



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020016697-2 A2



(22) Data do Depósito: 16/08/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 22/02/2022

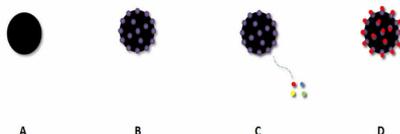
(54) **Título:** PROCESSO DE SÍNTESE DE COMPÓSITO MAGNÉTICO E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE

(51) **Int. Cl.:** C12N 9/50; C12N 13/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** LAYLA CARVALHO MAHNKE; MARIA HELENA MENEZES ESTEVAM ALVES; LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JÚNIOR.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE SÍNTESE DE COMPÓSITO MAGNÉTICO E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE. Biomoléculas de interesse industrial necessitam passar por processos de concentração e purificação para serem comercializadas e/ou aplicadas para fins terapêuticos, processos que demandam várias etapas, tempo, elevado custo e especificação, resultando no desenvolvimento de métodos inovadores com intuito de solucionar essa problemática. A presente patente de invenção descreve um novo método para a purificação de colagenase utilizando compósito magnético de azocoll, sintetizado com cloretos férricos e azocoll, com um núcleo magnético de atividade superparamagnético, e um ligante específico para a colagenase, apresentado eficiente desempenho na purificação e/ou separação da enzima, alta especificidade, de simples utilização e síntese, baixo custo, podendo purificar colagenase diretamente do extrato de diferentes origens, sem a necessidade de etapas prévias ou posteriores, podendo ainda ser reutilizado em processos seguintes de purificação.



PROCESSO DE SÍNTESE DE COMPÓSITO MAGNÉTICO E SEU USO NA PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE

→ Campo da invenção

1. A presente invenção descreve o processo de síntese do composto magnético de azocoll e sua aplicação no método direto para a purificação, isolamento e/ou separação da colagenase presente em extratos.

→ Antecedentes da invenção

2. Produtos comerciais como enzimas, proteínas, anticorpos, moléculas orgânicas, entre outros, após serem extraídas de seu organismo produtor, necessitam passar por processos de concentração e purificação, principalmente se a molécula extraída possuir um objetivo final terapêutico, onde é necessário um grau de pureza próximo a 100%. As usuais técnicas de concentração e purificação se resumem a precipitação, centrifugação, ultrafiltração e cromatografias. Para se obter um elevado grau de pureza, é necessário aplicar várias etapas citadas acima, demandando tempo, e reduzindo o rendimento do processo. Cada etapa aplicada apresenta um custo alto de operação, elevando o custo final do produto comercializado, onde cerca de 80% do valor final está relacionado a estas etapas de produção e purificação, levando ao desenvolvimento de novos métodos inovadores.

3. As atuais indústrias relatam a problemática dos processos de purificação por serem demoradas e onerosas, envolvendo muitas etapas e especificação. Portanto, no processamento biotecnológico, a utilização de compósitos magnéticos específicos para a purificação de biomoléculas apresenta-se como solução, obtendo um processo simples, rápido, eficiente e mais acessível.

4. Assim, há um crescente estudo e desenvolvimento para obtenção de partículas magnéticas, com intuito de solucionar essa problemática. Entretanto, os suportes magnéticos existentes e utilizados não atendem à demanda de aplicação em escala industrial, a grande maioria dos suportes desenvolvidos são voltados para aplicação laboratorial, contribuindo para a permanência do elevado preço destes materiais.

5. Diante desta problemática, a presente invenção propõe um método de purificação enzimática específico, eficiente, simples e rápido utilizando compósito magnético de azocoll reutilizável.

6. Diversas patentes apresentam diferentes métodos de purificação para biomoléculas ou para colagenase em específico. A patente US 9 738 883 B2, intitulada “Process for the production and purification of the collagenase enzyme from *Vibrio alginolyticus*”, de 22/08/2017, descreve um método de produção e purificação de colagenase utilizando um sistema com diversas etapas de diálises, cromatografias e filtrações, assim como a patente de número US 7 956 167 B2, intitulada “Purification of collagenase from *Clostridium histolyticum* liquid culture”, de 07/06/2011, descreve um método para purificar colagenase tipo I e II de *Clostridium histolyticum* a partir de uma mistura complexa, utilizando etapas prévias de precipitação, e cromatografia de interação hidrofóbica.

7. Os documentos anteriores diferem da presente invenção que possui apenas uma etapa de purificação expondo o extrato contendo colagenase ao compósito magnético de azocoll, obtendo uma enzima pura e sensível para posterior aplicação.

8. Lima *et al.* (2013) purificou colagenase de *Penicillium aurantiogriseum* URM4622 utilizando o sistema de duas fases aquoso, onde a técnica consiste em duas fases líquidas, uma rica em um polímero, e a outra fase aquosa é rica em outro polímero incompatível

(ou um sal) com a colagenase. O documento de número WO 1994/004666 A1, intitulado “Methods for the purification of collagenase”, de 03/03/1994, apresenta um método para a purificação de colagenase providos da cultura de *Clostridium histolyticum* utilizando carvão, onde teoricamente a purificação é realizada a partir do contato do filtrado com o carvão vegetal, e posteriormente, separa-se quaisquer impurezas utilizando centrifugação e diálise. Já a patente de número US 5 332 503 A, intitulado “Process for purifying collagenase”, de 26/07/1994, descreve um processo para purificação de colagenase com várias etapas e técnicas como diálise, centrifugação e colunas cromatográficas, resultando em um produto final de elevado custo. Entretanto, ambos os métodos não são específicos para purificação de colagenase, podendo purificar diversas biomoléculas presentes no extrato, diferentemente da proposta apresentada por esta invenção.

