dessas enzimas, além do alto custo quando comparado aos métodos convencionais^{103,104}.

Ao contrário do tratamento com reagentes químicos, as peptidases podem ser utilizadas para alterar as propriedades das fibras têxteis e remover impurezas de forma menos drástica, reduzindo consideravelmente danos eventuais às fibras do tecido^{9,105}. De forma geral, as peptidases na indústria têxtil apresentam como principais aplicações: (1) a biopurga ou biopreparação, que é a remoção de impurezas proteicas; (2) a resistência ao encolhimento; (3) a desengomagem; e (4) o melhoramento da qualidade do tecido em relação ao seu tingimento e brilho (Tabela 11.10). A maioria dos estudos tem como foco a aplicação de peptidases no acabamento têxtil, como, por exemplo, no processamento de lã e couro e na desengomagem de fibras de seda, melhorando sua textura e aumentando sua qualidade¹⁰⁵.

Tabela 11.10 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas na indústria têxtil

NOME COMERCIAL	FONTE	INDÚSTRIA	PROPRIEDADES
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk Novozymes	Desengomagem do fio da seda
Esperase	<i>Bacillus lentus</i>	Novo Nordisk Novozymes	Desengomagem do fio da seda
NovoBate WB	<i>Bacillus</i> sp.	Novo Nordisk	Tratamento de couro
NUE	<i>Bacillus</i> sp.	Novo Nordisk	Calagem do couro (ativa em pH 12 a 13)
Primatan	Não especificada	Genencor International	Purga do couro
Protin	<i>Bacillus</i> sp.	Amano Pharmaceuticals	Purga do couro, depilação
Purafect	<i>Bacillus lentus</i>	Genencor International	Tratamento do couro (imersão alcalina)
Thermoase	<i>Bacillus</i> sp.	Amano Pharmaceuticals	Purga do couro, depilação

Fonte: Adaptado de Ray (2012)⁶, Gupta et al. (2002)⁷ e Kirk et al. (2002)⁴³.

Serina-peptidases pertencentes à família das subtilisinas, geralmente secretadas por diferentes cepas e espécies de *Bacillus*, vêm sendo testadas como alternativa ao tratamento químico também na indústria têxtil⁵. Estudos mostraram que essas peptidases foram capazes de melhorar as propriedades da fibra de lã, uma proteína formada principalmente por queratina. A camada externa da fibra apresenta um aspecto escamoso que é associado à capacidade de feltragem e encolhimento da lã. Assim, o tratamento com peptidases pode aumentar a capacidade de tingimento e de resistência ao encolhimento do tecido^{103,104}. Peptidases alcalinas isoladas de *Bacillus* spp., bem como a papaína, vêm sendo propostas para o tratamento das fibras da seda. Aproximadamente 25% do total do peso seco da seda são compostos por sericina, uma proteína globular amorfa que recobre os filamentos de fibroína, que por sua vez é uma proteína fibrosa majoritária encontrada na fibra da seda. A sericina confere à seda uma textura rugosa, e a peptidase age removendo a goma (sericina) do fio da seda através do processo de desengomagem, tornando a seda mais brilhosa, com textura lisa e com melhor elasticidade¹⁰⁸. O uso de peptidases em combinação com outras enzimas pode também melhorar o processo de lavagem de tecidos de algodão¹⁰⁹. O algodão apresenta aproximadamente 10% de substâncias não celulósicas, incluindo lipídios, pectinas e proteínas. Esses materiais de origem não celulósica formam uma barreira física hidrofóbica, que protege a fibra no ambiente; no entanto, dificultam a capacidade de absorção do tecido durante o processamento têxtil. Dessa forma, para remoção dessas impurezas, a peptidase é adicionada a uma formulação contendo outras enzimas, como celulases, lipases e pectinases⁹. Estudos também têm proposto o tratamento de fibras sintéticas como poliamida (Nylon®) e poliéster com peptidases. As fibras sintéticas possuem um número reduzido de grupos hidrofílicos e, por esse motivo, absorvem pouca água. Dessa forma, a ação de peptidases em associação com outras enzimas, como as lipases, aumenta o caráter hidrofílico e, conseqüentemente, melhora a absorção de água e afinidade tintorial das fibras sintéticas^{110,111}.

O couro também é utilizado na indústria têxtil. Esse material de origem animal contém proteínas e gorduras que são removidas ao longo de várias etapas do processamento industrial. Dessa forma, peptidases associadas a outras enzimas como lipases são geralmente utilizadas no processo, antes do curtimento do couro, em etapas denominadas remolho, depilação e purga¹¹². Na etapa de remolho, peptidases alcalinas são utilizadas para remoção de proteínas não colagenosas, facilitando a absorção da água pelo couro e diminuindo o tempo de remolho quando comparado aos métodos

convencionais. No processo de depilação ocorre a remoção do pelo e da epiderme, que são formados por proteínas residuais não fibrilares. As peptidases com atividades queratinolíticas e elastinolíticas vêm sendo empregadas neste processo, permitindo a hidrólise seletiva da proteína no folículo piloso sem afetar a resistência à tração do couro³⁰. A aplicação de peptidases específicas na depilação do couro pode reduzir significativamente a quantidade de sulfeto de sódio necessária nesse processo, melhorando a qualidade do couro e minimizando, assim, a poluição ambiental⁵. As peptidases também são utilizadas no processo de purga, relaxando as fibras de colágeno e tornando o couro mais macio, influenciando, por conseguinte, a qualidade do processo de curtimento e acabamento desse material.

11.10 USO DE PEPTIDASES EM OUTROS SETORES INDUSTRIAIS

11.10.1 Gestão de resíduos industriais e domésticos

O uso da peptidase alcalina na gestão de resíduos de várias indústrias de processamento de alimentos e atividades domésticas abriu uma nova era na utilização de peptidases na gestão de resíduos. Dalev¹¹³ utilizou a peptidase alcalina secretada por *Bacillus subtilis* no intuito de degradar penas provenientes dos resíduos da indústria avícola. As penas constituem aproximadamente 5% do peso do frango e são resíduos recalcitrantes; no entanto, são uma fonte rica em proteínas que podem ser usadas na composição de rações animais (exemplo: gado, frango e peixe), desde que sua estrutura rígida de queratina seja degradada. Além disso, uma formulação contendo as peptidases produzidas por *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Streptomyces* sp. e um agente redutor (tioglicolato) foi patenteada pela Genex, com a capacidade de degradar eficientemente fios de cabelo. Esse produto comercial tem como finalidade ajudar a limpeza de tubos entupidos com depósitos de cabelo¹¹⁴.

