



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102012027122-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102012027122-2

(22) Data do Depósito: 23/10/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 10/03/2015

(51) Classificação Internacional: A61K 36/88; A61K 38/48; A61K 125/00.

(54) Título: PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BROMELINA, BROMELINA PURIFICADA E USOS DE ENZIMA PURIFICADA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO -UFES. CGC/CPF: 32479123000143. Endereço: Av. Fernando Ferrari, 514, Vitória, ES, BRASIL(BR), 29075-910; INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL -INCAPER. CGC/CPF: 27273416000130. Endereço: Rua Afonso Sarlo 160, Bento Ferreira, Vitória, ES, BRASIL(BR), 29052-010

(72) Inventor: HELBER BARCELLOS DA COSTA; JOSÉ AIRES VENTURA; PATRICIA MACHADO BUENO FERNANDES.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 23/10/2012, observadas as condições legais. Patente concedida conforme ADI 5.529/DF, que determina a alteração do prazo de concessão.

Expedida em: 24/12/2024

Assinado digitalmente por:

Alexandre Dantas Rodrigues

Diretor de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

RELATÓRIO DESCRITIVO

"PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DE BROMELINA, BROMELINA PURIFICADA E USOS DA ENZIMA PURIFICADA"

Campo da invenção

[001] A modalidade de invenção proposta trata de um processo de purificação de enzima proteolítica, a enzima purificada e seus usos. É proposto um método para a purificação da enzima em questão, mais especificamente a bromelina, a partir de produtos orgânicos, em especial resíduos agrícolas do abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus*). O extrato vegetal é filtrado e centrifugado, obtendo-se um sobrenadante, que é aplicado em uma coluna de troca iônica. As frações obtidas são submetidas a colunas de exclusão, obtendo-se a protease purificada, com baixo custo e aproveitamento de resíduos. O processo proposto permite a manutenção da atividade biológica da bromelina, permitindo a esta uma vasta aplicação biotecnológica, de interesse para indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e de bebidas.

Fundamentos da invenção

[002] O processo de separação e purificação de bioprodutos é um segmento muito importante na indústria biotecnológica, representando 80 a 90 % do custo de produção. Desta forma, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias fáceis e viáveis de purificação de proteínas, apresentando-se como pré-requisito essencial para muitos dos avanços na biotecnologia (Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, W.S., 1988. **Elution chromatography**. In: Belter, P.A., Cussler, E.L., Hu, w.s. (Eds.), **Bioseparation, Downstream Processing for Biotechnology**. Wiley-Interscience Publication, Wiley, New York, pp. 209-213). Como alternativas de metodologias de interesse para a purificação de moléculas orgânicas de forma economicamente viável e ambientalmente sustentável, é importante se destacar a utilização de fontes renováveis.

[003] A bromelina é um grupo de enzimas proteolíticas pertencentes à família das cisteíno-peptidases. Atualmente, quase toda bromelina utilizada no Brasil é importada, sendo requisitado pelo mercado um produto com grau de pureza adequado. Seu amplo uso aumenta a importância e a necessidade de estudos de processos viáveis de extração e purificação dessa enzima.

[004] As enzimas proteolíticas ou proteases representam uma classe de enzimas hidrolíticas com capacidade de clivar ligações peptídicas de cadeias proteicas, sendo fundamental em processos compreendem as fisiológicos, além enzimas de maior disso, as proteases relevância do ponto de vista industrial, pois estão envolvidas em diversas aplicações tecnológicas **(BON, E. P. S. ; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. Enzimas em biotecnologia. Produção Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.)**.

[005] A bromelina é uma enzima proteolítica de alto valor agregado e interesse biotecnológico que apresenta uma infinidade de aplicações para indústria farmacêutica, além de uso em procedimentos de medicina veterinária e no tratamento de neoplasias em animais.

[006] A enzima, utilizada que tem largamente ampla aplicação biotecnológica, é pelas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica, com muitas aplicações clínicas, tais como, agente antitumoral, modulação da resposta imune, aumento do efeito de antibióticos, ação mucolítica, digestiva, além de ter ação em doenças cardiovasculares e circulatórias, podendo ser utilizada em procedimentos cirúrgicos e tratamento de feridas.

[007] Apesar do seu emprego para diversos usos, sua produção ainda atende uma pequena porção do mercado, o que a torna um produto de alto valor comercial, porém de grande interesse econômico devido à abrangência de sua atividade proteolítica **(PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; PIZA, P. L. B. T. Atividade da enzima bromelina em plantas de Abacaxi (Ananas comosus L. Merrill) , sob condições de**

salinidade "in vitro". Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 68-74, 2002.).