9. Processos utilizando partículas magnéticas vêm sendo descritos para separação de diversos materiais como, por exemplo, a patente de número PI 0302329-0 B1, intitulada “Nanomaterial superparamagnético e processo para obtenção”, de 18/09/2012, que descreve um processo para a fabricação de um nanomaterial superparamagnético, onde seu núcleo é composto de magnetita, revestido pelo polímero organossilano, ligada a um agente extrator responsável por remover do meio ambiente, poluentes metálicos tóxicos, sendo aplicável para o tratamento de efluentes industriais e radioativos. O documento de número PI 0314530-1 A2, intitulado “Nanopartículas magnéticas e método de fabricação”, de 27/07/2005, descreve o processo de fabricação de nanopartículas magnéticas a base de ferritina ou cobalto/platina com ferritina, com a necessidade de etapa de filtração após sua síntese. Já a patente de número BR 10 2013 026583 7 A2, intitulada “Micropartículas magnéticas de sílica porosa e processo de síntese”, de 28/07/2015,

descreve uma invenção baseada na produção de micropartículas magnéticas de sílica porosa, contendo em seu interior uma alta concentração de nanopartículas magnéticas, sendo usadas para purificar bioprodutos, produtos químicos, enzimas ou tratamento de efluentes.

10. A partícula magnética apresentada por esta invenção não possui um revestimento, é sintetizada diretamente ao seu agente extrator (ligante) e sem etapas de filtração, podendo ser reutilizada para outras purificações tornando seu processo de uso e/ou obtenção menos oneroso, simples e rápido, sendo específico para a purificação de colagenase, diferindo a presente invenção dos documentos descritos anteriormente.

11. No campo da Biologia Molecular, Química e Medicina de Diagnóstico, as micro e nanopartículas magnéticas são usadas para purificação de soluções por possuírem propriedades magnéticas somente na presença de um campo magnético, podendo ser facilmente separados de outras soluções, eliminando etapas como filtração ou centrifugação utilizada nos processos convencionais.

12. Assim, foram desenvolvidos e descritos diversos métodos alternativos para a purificação de biomoléculas utilizando partícula magnética como alternativa para reduzir custos e o tempo operacional.

13. A patente de número US 5 076 950 A, intitulada “Magnetic composition for particle separation”, de 31/12/1991, descreve um método de separação combinando meio líquido contendo a substância de interesse com a partícula magnética, na qual se origina uma ligação química não elucidada pela invenção. Depois disso, o meio é submetido a um gradiente de campo magnético para separar as partículas do meio. O método da invenção tem aplicação particular à separação de células e microrganismos de suspensões aquosas.

14. Como o documento anterior, esta patente de número US 8 377 311, intitulado “Selective materials separation using modified magnetic

particle”, de 19/02/2013, apresenta um método com diferentes tipos de revestimento de acordo com a molécula alvo para purificação, não especificando classes biológicas. Assim como Maciel *et al.* (2016) apresentaram em seu artigo uma nanopartícula magnética revestida com polianilina para estabilizar e imobilizar tripsina apenas ativando o revestimento com glutaraldeído. Nestas citações, a afinidade se dá entre o revestimento da partícula magnética com a proteína alvo a ser separado, diferente da presente invenção que não necessita de etapas de revestimento e ativação para purificar a biomolécula alvo, utilizando um ligante específico para purificar a enzima.

15. A patente brasileira de número BR 10 2013 027182 9 A2, intitulada “Processo de imobilização de substrato enzimático em partículas magnéticas e sua utilização na purificação, isolamento, extração e/ou separação de enzimas”, de 25/08/2015, descreve um método de produção de partículas magnéticas revestidas, ativadas e ligadas a um substrato enzimático para a purificação de enzimas de um extrato bruto. Este método difere da presente invenção, uma vez que o compósito magnético de azocoll apresenta um processo de síntese simples de apenas 24h e um elevado grau de especificidade para purificação de colagenase.

16. Similar a esta invenção, os autores Alves *et al.* (2017) sintetizaram um compósito magnético de magnetita e azocaseína, substrato de caseína conjugado a um azocorante utilizado para dosar proteases em geral. Este compósito foi utilizado com sucesso para purificar tripsina de vísceras de peixe, obtendo uma enzima 61,5 vezes mais pura com apenas uma etapa, expondo o extrato bruto ao compósito magnético. Os autores também conseguiram purificar a tripsina 43,5 vezes utilizando a partícula revestida com polianilina, com a azocaseína ligada covalentemente ao núcleo magnético.