11.10.2 Indústria fotográfica

Peptidases alcalinas desempenham um papel crucial no bioprocessamento de filmes de raios X e filmes fotográficos, com o propósito de recuperar a prata impregnada nesses substratos. Esses filmes contêm uma camada de

gelatina suplementada com aproximadamente 1,5% a 2,0% de seu peso em prata. A reciclagem desses filmes pode gerar uma fonte de prata para uma variedade de fins. Convencionalmente, essa prata é recuperada através da queima dos filmes, o que causa poluição ambiental indesejável. Além disso, a película de base de poliéster não pode ser recuperada usando esse método. A hidrólise enzimática da gelatina não só ajuda a extrair a prata, mas também permite a reciclagem da película de poliéster. A peptidase alcalina de *Bacillus subtilis* foi eficiente em desfazer a camada de gelatina após 30 minutos a 50 °C a 60 °C, liberando a prata¹¹⁵ (Tabela 11.11).

11.10.3 Componentes ativos de soluções de limpeza

As peptidases são componentes úteis e importantes em soluções de limpeza de lentes de contato, dentaduras, membranas filtrantes e materiais cirúrgicos²⁷ (Tabela 11.11).

Tabela 11.11 Peptidases provenientes de micro-organismos utilizadas em diferentes processos

NOME COMERCIAL	FONTE	INDÚSTRIA	PROPRIEDADES
HT-proteolytic	<i>Bacillus subtilis</i>	Solvay Enzymes	Limpeza de resíduos fotográficos
Novozyme 243	<i>Bacillus licheniformis</i>	Novo Nordisk	Limpeza de dentaduras
Novozyme 471MP	Não especificada	Novo Nordisk	Hidrólise de gelatina em filmes fotográficos
Protin	<i>Bacillus</i> sp.	Amano Pharmaceuticals	Recuperação de prata
Thermoase	<i>Bacillus</i> sp.	Amano Pharmaceuticals	Recuperação de prata

Fonte: Adaptado de Jisha et al. (2013)⁸ e Yoshioka et al. (2007)⁹¹.

11.10.4 Peptidases em pesquisa

As peptidases podem ser usadas na rotina laboratorial em diferentes metodologias experimentais, como, por exemplo, no preparo de culturas de células animais aderentes (tripsina e colagenase), extração e purificação de material genético, DNA e RNA (proteínase K, pronase) e digestão de proteínas para análise proteômica (tripsina)².

11.11 TÉCNICA PASSO A PASSO PARA A DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

11.11.1 Substratos sintéticos para a detecção de atividade proteolítica

O uso de substratos peptídicos sintéticos tem sido amplamente utilizado para o monitoramento da atividade catalítica de peptidases. A identificação de um substrato adequado é o primeiro passo para o desenvolvimento de um ensaio para monitorar sua atividade. Dentre os substratos sintéticos que permitem o monitoramento da reação enzimática de forma contínua em aparelhos de espectrometria estão os substratos fluorogênicos e cromogênicos.

Os substratos fluorogênicos simples possuem um fluoróforo que se encontra ligado a um pequeno peptídeo que emite fluorescência mediante a clivagem do mesmo por uma peptidase (Figura 11.2). Esses substratos contêm aminas aromáticas como a 7-amino-4-metilcumarina (AMC) ou 4-metil-7-cumarilamida (NH-Mec), que estão conjugadas a peptídeos pequenos que conferem especificidade à reação. É a clivagem da ligação amida por peptidases que leva a um aumento da fluorescência. O grupo fluorescente ocupa a posição S1' das peptidases e sofre uma modificação das suas características de fluorescência na acilação do aminoácido.

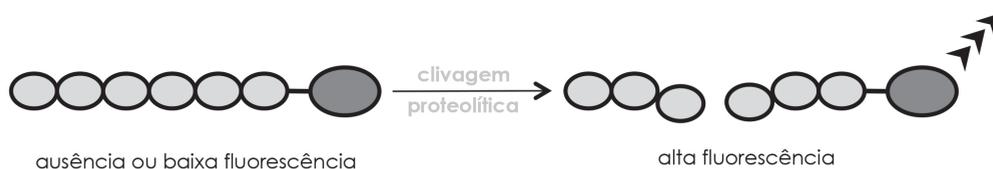


Figura 11.2 Grupos fluorescentes são adicionados ao substrato peptídico para gerar substratos para ensaios baseados em fluorescência. O substrato mais simples é sintetizado pela adição de uma classe de cumarina à sequência peptídica linear. A hidrólise do substrato por uma peptidase leva à emissão da fluorescência.

11.11.1.1 Fatores que influenciam a dosagem de atividade proteolítica utilizando substratos peptídicos

A avaliação da atividade deve ser realizada sob condições ótimas de pH, temperatura, enzima e substrato, as quais irão variar de acordo com a enzima

a ser estudada. Dessa forma, para uma análise satisfatória, é necessário conhecimento sobre a enzima estudada, como o pH ótimo de atuação, a temperatura na qual a enzima encontra-se estável e com alta atividade e a necessidade da adição de cofatores, como íons, por exemplo.

Temperatura

A temperatura é um dos fatores cruciais para a atividade enzimática. Nas reações catalisadas por enzimas, a velocidade é acelerada pelo aumento da temperatura até atingir uma temperatura ótima, na qual a enzima opera com a máxima eficiência. O aumento de temperatura provoca maior agitação intermolecular, e, conseqüentemente, maior probabilidade de as moléculas se chocarem para reagir. Entretanto, um aumento exagerado na temperatura leva a uma redução na atividade, uma vez que a agitação das moléculas se torna tão intensa que as ligações que estabilizam a estrutura espacial da enzima se rompem, ou seja, desnaturam-se. Por outro lado, as enzimas ficam inativas quando submetidas a baixas temperaturas, devido à falta de energia de ativação para provocar o choque entre as moléculas enzimáticas e as moléculas do substrato, levando a uma redução na atividade enzimática.

pH

O grau de acidez do meio, ou pH, é outro fator que influencia diretamente uma reação enzimática. Cada enzima possui uma faixa de pH ótima na qual a atividade catalítica é máxima. A influência do pH está diretamente relacionada com o estado de ionização das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da proteína e que são essenciais à catálise. Além disso, eles atuam em interações responsáveis pela manutenção da estrutura proteica. Dessa forma, a adição ou remoção de um próton pode desestabilizar a conformação da enzima, acarretando, como conseqüência, uma redução na sua capacidade catalítica.

Concentração da enzima

A velocidade de uma reação também será afetada pela quantidade de enzima disponível no meio. Dessa forma, a velocidade de clivagem do

substrato é proporcional à concentração da enzima presente no meio reacional.

Concentração do substrato

A velocidade máxima de uma reação também está diretamente relacionada com a concentração do substrato presente no meio, e a velocidade máxima apenas será atingida quando essa concentração for extremamente alta. Quando aumentamos a concentração do substrato, a enzima presente estará saturada, ou seja, todos os seus sítios ativos estarão ocupados por moléculas do substrato ou do produto. A partir desse momento, qualquer aumento na concentração do substrato não afetará a velocidade da reação.