[008] A bromelina pode ser encontrada em diversos tecidos de plantas da família Bromeliaceae e, sendo o abacaxizeiro (*Ananas comosus*) a sua principal fonte.

[009] O Brasil está entre os maiores produtores de abacaxi no mundo, fruto este que tem muita qualidade para atender o mercado interno e externo.

[010] A partir da cultura do abacaxizeiro muitos resíduos agrícolas são gerados (caule, folhas, mudas, coroa e cascas da fruta), e foi comprovado que esses resíduos apresentam altos teores de bromelina. Ainda, já é conhecido pelo estado da técnica que a vantagem da utilização da bromelina em relação às outras enzimas de mesma família de outras fruteiras está relacionada aos altos teores encontrados dessa enzima, justamente nos resíduos agrícolas da cultura do abacaxizeiro.

[011] Assim, a extração da bromelina a partir de resíduos orgânicos pode indicar uma alternativa para minimizar as perdas do agronegócio do abacaxi, uma vez que, os resíduos agrícolas e industriais (caule, folhas, mudas e coroas) são ricos nessa enzima. Desta forma, há aqui uma importante alternativa para agregação de valor ao agronegócio do abacaxi. Normalmente, esse resíduo não é aproveitado e não tem um destino apropriado, passando a ser utilizado para a obtenção de um produto de alto valor agregado, que poderá ser disponibilizado ao mercado por preços mais baixos. Essa acessibilidade ocorreria devido, não só à questão de sua matéria-prima ser barata ou mesmo "de graça", mas também pelo desenvolvimento de metodologias mais eficientes e econômicas do ponto de vista financeiro.

[012] Muitas técnicas têm sido utilizadas para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana. Técnicas mais antigas como a precipitação, extração com solventes e filtração geralmente tem alto poder de concentração e baixa purificação, e técnicas mais modernas, como a cromatografia de

afinidade, troca iônica, gel-filtração, eletroforese, extração em duas fases aquosas, extração com micela reversa, campânulas pulsantes, membranas planas, recuperam e purificam, muitas vezes até a homogeneidade (**CESAR, A. C. W. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Campinas, 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, 2005).**

[013] A cromatografia líquida (LC) é uma técnica comumente utilizada para purificação de proteínas. Na cromatografia líquida, as proteínas em solução (fase móvel) são separadas e purificadas ao interagirem com a fase estacionária (**Cao, L. Protein Separation with Ion-exchange Membrana Chromatography. Worroester Polyteohnio Institute, 2005).** Geralmente, os produtos obtidos na purificação por LC são muito onerosos e com alto valor agregado devido aos custos dos materiais utilizados no processo de obtenção. Tornando-se assim um desafio o desenvolvimento de metodologias LC de purificação de baixo custo.

[014] A literatura patentária trata da purificação da enzima através de diferentes processos.

[015] o pedido de patente **BRPI9501187-0** propõe a "Preparação de enzima purificada, método para digerir tecido desvitalizado de mamífero e método para isolar uma preparação de enzima substancialmente purificada de um caule de Bromelina". A invenção apresenta enzima nova capaz de realizar o debridamento de tecido desvitalizado. O extrato protéico de caule de bromelina tem peso molecular em torno de 17 a 22 mil dáltons. A patente propõe métodos para extrair e usar a enzima, com uma série de diferenças na metodologia apresentada na **BRPI9501187-0** e a metodologia proposta pelo presente documento. A purificação da proteína é realizada a partir de um preparado enzimático de bromelina do caule, da Sigma (um produto já disponível no mercado), enquanto o presente documento propõe a obtenção a partir do resíduo do caule do abacaxizeiro. Assim, convém destacar que **BRPI9501187-0** utiliza como matéria-prima um produto comercial previamente purificado, e com alto valor agregado. Tal utilização onera o produto obtido. Em contraposição, o presente documento propõe

a utilização de material a baixo custo ou a custo zero, que seria dispensado, para obtenção da bromelina de alto rendimento.

[016] Ainda, são propostos dois tipos de cromatografia a ser utilizado para **BRPI9501187-0**, MONO - S e G-50, enquanto o presente documento utiliza carboximetilcelulose e G-50. Outro aspecto é peso molecular da proteína obtida por **BRPI9501187-0** que está entre 17 e 21 KDa, enquanto para a enzima obtida no presente pedido está próximo a 30KDa. Entretanto, quando comparado ao processo e produto propostos no presente documento, o documento **BRPI9501187-0** apresenta elevado custo de produção, além de fazer uso de acetona, reduzindo a atividade final da bromelina obtida. Adicionalmente, além das desvantagens já elencadas, o rendimento do processo proposto por **BRPI9501187-0** é de apenas 39%, enquanto o processo proposto no presente documento apresenta rendimento de 89%.