→ Descrição da invenção

17. A presente invenção descreve um novo caminho para a purificação da colagenase utilizando compósito de partículas magnéticas de azocoll. Este método mostrou um potencial específico para o isolamento enzimático, mais fácil de operar, de baixo custo e mais eficiente que os métodos tradicionais comparados aos já existentes, obtendo melhor estabilidade, podendo ser reutilizado, aplicado para purificar uma enzima complexa como a colagenase que pode ser amplamente usada na indústria farmacêutica e médica estimulando a regeneração do tecido epitelial danificado por queimaduras, assim como também no tratamento de osteoartrite e miomas uterinos.

18. O método consiste em etapas simples para purificação de colagenase: (A) síntese do compósito magnético de azocoll, (B) inclusão do compósito magnético de azocoll no extrato contendo colagenase, (C) formação do complexo azocoll-colagenase presentes na amostra utilizada, (D) aplicação de um campo magnético para colher e separar as partículas com enzima complexada do restante do extrato, (E) lavagens para a eliminação dos demais componentes presentes do extrato, (F) eluição da colagenase isolada, (G) lavagem do compósito e preparo para reutilização.

19. As partículas magnéticas possuem em um núcleo magnético composto por cristais de metal, liga metálica ou óxido metálico, podendo conter uma estrutura com um ou mais metais que sejam magnéticos como o ferro, cobre, cobalto, níquel, zinco, entre outros. Algumas partículas magnéticas possuem características únicas que são obtidas de acordo com a morfologia e tamanho da partícula. É o caso da magnetita, óxido de ferro geralmente formado pelo método de co-precipitação de cloreto ferroso e cloreto férrico em meio alcalino. São

interessantes porque possuem propriedades magnéticas, elétricas e físico-químicas únicas, tornando-os partículas interessantes para aplicação biotecnológica nas áreas da nanociência e nanotecnologia.

20. Comumente, as partículas magnéticas são revestidas com um material polimérico que auxilia na sua funcionalidade e pode facilitar na adsorção de um ligante. Quando esse núcleo magnético possui mais de um componente em sua estrutura, chamamos de compósito magnético, composto por um núcleo magnético e um ligante responsável pela purificação da biomolécula alvo. A presente invenção possui um método de síntese direta com os dois componentes, sem a necessidade de etapas para revestimento e ativação, apresentando um compósito heterogêneo capaz de purificar colagenase.

21. O procedimento para a síntese do compósito de azocoll utiliza basicamente uma mistura aquosa de 1-50 mL de cloreto férrico na concentração entre 1-2 M e 1-50 mL de cloreto ferroso a 0,1-0,9 M, adicionados a um béquer juntamente com uma solução de Azocoll preparada em 1-10mL de tampão, preferencialmente Tris-HCl pH entre 7-9 na concentração de 0,01-0,1 M. Em seguida, adiciona-se à solução um agente precipitador, preferencialmente hidróxido de amônio a 20-40%. A mistura é aquecida entre 40-80°C, preferencialmente a 50°C e agitada por 30-40 minutos. Este material é exposto a um campo magnético externo, revelando as propriedades magnéticas do compósito de azocoll produzido, lavado exaustivamente preferencialmente com água destilada, seco em estufa a 50°C. Por fim, o compósito é macerado, peneirado em um tamiz e armazenado à temperatura ambiente para uso posterior.

22. As condições aplicadas no processo de síntese do compósito de azocoll como a faixa de temperatura utilizada e a natureza do agente precipitador classificam estas partículas magnéticas como nanopartículas de acordo com Cabreira *et al.* (2019) e Maciel *et al.*

(2016). As nanopartículas de óxido de ferro apresentam características que favorecem sua aplicação em processos biotecnológicos quando comparada com outras partículas magnéticas, por não possuir toxicidade, maior superfície de interação/adsorção, melhor estabilidade da biomolécula alvo imobilizada, o superparamagnetismo (resposta magnética observada apenas após a aplicação do campo magnético) podendo ser recuperada pelo uso de um ímã, e um método de síntese efetivo, são algumas das vantagens do uso de nanopartículas.

23. Outros tipos de ligantes podem ser utilizados na formação do composto magnético. A especificidade do ligante é essencial para a purificação de proteínas por afinidade magnética. Um ligante ideal deve ter alta estabilidade, boa capacidade de ligação a proteína alvo e baixo custo. Como exemplo, Alves *et al.* (2017) usou uma caseína conjugada a um azocorante como ligante para purificar tripsina, podendo purificar proteases em geral por não ser específico. A presente invenção se assemelha quanto a escolha do ligante, entretanto o azocoll é um colágeno conjugado a um azocorante possuindo afinidade apenas a proteínas com atividade colagenolítica.

24. Posteriormente ao processo de síntese de partícula, é iniciada a purificação de colagenase. Inicialmente o extrato utilizado foi o de víscera (intestino e fígado de peixe) de tilápia. Diversos extratos podem ser utilizados, de origem microbiológica, planta ou animal.

Primeiramente o composto magnético de azocoll foi pesado e utilizado entre 0,01 e 0,2g, preferencialmente 0,1g. Com auxílio do campo magnético externo, o composto magnético é lavado com tampão e incubado com 1-3 mL de extrato sob agitação em câmara fria na temperatura entre 8 a 2°C, durante 1-6 horas. Teoricamente, esse processo de purificação é baseado na afinidade entre o azocoll presente no composto magnético e a colagenase. A colagenase do extrato se liga ao azocoll presente na superfície da partícula magnética e cria um

complexo de azocoll-colagenase. A ausência de liberação de cor pelo azocoll (azopeptídeos) sugere a formação do complexo com colagenase, porém não a hidrólise do substrato.