11.11.1.2 Protocolo para detecção de atividade enzimática utilizando substrato peptídico

Obtenção do extrato celular

- 1) Contar e coletar o equivalente a 10^8 células microbianas.
- 2) Ressuspender as células em tampão com pH adequado para a enzima estudada, contendo o detergente CHAPS a 1%.
- 3) Métodos de lise:
 - 3.1) Adicionar pérolas de vidro às amostras e lisar as células realizando ciclos (de 30 segundos cada) de agitação e congelamento.
 - 3.2) Método congelamento/descongelamento: colocar as amostras durante 3 minutos no nitrogênio líquido alternando com descongelamento no banho-maria.
 - 3.3) Vórtex: submeter as amostras 30 segundos ao vórtex, alternando com 5 minutos de banho de gelo.
- 4) Após a lise, as amostras devem ser centrifugadas a $16.000\times g$ durante 20 minutos.
- 5) O sobrenadante deve ser coletado e usado para medição da atividade enzimática.

Obtenção do sobrenadante de cultivo

- 1) Transferir o meio de cultura com crescimento microbiano para tubos de centrífuga.
- 2) Centrifugar o meio de cultivo.
- 3) Separar o sedimento celular do sobrenadante.
- 4) Filtrar o sobrenadante para remover eventuais células.
- 5) Concentrar o sobrenadante (exemplo: Centricon®, Amicon®, polietilenoglicol).
- 6) O sobrenadante concentrado livre de células será utilizado para detecção de peptidases extracelulares.

Dosagem de atividade proteolítica

- 1) Em uma placa de 96 poços, misturar ao extrato celular e/ou ao sobrenadante o substrato peptídico (cromogênico ou fluorogênico) e o tampão para a atividade (no pH ideal da atividade proteolítica).
- 2) Incubar a mistura reacional à temperatura ótima da peptidase e detectar a clivagem do substrato ao longo do tempo através de espectrofotômetro (substratos cromogênicos) ou fluorímetro (substratos fluorogênicos).

11.11.2 Detecção de atividade proteolítica através de eletroforese em gel de poli(acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)- Zimografia

A eletroforese é um fenômeno observado quando uma partícula carregada migra sob a influência de um campo elétrico. Muitas das substâncias biologicamente importantes, como os aminoácidos, peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, apresentam grupos ionizáveis e podem, quando em solução, existir como cátions e ânions. As separações eletroforéticas são quase sempre feitas em gel, em vez de em solução livre, por dois motivos: (1) o gel suprime correntes de convecção produzidas por pequenos gradientes de temperatura, requisito fundamental para uma separação eficaz; e (2) o gel age como uma peneira molecular que potencializa a separação. As moléculas que são menores em relação aos poros do gel movem-se com maior facilidade através deles, ao passo que as moléculas muito maiores que os poros são

quase imóveis. As moléculas de tamanho intermediário movem-se através do gel com vários graus de facilidade.

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi primeiramente descrita em 1970, e hoje é uma das técnicas mais amplamente difundidas em diferentes campos das ciências biológicas, sendo usada principalmente para a separação de proteínas e ácidos nucleicos de baixa massa molecular. Os géis de poliacrilamida são meios de sustentação escolhidos para a eletroforese porque são quimicamente inertes, sendo formados praticamente pela polimerização de moléculas de acrilamida e *N,N*-metileno-bisacrilamida, mais conhecida como bisacrilamida, agente responsável pela formação de ligações cruzadas entre as moléculas de acrilamida (para tal, necessita-se ainda da presença de um catalisador para a reação, o persulfato de amônio, e de um iniciador da polimerização, o tetrametiletilenodiamina – TEMED) (Figura 11.3). A migração das proteínas está diretamente relacionada com o tamanho dos poros formados no interior do gel. O tamanho desses poros é um reflexo da concentração de acrilamida e bisacrilamida. Assim sendo, elevadas concentrações dessas substâncias vão resultar em um gel de poliacrilamida com poros menores e, portanto, dotado de melhor capacidade de separar proteínas com menor massa molecular. O gel de poliacrilamida é dividido em duas partes: gel de separação (do inglês, *running gel*) e gel de empacotamento (do inglês, *stacking gel*) (Figura 11.3). O gel de empacotamento é feito geralmente com uma baixa concentração de poliacrilamida, possuindo poros maiores, e tem como função agrupar as proteínas antes que estas entrem no gel de separação, melhorando a resolução das proteínas presentes em uma amostra. O percentual de poliacrilamida do gel de separação deve ser adaptado à faixa de tamanho das proteínas presentes na amostra, melhorando a resolução da separação, como observado na Tabela 11.12.

Tabela 11.12 Faixa de resolução do SDS-PAGE

PORCENTAGEM DO GEL DE POLIACRILAMIDA	FAIXA DE MASSA MOLECULAR (KDA)*
7	50 a 500
10	15 a 300
12	10 a 200
15	10 a 45
20	5 a 40