[017] Ainda, no estado da técnica é proposto um método para a purificação de bromelina por uma cromatografia nano-titânio em coluna de dióxido de cerâmica porosa, pertencente ao domínio técnico de separação e purificação da enzima, principalmente resolver os problemas de purificação e preservação atividade enzimática da bromelina. O documento **CN101709294** revela a técnica, que compreende os seguintes passos de: enchimento fabricação de de cerâmica uma cromatografia em coluna de porosa por uma tecnologia de sinterização utilizando cerâmica, purificando a bromelina através da adoção de uma tecnologia de cromatografia de coluna, preservando maximamente a atividade enzimática através de ultrafiltração e liofilização para se obter um produto acabado com a bromelina com a quantidade de unidades de atividade atingindo 6 milhões. Apesar de se utilizar da cromatografia, a técnica descrita no documento **CN101709294** apresenta elevado custo para produção da bromelina. As cromatografias utilizadas também se apresentam diferentes das utilizadas no processo proposto no presente documento.

[018] No documento **GB1178217** é proposto um processo para a produção de materiais enzimáticos contendo bromelina do caule por precipitação a partir de plantas trituradas da família Bromeliaceae, submetendo a amostra a uma resina de permuta iônica, com um ou mais cátions selecionados a partir de câmbio NH₄⁺, Na⁺ e K⁺. Os cátions são substituídos, aumentando a atividade enzimática específica do

material precipitado. A metodologia proposta no documento **GB1178217** trata a amostra com acetona gelada, e o uso desse solvente diminui a atividade proteolítica da enzima, reduzindo, desta forma, a atividade final da bromelina obtida.

[019] A patente **US6335427** refere-se a uma nova proteína, que é um componente de bromelina do caule e é um agente anticancerígeno, um imunoestimulante e possui atividade antimicrobiana. A proteína pode ser isolada a partir de bromelina do caule por métodos tais como HPLC e tem um peso molecular de cerca de 25,08 kDa e um ponto isoelétrico de cerca de 3,8 ou 3,85. A bromelina purificada nessa patente é obtida por cromatografia de troca iônica, porém, a resina é diferente (SP) e não a CMC, e o HPLC utilizado é uma metodologia de elevado custo.

[020] No documento **US2011/0027259** a invenção refere-se a um componente de bromelina que é largamente responsável pela capacidade da bromelina em interromper a cascata da quinase MAP. O componente contém ananaina e comosaina e é útil no tratamento ou prevenção condições mediadas pela ativação das doenças células e T ou por ativação da via MAP cinase. A técnica utilizando o HPLC apresenta-se de elevado custo, evidenciando uma grande desvantagem da metodologia proposta por **US2011/0027259**.

[021] A invenção proposta no documento **US2009/0148429** refere-se a uma composição debridante obtida a partir de bromelina e aos métodos de produção da refere-se partir mesma. Particularmente, a a uma composição debridante obtida invenção a de bromelina compreendendo enzimas proteolíticas com pesos moleculares de cerca de 23 kDa, sendo essencialmente desprovida de inibidores de bromelina, e a composições farmacêuticas que compreendem a mesma. As composições debridantes e as composições farmacêuticas que compreendem a mesma são particularmente úteis em debridamento de tecidos escara e na cicatrização de feridas. O documento **US2009/0148429** obtém uma proteína de 23 KDa, e não utiliza cromatografia para purificação, apenas precipitação salina, filtração e centrifugação, diferentemente do processo proposto pelo presente documento. Convém citar utiliza-se como matéria-prima, um produto previamente "purificado", caro e, conseqüentemente, responsável por onerar ainda mais o produto obtido. Já o processo proposto no presente documento

utiliza material a baixo custo ou custo zero, que seria dispensado, para obter a bromelina de alto rendimento.

[022] Já a patente **US4286064** compreende um processo para isolar uma mistura de enzimas úteis no tratamento de tecido desvitalizado. O processo compreende os passos de: (1) suspensão de bromelina bruta em um tampão fracamente básico, de preferência tampão de borato de sódio, (2) separação dos sólidos não dissolvidos a partir da solução, e (3) remoção de pequenas moléculas tendo um peso molecular de 10. 000 ou menos a partir da solução. O processo difere do processo proposto no presente documento, pois obtém uma isoforma de bromelina a partir da bromelina comercial.