25. Após este tempo, as partículas foram recolhidas com um campo magnético externo e lavadas exaustivamente com tampão, preferencialmente Tris-HCl na concentração de 0,01-0,3M, com pH entre 7-9. Assim, o uso do campo magnético externo isola o compósito magnético de azocoll ligado à colagenase do extrato. Com as sucessivas lavagens são eliminados outros componentes presentes no extrato. Posteriormente, é adicionado o cloreto de sódio na concentração de 1-5M, de duas a quatro vezes. A aplicação de uma força iônica (NaCl) interromperia o complexo azocoll-colagenase, liberando a colagenase solúvel purificada e o compósito magnético de azocoll insolúvel estaria pronto para ser reutilizado.

26. Para testar a reutilização do compósito magnético de azocoll, o processo de purificação acima descrito pode ser repetido de 2-4 vezes, incubado com a mesma partícula magnética sem perdas na qualidade da purificação.

27. A presente invenção poderá ser compreendida melhor da sua funcionalidade e eficiência quando observado os desenhos e exemplos.

28. A Figura 1 representa as partes componentes de um compósito magnético. O núcleo magnético composto por qualquer liga metálica, no caso dessa invenção, seria de óxido de ferro que possui atividade magnética responsável pela atração do compósito magnético ao campo magnético externo (A). A representação do compósito magnético de azocoll uma vez que sua síntese direta resulta na formação de um núcleo magnético com a presença de azocoll em sua superfície (B). O compósito magnético já em contato com os diversos componentes do extrato, onde o azocoll presente no compósito magnético está atraindo

apenas a colagenase (C), onde finalmente se liga ao compósito magnético formando o complexo azocoll-colagenase (D).

29. A Figura 2 representa as etapas do processo de purificação e/ou separação da colagenase do extrato através do uso do compósito magnético de azocoll. O extrato aquoso está disposto em um recipiente (A) no qual se adiciona o compósito magnético de azocoll (B). A colagenase presente no extrato se atrai pelo azocoll presente no compósito magnético e forma o complexo azocoll-colagenase (C). O compósito magnético com o complexo azocoll-colagenase é atraído e separado do restante do extrato por um campo magnético externo (D). Assim o extrato é removido do recipiente, as partículas são lavadas exaustivamente para a eliminação de qualquer outro componente que talvez tenha permanecido no compósito magnético (E) e então se adiciona uma força iônica para a interrupção do complexo azocoll-colagenase (F). O compósito magnético de azocoll é coletado pelo campo magnético externo novamente (G) resultando na solução final contendo a colagenase purificada/separada (H).

30. A Figura 3 representa um organograma da sequência das etapas de purificação. O compósito magnético de azocoll (A) é exposto ao extrato (B), levando a colagenase presente no extrato se atrair pelo azocoll no compósito magnético (C) levando a formação do complexo azocoll-colagenase (D). Posteriormente são realizadas lavagens para a eliminação dos componentes restantes não fixados ao compósito magnético (E) e em seguida a eluição rompendo a ligação entre o complexo azocoll-colagenase (F) obtendo o produto final da colagenase purificada (G) e o compósito magnético de azocoll pronto para o reuso (H). A colagenase purificada é submetida à SDS-PAGE (I) para determinação do peso molecular da enzima e grau de pureza, assim como também é realizado as dosagens da atividade colagenolítica e de

proteínas totais (J) para obtenção dos cálculos de eficiência da purificação, rendimento e atividade específica da enzima.

31. Esta partícula criada possui diversas vantagens, dentre elas, síntese rápida, eficiência de purificação, processo de purificação mais rápido, baixo custo quando comparadas a partículas magnéticas comercializadas e sem um ligante específico.

→ **Exemplo 1 - Purificação da collagenase**

32. A purificação de collagenase utilizando extrato de vísceras de tilápia foi testada com o compósito magnético de azocoll. Para testar a eficiência e especificidade do ligante azocoll, foi testado também um compósito magnético sintetizado da mesma forma com um ligante diferente, azocaseína que possui afinidade com proteases em geral, diferente do azocoll que possui afinidade apenas com collagenases. Os resultados comprovaram que o compósito magnético de azocoll apresentou melhor desempenho quando comparado ao compósito magnético de azocaseína para purificação de collagenase. Como controle, o mesmo processo de purificação foi repetido utilizando partícula magnética ausente de ligante, apresentando uma purificação de 1,14 vezes. Esses resultados afirmam a teoria de afinidade entre o azocoll e a enzima collagenase.

33. Para demonstrar a importância deste método desenvolvido nesta invenção, comparamos com algumas publicações contendo diferentes métodos de purificação de collagenase. Nosso método adquiriu um rendimento de 33,1% com uma collagenase 16,6 vezes mais pura com apenas uma etapa.

34. Park *et al.* (2002) apresentou uma purificação de collagenase com extrato de cavala (*Scomber japonicus*) aplicando cinco etapas obtendo uma enzima 39,5 vezes mais pura com o rendimento de 0,1% apenas.