* kDa, kiloDalton

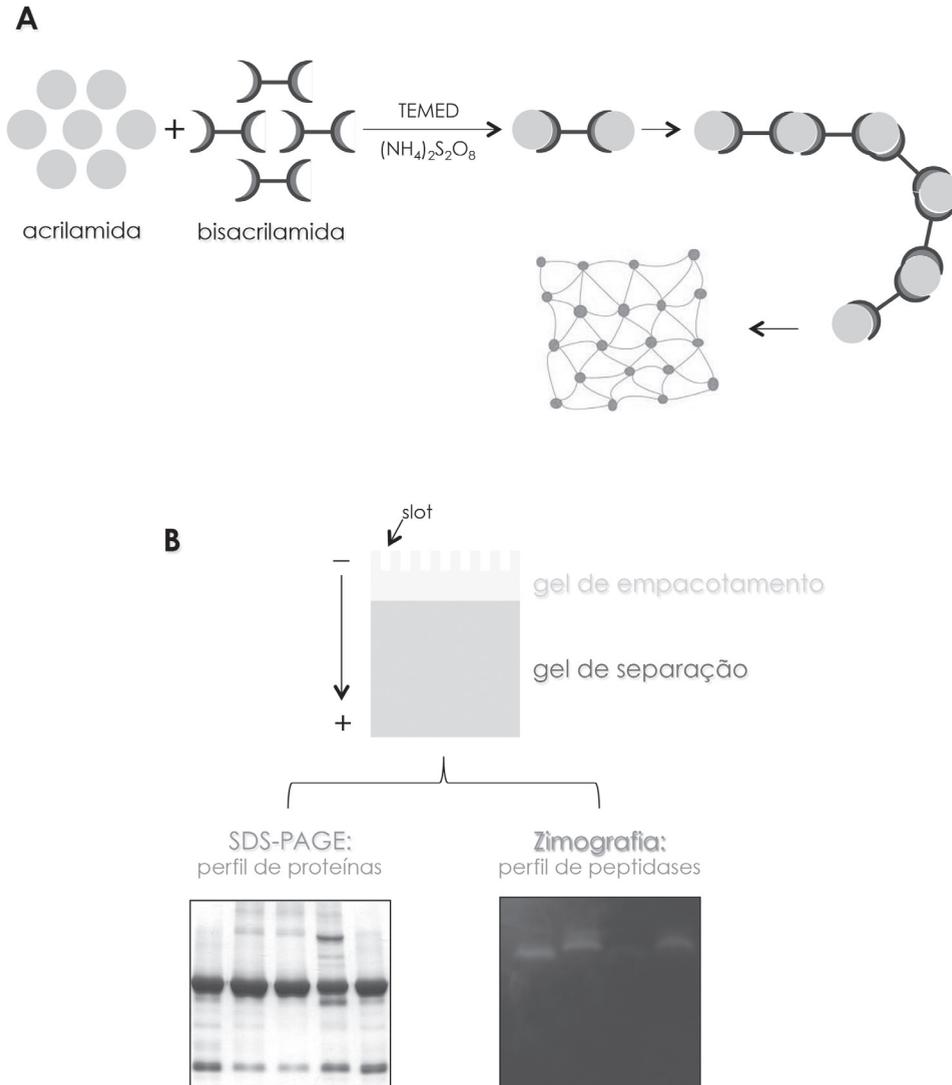


Figura 11.3 (A) Reação entre acrilamida e bisacrilamida na presença de persulfato de amônio e TEMED para a formação do gel de poli-acrilamida. (B) Esquema de um SDS-PAGE destacando a presença de duas regiões: gel de empacotamento (com os *slots*, local de adição da amostra a ser analisada) e gel de separação. Os polos negativo e positivo são mostrados à esquerda. Na parte inferior da figura (B), exemplo de géis evidenciando (i) a separação de proteínas de uma amostra (gel à esquerda) e (ii) o perfil de peptidases (gel à direita).

A adição do detergente iônico dodecil sulfato de sódio à eletroforese é comum, sendo essa técnica conhecida como SDS-PAGE. O SDS é um detergente capaz de desnaturar as proteínas, pois liga-se a regiões hidrofóbicas

das moléculas de proteínas causando seu desdobramento, o que resulta na perda de sua estrutura terciária e secundária e consequente linearização. Cada molécula de proteína se liga a um grande número de moléculas de SDS, carregado negativamente, que supera a carga intrínseca da proteína e faz com que ela migre em direção ao eletrodo positivo quando uma tensão é aplicada. A relação quantidade de SDS (ou carga negativa) é proporcional ao tamanho da molécula proteica. Além disso, um agente redutor, como, por exemplo, o β -mercaptoetanol, é geralmente adicionado para quebrar ligações dissulfeto presentes nas proteínas, de tal forma que cada constituinte polipeptídico de uma molécula, formada por várias subunidades, possa ser analisado separadamente. Sendo assim, no SDS-PAGE a taxa de migração baseia-se no tamanho da proteína, com moléculas menores migrando mais rapidamente pelo gel em direção ao eletrodo positivo, afastando-se das proteínas maiores, que tem maior dificuldade em atravessar a malha do gel ao logo da corrida. Como resultado, uma mistura complexa de proteínas é fracionada em uma série de diferentes bandas de proteínas arranjadas de acordo com sua massa molecular (Figura 11.3).

A presença de peptidases em uma amostra também pode ser avaliada através dessa técnica, conhecida como zimografia, sendo necessária a incorporação de um substrato proteico ao gel de separação. Um dos substratos mais utilizados nesse tipo de ensaio é a gelatina, geralmente a uma concentração de 0,1%, porém concentrações variando de 0,1% a 0,5% também podem ser utilizadas. Outros substratos podem ser utilizados, como substrato proteico incorporado ao gel dependendo do propósito a ser analisado, por exemplo, caseína, albumina, colágeno, mucina, dentre outras. As proteínas são desnaturadas pelo SDS, porém não são reduzidas com β -mercaptoetanol. Após a corrida eletroforética, estas são renaturadas mediante a utilização de um detergente não iônico, como o Triton X-100. Em seguida, o gel é incubado em um tampão apropriado, permitindo, assim, a degradação do substrato proteico na região em que se encontra a peptidase (Figura 11.3). A atividade proteolítica é evidenciada através da coloração do gel com uma solução de Amido Black ou Coomassie Blue em ácido acético, metanol e água destilada. Finalmente, o gel pode ser descorado com solução de ácido acético/metanol, resultando em áreas claras que indicam a presença de hidrólise da proteína incorporada ao gel.

Materiais necessários

- Cuba de eletroforese
- Fonte
- Placas de vidro
- Espaçadores
- Estrutura de montagem das placas
- Moldura para a confecção dos *slots* (pente)

Reagentes

- Solução de poliacrilamida a 30% (29,2 g de acrilamida + 0,8 g de bisacrilamida em 100 mL de água destilada. Filtrar em papel Whatman nº 1. Manter a solução em recipiente escuro, protegido da luz, por no máximo 30 dias. Substância neurotóxica e cancerígena, portanto, durante a pesagem deve-se usar luvas e máscara).
- Solução de Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (18,15 g de Tris-base em 100 mL de água destilada. Ajustar o pH a 8,8 com HCl 6 N. A solução deve ser conservada na geladeira).
- Solução de Tris-HCl a 0,5 M, pH 6,8 (6 g de Tris-base em 100 mL de água destilada. Ajustar o pH a 6,8 com HCl 6 N. A solução deve ser conservada na geladeira).
- Solução de gelatina 0,1% (1 g de gelatina em 10 mL de água destilada).
- Solução de SDS a 10% (10 g de SDS em 100 mL de água destilada. Manter à temperatura ambiente).
- Solução de persulfato de amônio (APS) a 10% (0,1 g em 1 mL de água destilada. Conservar no congelador).
- TEMED (utilizar direto do frasco mãe).
- Tampão de corrida 5× (9 g de Tris-base, 43,2 g de glicina, 3 g de SDS e 600 mL de água destilada. Ajustar pH para 8,3 com HCl 6 N. Manter a solução estoque em geladeira. A solução deve ser utilizada diluída a 1×, a fim de realizar a corrida eletroforética).
- Tampão de amostra 4× (Tris-HCl 125 mM, pH 6,8; SDS 4%; glicerol 20% e azul de bromofenol 0,002%. Conservar no congelador).
- Solução de Triton X-100 a 2,5% (2,5 g de Triton X-100 em 100 mL de água. Conservar na geladeira).
- Solução de azul de Coomassie brilhante R-250 (2,5 g em 400 mL de água destilada, 500 mL de metanol e 100 mL de ácido acético. Manter à temperatura ambiente).