A presente invenção purifica com apenas uma etapa, apresentando elevados rendimentos, acima de 30%. Daboor *et al.* (2012) apresentou uma colagenase purificada 15,7 vezes com o rendimento de 22,7% utilizando três etapas incluindo coluna cromatográfica de Sephadex G-100. Com duas etapas de purificação, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia DEAE-Sephadex A-50, os autores Barhaki *et al.* (2012) purificou 26,3 vezes a colagenase com rendimento de 2,6%. Os resultados apresentados por Aissaoui *et al.* (2017) foram ainda menores com um rendimento de 6,69% e uma purificação de 4,89 vezes usando precipitação com sulfato de amônio, gel de filtração e troca iônica.

35. Comparados à nossa invenção, podemos observar as vantagens de usar uma partícula magnética para purificar enzimas. Além de remover etapas como filtração e centrifugação presentes nos processos tradicionais, a purificação pode ser feita facilmente em uma única etapa, expondo o extrato em contato direto com as partículas. O uso de membranas cromatográficas pode ser dispendioso e laborioso, apresentando em alguns casos resultados inferiores quando comparado à presente invenção.

→ Exemplo 2 - Dosagem de atividade colagenolítica

36. Atividade colagenolítica foi determinada de acordo com a metodologia de Adiguzel *et al.* (2009) seguindo algumas modificações de Oliveira *et al.* (2017) usando azocoll como substrato. As amostras são lidas utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Uma unidade de enzima é determinada como a quantidade necessária de enzima para aumentar o valor numérico da absorbância em 0,01 em um minuto de acordo com as condições experimentais. A purificação utilizando o compósito magnético de azocoll elevou a atividade específica da colagenase, apresentando 306,7 U/mg de atividade. O

compósito magnético de azocaseína também purificou colagenase apresentando atividade específica de 176,0 U/mg.

→ **Exemplo 3 - Dosagem de proteínas totais**

37. A determinação de proteínas totais foi realizada utilizando o procedimento descrito por Bradford *et al.* (1976), onde foi realizada uma diluição seriada de albumina bovina em concentrações de 10-200 ug para determinação da curva padrão, e lidas espectrofotometricamente no comprimento de onda de 580 nm. Com a utilização da equação da reta pode-se estimar a quantidade de proteínas totais solúveis na solução em miligrama.

→ **Exemplo 4 - Eficiência da reutilização do compósito magnético de azocoll**

38. Para comprovar a reutilização do compósito magnético de azocoll, foram repetidas quatro vezes a purificação de colagenase utilizando a mesma preparação do compósito, demonstrando que o compósito pode ser reutilizado sem grandes modificações no resultado final. Após a quarta reutilização, o compósito magnético de azocoll continuou a purificar a colagenase do extrato com uma pequena diminuição expressa em termos de rendimento ou de purificação, de 33% para 31% e de 15,9 para 14,9 vezes respectivamente. O compósito magnético de azocoll após as reutilizações foi lavado, seco e pesado apresentando ausência de perdas de partícula, comprovando que a redução na atividade específica da colagenase não foi devida à perda de partículas magnéticas durante o processo de purificação. Estes resultados reafirmam o reuso do compósito magnético de azocoll já que não houve perda estatisticamente relevante.

→ **Exemplo 5 - Eletroforese comprovando a pureza da colagenase obtida pela purificação com compósito magnético de azocoll**

39. As colagenases têm uma ampla gama de pesos moleculares relatados por muitos trabalhos. Também pode ser encontrado variações de 30 a 150 kDa. As colagenases que não possuem uma estrutura única podem apresentar vários pesos moleculares. Outros pesquisadores relataram colagenases com pesos moleculares <60 kDa de organismos marinhos como Park *et al.* (2002) onde relataram um peso molecular de colagenase de 14,8 kDa de cavala.

40. A eletroforese foi realizada de acordo com o protocolo de Laemmli (1970). A enzima purificada pelo compósito magnético de azocoll foi evidenciada em SDS-PAGE, apresentando apenas uma banda de proteína na amostra purificada quando comparada a amostra padrão e do extrato, com peso molecular de cerca de 30 kDa. Aissaoui *et al.* (2017) relatam em seu trabalho uma protease purificada com uma única banda no SDS-PAGE correspondente a um peso molecular estimado em 24 kDa do peixe *Scorpaenannotata*. Daboor *et al.* (2012) apresentam uma enzima colagenase recuperada de resíduos de processamento de peixe (arinca, arenque, peixe moído, linguado) com um peso molecular de duas subunidades com uma de 50 kDa e outra de 10 kDa.

41. Legenda da Figura 1: Representações do núcleo magnético (A), compósito magnético de azocoll (B), colagenase do extrato atraindo-se por azocoll presente no compósito magnético (C) e complexo azocoll-colagenase formado (D).

42. Legenda da Figura 2: Passo a passo do processo de purificação e/ou separação de colagenase utilizando compósito magnético de azocoll.

43. Legenda da Figura 3: Representação do processo de purificação e/ou separação da colagenase, reuso do compósito

magnético de azocoll e determinações posteriores da colagenase purificada.