- Solução descorante (250 mL de metanol, 100 mL de ácido acético e 650 mL de água destilada. Manter à temperatura ambiente).

Preparo do gel e corrida eletroforética

- 1) Após montagem das placas no suporte de eletroforese, adicionar água a fim de detectar possíveis regiões de vazamento.
- 2) A concentração dos reagentes vai variar de acordo com o porcentual de poliacrilamida a ser utilizado. A Tabela 11.13 apresenta a confecção de géis em diferentes porcentuais de poliacrilamida.
- 3) Após o preparo do gel, adicionar a solução ao espaço entre as placas de vidro utilizando uma pipeta Pasteur, deixando espaço suficiente para o gel de empacotamento e colocação do pente.
- 4) Recomenda-se adicionar cuidadosamente água destilada na parte superior do gel a fim de remover possíveis bolhas formadas.
- 5) Após a polimerização do gel de separação, a solução do gel de empacotamento deve ser adicionada, e o pente imediatamente colocado.
- 6) Após a remoção dos pentes presentes nos géis polimerizados, adicionar o tampão de corrida na parte superior dos géis completando todos os espaços, bem como no reservatório na parte inferior da cuba eletroforética, certificando-se de que a parte inferior do gel está em contato com o tampão.
- 7) O tampão de amostra deve ser adicionado às amostras de proteínas ajustadas para a concentração desejada e, então, adicionadas nos espaços criados pelos pentes (chamados de *slots*), reservando o primeiro poço para o padrão de massa molecular.
- 8) A corrida deve ser realizada a 4 °C, a uma corrente constante de 200 Volts e 40 mA.
- 9) Após a corrida eletroforética, os géis devem ser incubados por 1 hora à temperatura ambiente na presença de Triton X100 2,5%, sob agitação constante.
- 10) Em seguida, lavar os géis com água destilada várias vezes, para a retirada do Triton X-100, e adicionar o tampão de digestão apropriado com o pH que deseja ser utilizado para a reação enzimática.
- 11) Os géis devem então ser incubados por até 48 horas na temperatura ótima da atividade enzimática.
- 12) Com o intuito de visualizar a hidrólise da gelatina pelas enzimas proteolíticas presentes na amostra, incubar os géis por 16 horas na presença do corante azul de Coomassie R-250, descorando-os logo em seguida

utilizando a solução descorante, evidenciando-se assim a presença de halos claros em um fundo azul.

Tabela 11.13 Composição do SDS-PAGE

SOLUÇÕES	GEL DE SEPARAÇÃO 7,5%	GEL DE SEPARAÇÃO 10%	GEL DE SEPARAÇÃO 12%	GEL DE SEPARAÇÃO 15%	GEL DE EMPACOTAMENTO 4%
Poliacrilamida	2,5 mL	3,2 mL	4,0 mL	5,0 mL	1,33 mL
Tris pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	–
Tris pH 6,8	–	–	–	–	2,5 mL
Água destilada	3,84 mL	3,28 mL	2,34 mL	1,34 mL	6,1 mL
Gelatina 1%	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	–
SDS 10%	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
APS 10%*	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED*	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL	10 µL

* Uma vez que o APS e o TEMED são os agentes catalisadores da polimerização do gel, devem ser os últimos a serem adicionados ao gel de separação. O gel de empacotamento deve ser preparado após a polimerização do gel de separação.

Diferentes parâmetros podem ser avaliados na zimografia, tais como: número de bandas com atividade proteolítica, intensidade da atividade enzimática e estimativa de massa molecular. Em adição, pode-se avaliar o pH ótimo de atividade (variando-se o pH do tampão de digestão enzimática), a temperatura ótima de atividade (variando-se a temperatura de incubação do gel), tempo de proteólise (variando-se o tempo de incubação no tampão de digestão), classe proteolítica (incubando-se o gel na ausência e na presença de inibidores de diferentes classes de peptidases), requerimento de íons (incubando-se o gel na ausência e na presença de diferentes cátions ou ânions) e capacidade de degradar diferentes substratos proteicos (incorporando-se ao gel diferentes proteínas, tais como caseína, albumina, fibronectina, laminina, mucina, colágeno, dentre outras). A Figura 11.4 sugere um fluxograma para essa análise multifatorial da atividade proteolítica através de zimografia.

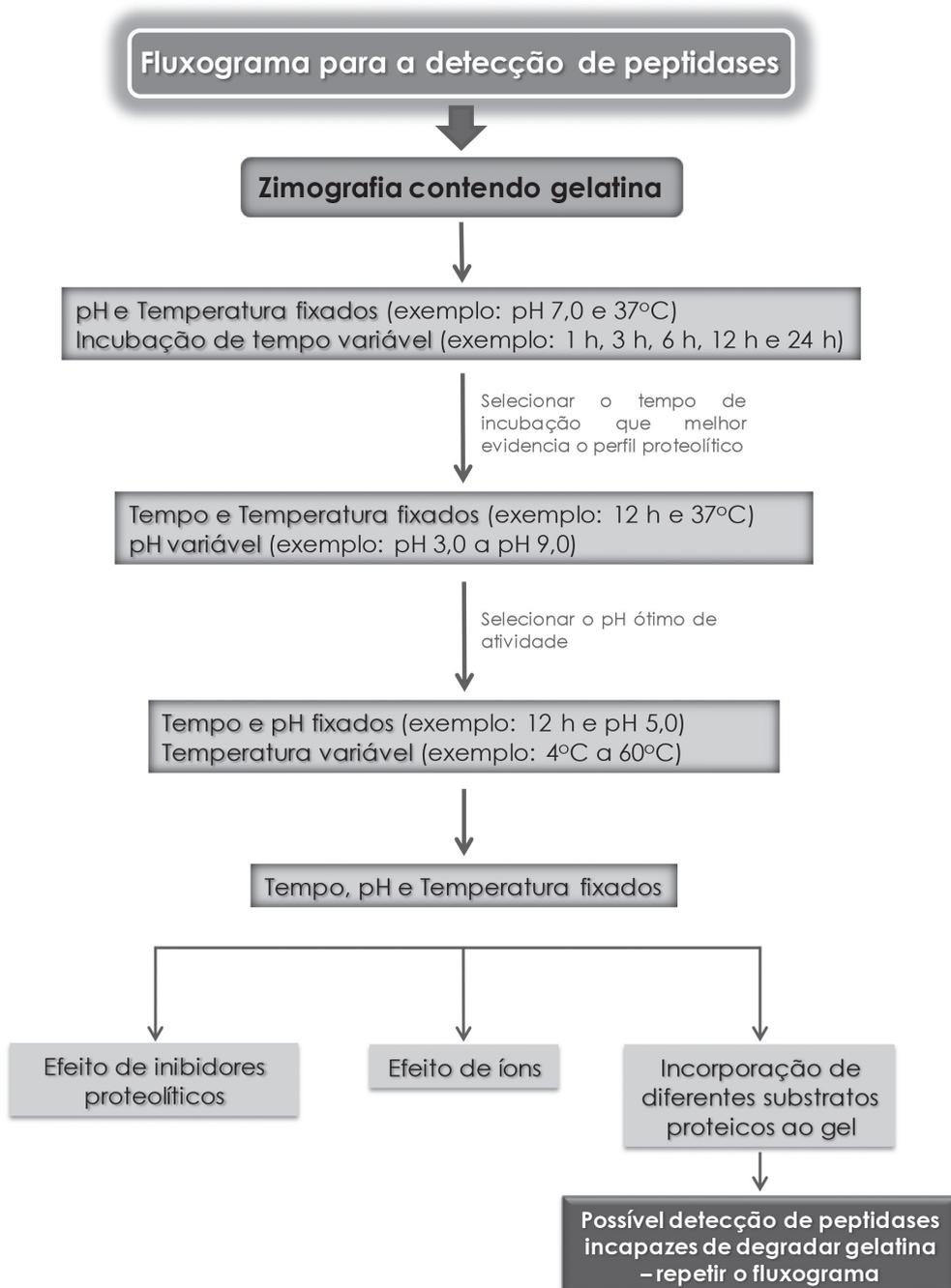


Figura 11.4 Fluxograma para a detecção de peptidases através de zimografia.

11.12 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As peptidases ocupam lugar de destaque no cenário mundial, pois são responsáveis por reações cruciais ao metabolismo celular, além de apresentarem propriedades biotecnológicas adequadas para o uso em diferentes processos industriais. Uma visão econômica global indica que a relação entre a demanda mundial de peptidases e o PIB mundial vem aumentando de forma significativa, e a demanda por essa classe de enzimas tem previsão de avançar de 5% a 6% ao ano até 2015.¹⁸⁻²⁰ Vislumbrando o sucesso comercial dessa classe de enzimas, pesquisadores já começaram a direcionar suas investigações para a descoberta e a engenharia de novas peptidases, que possam atender à imensa demanda comercial global. No futuro próximo, a engenharia de proteínas irá oferecer possibilidades de geração de peptidases com funções inteiramente novas. Associado a isso, o avanço acelerado de técnicas moleculares cada vez mais robustas e precisas em relação aos estudos de diversidade microbiana vem desvendando de forma surpreendente a imensidão dessa biodiversidade como possível fonte de novos biocatalisadores. A biodiversidade representa, sem dúvida, um recurso valioso para as inovações biotecnológicas e desempenha um papel importante na busca de melhores cepas de micro-organismos para utilização nos mais variados processos industriais, tornando-os mais rápidos, eficazes, econômicos e limpos do ponto de vista ecológico.

REFERÊNCIAS

1. López-Otín C, Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem.* 2008;283:30433-7.
2. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 1999;17:561-94.
3. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: present and future. *FEBS Lett.* 2013;587:1155-63.
4. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:597-635.
5. Ray A. Protease enzyme-potential industrial scope. *Int J Tech.* 2012;2:1-4.
6. Ward OP, Rao MB, Kulkarni A. Proteases, Production. In: *Applied Microbiology: Industrial.* New York: Springer; 2009. p. 495-511.
7. Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline peptidases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59:15-32.
8. Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzyme Res.* 2013;1:39-51.
9. Mojsov K. Enzyme scouring of cotton fabrics: a review. *Int J Market Technol.* 2012;2:256-75.
10. Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA. The MEROPS database as a protease information system. *J Struct Biol.* 2001;134:95-102.
11. Barrett AJ, Tolle DP, Rawlings ND. Managing peptidases in a post genomic era. *Biol Chem.* 2003;384:873-882.
12. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D343-50.
13. Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic. *Med Chem.* 2005;1:71-104.
14. Craik C, Page M, Madison E. Proteases as therapeutics. *Biochem J.* 2011;435:1-17
15. Santos ALS, Sodr e CL, Branquinha MH, d'Avila-Levy CM. Proteolytic inhibitors: implications on microorganisms development, virulence and pathogenesis. *Curr Med Chem.* 2013;20:3035-40.
16. Dash A, Kulkarni A, Dunn B, Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2003;38:89-119.
17. Santos ALS, Braga-Silva LA. Aspartic protease inhibitors: effective drugs against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Mini Rev Med Chem.* 2013;13:155-62.
18. World Enzyme – Industry Market Research, The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 338 (January 2014).
19. World Enzymes – Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders. The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 338 (January 2014).

20. Enzyme – Industry Market Research, The Freedonia Group, Cleveland, OH, USA, pp. 309 (May 2015).
21. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline proteases: a review. *Bioresour Technol.* 1998;64:175-83.
22. Outtrup H, Boyce COL. Microbial proteinases and biotechnology. In: Fogarty CT, Kelly K, editors. *Microb enz and biotechnol.* London: Elsevier; 1990. p. 227-54.
23. Birschbach P, Fish N, Henderson W, Willrett D. Enzymes: tools for creating healthier and safer foods. *Food Technology.* 2004;58:20-6.
24. Neklyudov AD, Ivankin AN, Berdutina AV. Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl Biochem Microbiol.* 2000;36:452-9.
25. Ward OP. Proteolytic enzymes. In: Moo-Young M, editor. *Comprehensive biotechnology, the practice of biotechnology: current commodity products.* Oxford: Pergamon Press; 1985. p. 789-818.
26. Dressler D. Botulinum toxin drugs: future developments. *J Neural Transm.* 2008;115:575-7.
27. Anwar A, Saleemuddin M. Alkaline protease from *Spilosomaobliqua*: potential applications in bioformulation. *Biotechnol Appl Biochem.* 2000;31:85-9.
28. Sjodahl J, Emmer A, Vincent J, Roeraade J. Characterization of proteinases from Antarctic krill(*Euphausiasuperba*). *Protein Expr Purif.* 2002;26:153-61.
29. Andersen L, inventor. Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. United Statespatent.US5834299 A; 1998 Nov 10.
30. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006;70:21-33.
31. Varela H, Ferrari MD, Belobradjic L, Vazquez A, Loperena ML. Skin unhairing proteases of *Bacillus subtilis*: production and partial characterization. *Biotechnol Lett.* 1997;19:755-8.
32. Valdirene NM, Roberto NS. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. *Revista Processos Químicos.* 2009;3:9-23.
33. Melo LCP. Química verde no Brasil: 2010-2030 – Edição revista e atualizada. Brasília: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos; 2010.
34. Liese A, Seelbach K, Wandrey C. *Industrial biotransformations.* Weinheim: Willey-VCH; 2006.
35. Castilho LR, Polato CMS, Baruque EA, Sant’anna JrGL, Freire DMG. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochem Eng J.* 2000;4:239-47.
36. Joo HS, Chang CS. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Proc Biochem.* 2005;40:1263-70.