→ **Patentes citadas**

44. Patente de número US 9 738 883 B2, intitulado “Process for the production and purification of the collagenase enzyme from *Vibrio alginolyticus*”, de 22/08/2017.

45. Patente de número US 7 956 167 B2, intitulado “Purification of collagenase from *Clostridium histolyticum* liquid culture”, de 07/06/2011.

46. Patente de número WO 1994/004666 A1, intitulado “Methods for the purification of collagenase”, de 03/03/1994.

47. Patente de número US 5 332 503 A, intitulado “Process for purifying collagenase”, de 26/07/1994.

48. Patente de número PI 0302329-0 B1, intitulado “Nanomaterial superparamagnético e processo para obtenção”, de 18/09/2012.

49. Patente de número PI 0314530-1 A2, intitulado “Nanopartículas magnéticas e método de fabricação”, de 27/07/2005.

50. Patente de número BR 10 2013 026583 7 A2, intitulado “Micropartículas magnéticas de sílica porosa e processo de síntese”, de 28/07/2015.

51. Patente de número US 5 076 950 A, intitulado “Magnetic composition for particle separation”, de 31/12/1991.

52. Patente de número US 8 377 311, intitulado “Selective materials separation using modified magnetic particle”, de 19/02/2013.

53. Patente de número BR 10 2013 027182 9 A2, intitulada “Processo de imobilização de substrato enzimático em partículas magnéticas e sua utilização na purificação, isolamento, extração e/ou separação de enzimas”, de 25/08/2015.

→ Artigos citados

54. C. A. Lima, A. C. V. F. Júnior, J. L. L. Filho, A. Convertti, D. A. V. Marques, M. G. C. Cunha, A. L. F. Porto. **Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: application to collagen hydrolysis.**

Biochemical Engineering Journal, 75:64-71, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.012>

55. J. C. Maciel, D. Mercês, W. T. Shigeyosi, S. D. Souza, M. Olzon-Dionysio, *et al.* **Magnetic nanoparticles coated with polyaniline to stabilize immobilized trypsin.** *Hyperfine Interactions*, 237:3, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10751-016-1264-y>

56. M. H. M. E. Alves, G. A. Nascimento, M. P. Cabrera, S. I. C. Silvério, C. Nobre, J. A. Teixeira, L. B. C. Júnior. **Trypsin purification using magnetic particles of azocasein-iron composite.** *Food Chemistry*, 226:75-78, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.094>

57. M. P. Cabrera, D. F. M. Neri, F. Soria, L. B. C. Júnior. **Magnetic bio-derivatives: preparation and their uses in Biotechnology.** *Applied Surface Science*, 2019.

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85748>

58. J. P. Park, S. H. Lee, H. G. Byun, S. H. Kim, S. K. Kim. **Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicas*.** *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35:576-582, 2002. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2002.35.6.576>

59. S. M. Daboor, S. M. Budge, A. E. Ghaly, M. S. Brook, D. Dave. **Isolation and activation of collagenase from fish processing waste.** *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3:191-209, 2012.

<http://doi.org/10.4236/abb.2012.33028>

60. A. Baehaki, M. T. Suhartono, D. Syah, A. B. Sitanggang, S. Setyahadi, F. Meinhardt. **Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4.** *African Journal of Microbiology Research*, 6(10):2373-2379, 2012.
<https://doi.org/10.5897/AJMR11.1379>
61. N. Aissaoui, M. N. M. Marzouki, F. Abidi. **Purification and biochemical characterization of a novel intestinal protease from *Scorpaenannotata*.** *International Journal of Food Properties*, 20(2):2151-2165, 2017.
<https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1368550>
62. A. C. Adigüzel, B. O. Bitlisli, I. Yasa, N. T. Eriksen. **Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic and keratinolytic proteases in peptide limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool.** *Journal of Applied Microbiology*, 107:226-234, 2009.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04200.x>
63. V. M. Oliveira, C. R. D. Assis, P. N. Herculano, M. T. H. Cavalcanti, R. S. Bezerra, A. L. F. Porto. **Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification, characterization and collagen specificity test for industrial application.** *Boletim do Instituto de Pesca*, 43:52-64, 2017. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n1p52>
64. M. M. Bradford. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72(1):248-254, 1976.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
65. U. K. Laemmli. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227:680-685, 1970.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, **caracterizado por** sintetizar o compósito magnético de azocoll compreendendo as seguintes etapas: solubilização dos componentes do compósito magnético de azocoll; precipitação dos componentes do compósito magnético de azocoll; aquecimento do compósito magnético de azocoll; lavagem do compósito magnético; secagem do compósito magnético.
- 2) Compósito magnético de azocoll, obtido pelo processo de síntese definido na Reivindicação 1, **caracterizado por** conter qualquer metal ou material magnético.
- 3) Uso do compósito magnético de azocoll na purificação e/ou separação de colagenase, **caracterizado por** purificar colagenase utilizando o compósito magnético de azocoll compreendendo as seguintes etapas: incubação do compósito magnético com o extrato contendo colagenase; recolhimento do compósito magnético por campo magnético; lavagem com tampão e eluição com cloreto de sódio; aproveitamento do compósito magnético de azocoll para reutilização; obtenção da colagenase purificada.
- 4) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** solubilizar os componentes do compósito magnético de azocoll utilizando qualquer solvente.
- 5) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** precipitar os componentes do compósito magnético de azocoll utilizando qualquer agente precipitador.
- 6) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** aquecer o compósito

magnético de azocoll utilizando qualquer fonte que forneça o calor necessário.

7) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** lavar o compósito magnético de azocoll utilizando qualquer solução de lavagem.

8) Processo de síntese do compósito magnético de azocoll, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** secar o compósito magnético de azocoll utilizando qualquer dispositivo que evapore a água.

9) Uso do compósito magnético de azocoll na purificação e/ou separação de colagenase, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado por** purificar colagenase de qualquer fonte, microbiológica, animal ou vegetal.

10) Uso do compósito magnético de azocoll na purificação e/ou separação de colagenase, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado por** lavar o compósito magnético de azocoll com qualquer solução ou tampão de pH condizente ao de atividade enzimática.

11) Uso do compósito magnético de azocoll na purificação e/ou separação de colagenase, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado por** submeter o compósito magnético de azocoll a uma força iônica independente da substância para a liberação do complexo ligante-enzima.

12) Uso do compósito magnético de azocoll na purificação e/ou separação de colagenase, de acordo com a Reivindicação 3, **caracterizado por** permitir a reutilização do compósito magnético de azocoll sem perdas na purificação.

FIGURAS

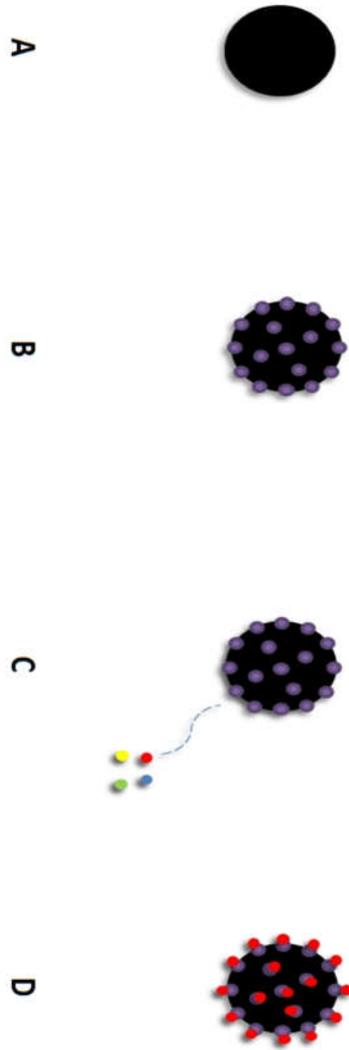


Figura 1

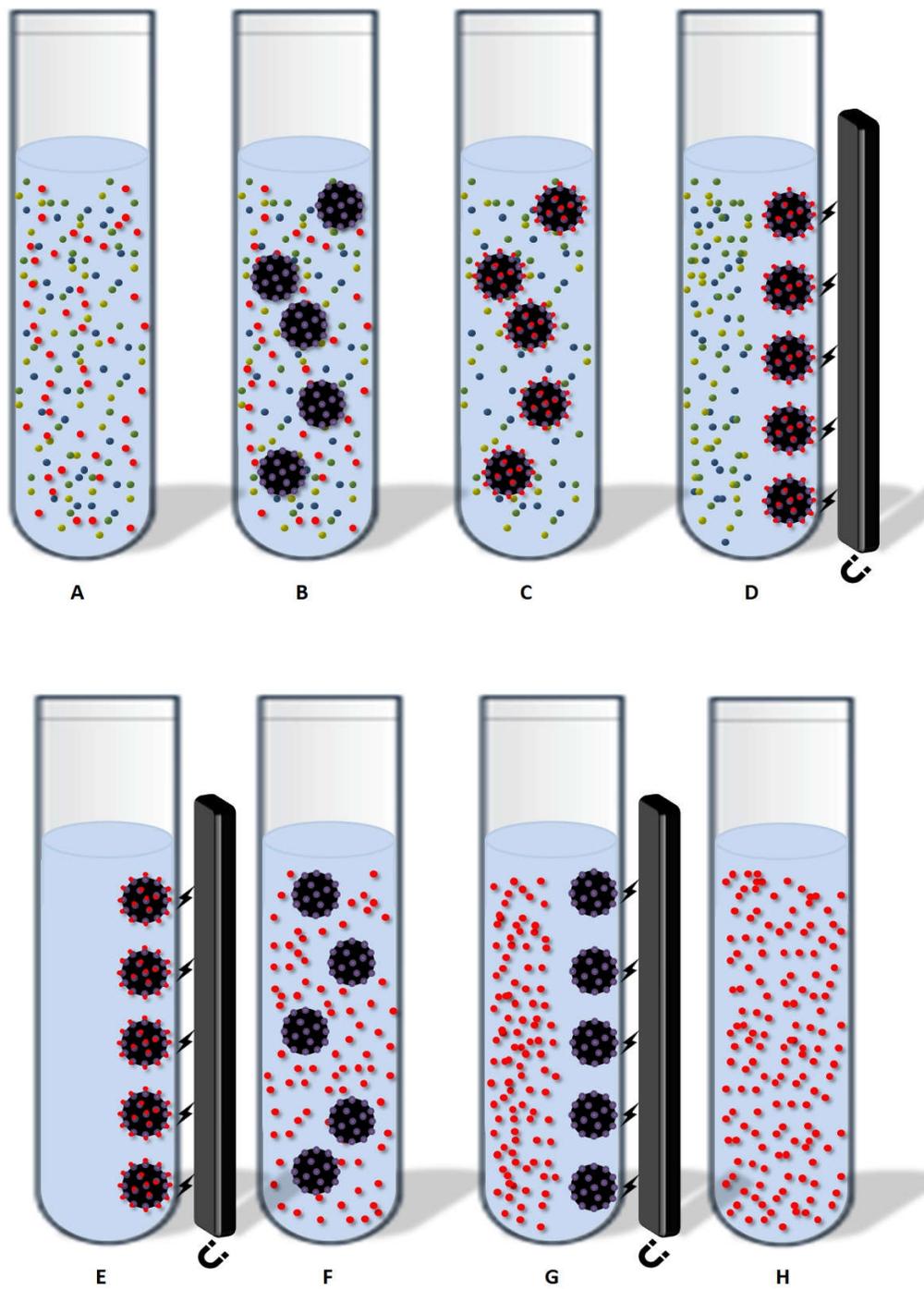


Figura 2

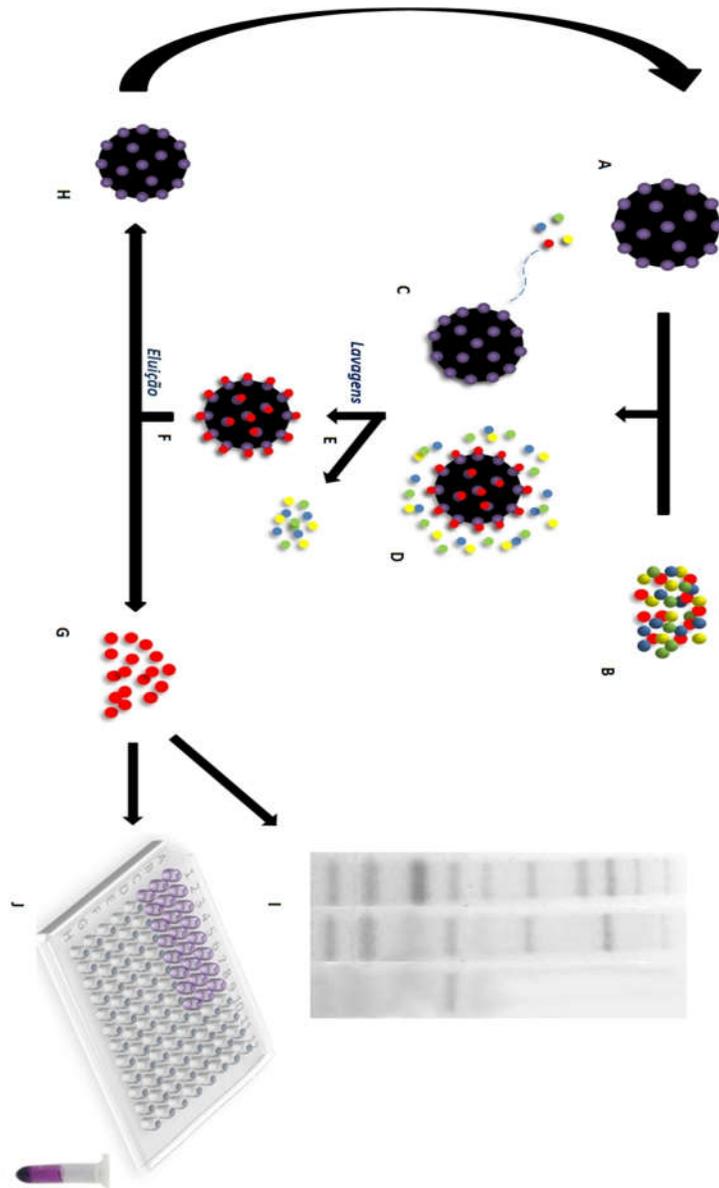


Figura 3

RESUMO**PROCESSO DE SÍNTESE DE COMPÓSITO MAGNÉTICO E SEU USO NA
PURIFICAÇÃO E/OU SEPARAÇÃO DE COLAGENASE**

Biomoléculas de interesse industrial necessitam passar por processos de concentração e purificação para serem comercializadas e/ou aplicadas para fins terapêuticos, processos que demandam várias etapas, tempo, elevado custo e especificação, resultando no desenvolvimento de métodos inovadores com intuito de solucionar essa problemática. A presente patente de invenção descreve um novo método para a purificação de colagenase utilizando compósito magnético de azocoll, sintetizado com cloretos férricos e azocoll, com um núcleo magnético de atividade superparamagnético, e um ligante específico para a colagenase, apresentando eficiente desempenho na purificação e/ou separação da enzima, alta especificidade, de simples utilização e síntese, baixo custo, podendo purificar colagenase diretamente do extrato de diferentes origens, sem a necessidade de etapas prévias ou posteriores, podendo ainda ser reutilizado em processos seguintes de purificação.