37. Paulillo LF, Vian CEF, Shikida PFA, Mello FT. Álcool combústivel e biodiesel no Brasil: quo vadis? *Rev Econ Sociol Rural*. 2007;45:531-65.
38. Pandey A, Soccol CR. Bioconversion of biomass: a case study of ligno-cellulosics bioconversions in solid-state fermentation. *Braz Arch Biol Technol*. 1998;41:379-90.
39. Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT. Biotechnological potential of agro industrial residues I: sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*. 2000;74:69-80.
40. Godfrey T, West S. Introduction to industrial enzymology. In: Godfrey T, West S, editors. *Industrial Enzymology*. 2nd ed. London: Macmillan Press; 1996. p. 1-8.
41. Maurer KH. Detergent peptidases. *Curr Opin Biotechnol*. 2004;15:330-4.
42. Showell MS. Enzymes, detergent. In: Flickinger MC, Drew SW, editors. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis And Bioseparation*. New York: Wiley & Sons; 1999. p. 958-71.
43. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotech*. 2002;13:345-51.
44. Kumar D, Savitri N, Thakur N, Verma R, Bhalla TC. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. *Res J Microbiol*. 2008;3:661-72.
45. Sinha R, Khare SK. Isolation of a halophilic *Virgibacillus* sp. Emb13: characterization of its protease for detergent application. *Indian J Biotechnol*. 2012;11:416-26.
46. Durham DR. Utility of subtilisin GX as a detergent additive. *J Appl Bacteriol*. 1987;63:381-6.
47. Kitayama M, inventor. New low-temperature alkaline protease. Japanese patent. JP4271781; 1992.
48. Masse FWJL, Tilburg R. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. *J Am Oil Chem Soc*. 1983;60:1672-5.
49. Nielsen MH, Jepsen SJ, Outtrup H. Enzymes for low temperature washing. *J Am Oil Chem Soc*. 1981;58:644-9.
50. Bech LM, Branner S, Breddam K, Groen H, inventors. Oxidation stable detergent enzymes. United States patent. US5208158A; 1993.
51. Castro HF, Mendes AA, Santos JC. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*. 2004;27:146-56.
52. Gupta R, Gupta K, Saxena RK, Khan S. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. *Biotechnol Lett*. 1999;21:135-8.
53. Hasan AKMQ, Tamiya E, inventors. Cold-active protease cp70. Patent. WO 9727313; 1997.
54. Kumar CG, Malik K, Tiwari MP. Novel enzyme-based detergents: an Indian perspective. *Curr Sci*. 1998;75:1312-8.
55. Wolff AM, Showell MS, Venegas MG, Barnett BL, Wertz WC. Laundry performance of subtilisin proteases. In: Bott R, Betzel C, editors. *Subtilisin enzymes: practical protein engineering*. New York: Plenum Press; 1996. p. 113-20.

56. Farell Jr. HM, Malin EL, Brown EM, Qi PX. Casein micelle structure: what can be learned from milk synthesis and structural biology? *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2006;11:135-47.
57. Ruiz DM, Lannuci NB, Cascone O, De Castro RE. Peptide synthesis catalysed by a haloalkaliphilic serine protease from the archaeon *Natrialba magadii* (Nep). *Let Appl Microbiol.* 2010;51:691-6.
58. Regil R, Sandoval G. Biocatalysis for biobased chemicals. *Biomolecules.* 2013;3:812-47.
59. Guzmán F, Barberis S, Illanes A. Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electron J Biotechnol.* 2007;10:279-314.
60. Morihara K, Oka T, Tsuzuki H, Tochino Y, Kanaya T. *Achromobacter* protease I-catalyzed conversion of porcine insulin into human insulin. *Biochem Biophys Res Comm.* 1980;92:396-402.
61. Kumar D, Bhalla TC. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68:726-36.
62. Gupta A, Khare K. Enzymes from solvent-tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit Rev Biotechnol.* 2009;29:44-54.
63. Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour Technol.* 2012;115:48-57.
64. Sá-Pereira P, Duarte JC, Ferrara MA, Lacerda PSB, Alves FC. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo MS. *Enzimas em Biotecnologia.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 433-62.
65. Zimmer KR, Borré GL, Trentin DS, Woicickoski C, Frasson AP, Graeff AA, Gomes P, Macedo AJ. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato.* 2009;10:123-37.
66. Onken JE, Brazer SR. Clinical trials. How should they be designed? *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 1994;4:423-34.
67. Cruz MEM, Martins MB, Corvo ML, Gaspar MM, Oliveira EMM, Ferrara MA. Enzimas em medicamentos e diagnóstico. In: Bon EPS, Ferrara MA, Carmo ML. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 307-31.
68. Santos EP, Velasco MVR, Villa ALV, Simões SI. Enzimas na indústria de cosméticos. In: Bon EPS, Ferrara MA, Corvo MS. *Enzimas em Biotecnologia.* Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008. p. 333-48.
69. Onken JE, Greer PK, Calingaert B, Hale LP. Bromelain treatment decreases secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by colon biopsies in vitro. *Clin Immunol.* 2008;126:345-52.
70. Bhagat S, Agarwal M, Roy V. Serratiopeptidase: a systematic review of the existing evidence. *Int J Surg.* 2013;11:209-17.

71. Lopes MC, Mascarini RC, da Silva BM, Flório FM, Basting RT. Effect of a papain-based gel for chemomechanical caries removal on dentin shear bond strength. *J Dent Child*. 2007;74:93-7.
72. Balami JS, Chen R, Sutherland BA, Buchan AM. Thrombolytic agents for acute ischaemic stroke treatment: the past, present and future. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2013;12:145-54.
73. Bansal S, Sangha KS, Khatri P. Drug treatment of acute ischemic stroke. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2013;13:57-69.
74. Sumi H, Hamada H, Nakanishi K, Hiratani H. Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. *Acta Haematol*. 1990;84:139-43.
75. Yagmurlu A, Barlas M, Gursel I, Gokcora IH. Reduction of surgery-induced peritoneal adhesions by continuous release of streptokinase from a drug delivery system. *Eur Surg Res*. 2003;35:46-9.
76. Bartosh NS, Tomlin T, Cable C, Halka K. Newly diagnosed congenital factor VII deficiency and utilization of recombinant activated factor VII (NovoSeven®). *Clin Pharmacol*. 2013;5:53-8.
77. Brandelli A, Daroit DJ, Riffel A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85:1735-50.
78. Brandelli A. Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess Technol*. 2008;1:105-16.
79. Vignardet C, Guillaume YC, Michel L, Friedrich J, Millet J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. *Int J Pharm*. 2001;224:115-22.
80. Bersanetti PA, Park HY, Bae KS, Son KH, Shim DH, Hirata IY, Juliano MA, Carmona AK, Juliano L. Characterisation of Arazyme, an exocellular metalloprotease isolated from *Serratia proteamaculans* culture medium. *Enzyme Microb Technol*. 2005;37:574-81.
81. Burge S. Cohesion in the epidermis. *Br J Dermatol*. 1994;131:153-9.
82. Chapman SJ, Walsh S. Desmosomes, corneodesmosomes, and desquamation – an ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch Dermatol Res*. 1990;282:304-10.
83. Suzuki Y, Nomura J, Koyama J, Horii I. The role of proteases in stratum corneum: involvement in stratum corneum desquamation. *Arch Dermatol Res*. 1994;286:249-53.
84. Rawlings AV, Watkinson A, Rogers J, Mayo A, Scott IR. Abnormalities in stratum corneum structure, lipid composition and desmosome degradation in soap-induced winter xerosis. *J Soc Cosmet Chem*. 1994;45:203-20.
85. El-Kadi KN, Rawlings AV, Feinberg C, Watkinson A, Nunn CC, Battaglia A, Chandar P, Richardson N, Pocalyko DJ. Broad specificity alkaline proteases efficiently reduce the visual scaling associated with soap-induced xerosis. *Arch Dermatol Res*. 2001;293:500-7.
86. Dessinioti C, Katsambas A. Seborrheic dermatitis: etiology, risk factors, and treatments: facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013;31:343-51.

87. Longshaw CM, Wright JD, Farrell AM, Holland KT. *Kytococcus sedentarius*, the organism associated with pitted keratolysis, produces two keratin-degrading enzymes. J Appl Microbiol. 2002;93:810-6.
88. Riffel A, Ortolan S, Brandelli A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. J Chem Technol Biotechnol. 2003;78:855-9.
89. Mohorcic M, Torkar A, Friedrich J, Kristl J, Murdan S. An investigation into keratinolytic enzymes to enhance ungual drug delivery. Int J Pharmac. 2007;332:196-201.
90. Langeveld JPM, Wang JJ, van de Wiel DFM, Shih GC, Garssen GJ, Bossers A. Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep. J Infect Dis. 2003;188:1782-9.
91. Yoshioka M, Miwa T, Horii H, Takata M, Yokoyama T, Nishizawa K. Characterization of a proteolytic enzyme derived from a *Bacillus* strain that effectively degrades prion protein. J Appl Microbiol. 2007;102:509-15.
92. Ravanti L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in wound repair. Int J Mol Med. 2000;6:391-407.
93. Davidenko TI, Chuenko AV, Zakharova IY, Bondarchuk AA, Kondratyuk VI, Kovalenko VN. Immobilized Elastoterase. Pharm Chem J. 1997;31:396-400.
94. Shi L, Carson D. Collagenase santyl ointment: a selective agent for wound debridement. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2009;36:S12-16.
95. Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. J Immunol. 1995;155:3653-9.
96. Gilpin D, Coleman S, Hall S, Houston A, Karrasch J, Jones N. Injectable collagenase *Clostridium histolyticum*: a new nonsurgical treatment for Dupuytren's disease. J Hand Surg Am. 2010;35:2027-38.
97. Gelbard M, Goldstein I, Hellstrom WJ, McMahon CG, Smith T, Tursi J, Jones N, Kaufman GJ, Carson CC. Clinical efficacy, safety and tolerability of collagenase *Clostridium histolyticum* for the treatment of peyronie disease in 2 large double-blind, randomized, placebo controlled phase 3 studies. J Urol. 2013;190:199-207.
98. Shan L, Marti T, Sollid LM, Gray GM, Khosla C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. Biochem J. 2004;383:311-8.
99. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, Sollid LM, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science. 2002;297:2275-9.
100. Gracies JM, Simpson DM. Botulinum toxin therapy. Neurologist. 2000;6:98-115.
101. Bachur TPR, Veríssimo DM, Souza MMC, Vasconcelos MM, Sousa FCF. Toxina botulínica: de veneno a tratamento. Rev Eletron Pesq Med. 2009;3:9-19.
102. Blau L, Menegon RF, Chung MC. Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. Química Nova. 2006;29:1307-17.

103. Kasana RC, Salwan R, Yadav SK. Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit Rev Microbiol*. 2011;37:262-76.
104. Kuddus M, Ramteke PW. Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. *Crit Rev Microbiol*. 2012;38:330-8.
105. Araújo R, Casal M, Cavaco-Paulo A. Application of enzymes for textile fibres processing. *Biocatal Biotransform*. 2008;26:332-49.
106. Hassan MA, Haroun BM, Amara AA, Serour EA. Production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from egyptian ecosystem. *BioMed Res Int*. 2013;2013:175012.
107. Infante I, Morel MA, Ubalde MC, Martínez-Rosales C, Belvisi S, Castro-Sowinski S. Wool-degrading *Bacillus* isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010;26:1047-52
108. Sumana D, Sudarshan M, Thakur AR, Ray Chaudhuri S. Degumming of raw silk fabric with help of marine extracellular protease. *Am J Biochem Biotechnol*. 2013;9:12-8.
109. Karapinar E, Sariisik MO. Scouring of cotton with cellulases, pectinases and proteases. *Fibres Textiles Eastern Europe*. 2004;12:79-82.
110. Gashti MP, Assefipour R, Kiumarsi A, Gashti MP. Enzymatic surface hydrolysis of polyamide 6,6 with mixtures of proteolytic and lipolytic enzymes. *Preparative Biochem Biotechnol*. 2013;43:798-814.
111. Silva C, Cavaco-Paulo A. Monitoring biotransformations in polyamide fibres. *Biocatal Biotransform*. 2004;22:357-60.
112. Thanikaivelan P, Rao JR, Nair BU, Ramasami T. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. *Trends Biotechnol*. 2004;22:181-8.
113. Dalev PG. Utilization of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. *Bioresour Technol*. 1994;48:265-7.
114. Jacobson JW, Glick JL, Madello KL, inventors. Composition for cleaning drains clogged with deposits containing hairs. United States patent. US4540506A; 1985 Sep 10.
115. Fujiwara N, Tsumiya T, Katada T, Hosobuchi T, Yamamoto K. Continuous recovery of silver from used X-ray films using a proteolytic enzyme. *Process Biochem*. 1989;24:155-6.