[023] Desta forma, a modalidade da invenção descrita neste documento apresenta vantagens consideráveis frente ao estado da técnica.

[024] A principal vantagem da técnica proposta na presente modalidade de invenção, frente ao estado da técnica, está nos tipos de resinas de cromatografia que são aplicadas nesse processo, que preservam elevados os valores da atividade proteolítica da bromelina, além de se apresentar como um processo de baixo custo.

[025] O processo proposto, em um primeiro momento, utiliza-se de resina de carboximetilcelulose. A carboximetilcelulose é uma resina de troca iônica carregada negativamente, é um método de fracionamento baseado na fixação de substâncias a um suporte que contém uma carga oposta. É importante salientar que existem resinas desse tipo já disponíveis ao mercado com preços acessíveis, a depender da malha utilizada.

[026] A segunda resina utilizada é a sephadex G-50. A sephadex (dextrana) G-50, utiliza como princípio a separação por peso molecular. Algumas metodologias de purificação da bromelina são conhecidas utilizando-se a resina sephadex G- 100, que apresenta preço muito mais elevado que a G-50.

[027] A utilização das resinas de cromatografia de troca iônica e de exclusão garantem maior eficiência e economia ao processo de purificação da bromelina. É importante destacar que, utilizando-se esse tipo de coluna cromatográfica, o custo da obtenção da bromelina já seria reduzido pela metade, quando comparado às demais metodologias existentes.

[028] Assim, permite-se pelo processo proposto, um custo de produção em relação ao rendimento e qualidade (principalmente relação pureza) do produto, adequados para atendimento das exigências do mercado para o produto final. Por meio do processo descrito, estima-se que a partir de 1 kg de resíduo do abacaxi, é possível se obter aproximadamente 270 mg de bromelina pré purificada e 80 mg de purificada, apresentando um rendimento de cerca de 8%.

[029] Nesse aspecto deve-se observar que rendimento não é só calculado em termo de produtividade, mas também em termos de atividade proteolítica, que, para a bromelina purificada foi de 89%, tratando-se de uma atividade elevada quando comparada às metodologias descritas no estado da técnica. Portanto, a bromelina purificada pelo processo proposto no presente documento apresenta atividade proteolítica de 89% (389, 02 U/mg), superior a bromelina obtida a partir dos processos de purificação atuais e disponíveis no mercado **(HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, C.; MARQUEZ, M.; BÁEZ, R.; MORRIS, H.; SANTOS, R. CHÁVEZ, M. A. Obtención de preparados enzimáticos a partir de tallos de Pina (Ananas comosus) com potencialidades de uso em la biotecnologia y la medicina. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Cuba, v.3. n. especial., 2005 - 1.36 U/mg; Bromelina Sigma - 2 a 10 U /mg; DEVAKATE, R. V. ; PATIL, V. V. ; WAJE, S . S . ; THORAT, B.N. Purification and drying of bromelain. Separation and Purification Technology. India, v.64 , p. 259-264, 2009 -136,5 U/mg).**

[030] A pureza da bromelina pode ser quantificada através dos valores de atividade proteolítica da mesma, sendo assim, o processo descrito no presente documento propõe a obtenção de bromelina com altos valores de atividade proteolítica. Além da atividade proteolítica, através da espectrometria de massas, confirmou-se que o produto obtido pelo processo em questão apresentava homologia de 100% com a enzima bromelina, salientando ainda mais as vantagens do processo proposto no presente documento, como um processo com elevado rendimento de enzima, sendo esta pura. Assim, o produto obtido através do processo de purificação proposto pode ser utilizado em indústrias que necessitam de um produto com alto grau de pureza (alta atividade proteolítica).

[031] É de fundamental importância se destacar que o processo proposto permitiu a obtenção de bromelina com maiores valores de atividade proteolítica (89 %), quando

comparado a processos descritos no estado da técnica. Trata-se de um resultado importante, pois praticamente todo o seu uso biotecnológico está baseado na atividade proteolítica dessa enzima e a dificuldade na obtenção da bromelina está na purificação mantendo os valores de atividade proteolítica elevados.

[032] A bromelina obtida através do processo proposto pode ter utilização em todos os setores nos quais a bromelina já é utilizada (farmacêutico, cosmético, bebidas e alimentos). A mesma pode ser utilizada em sua forma pura ou em formulações, como por exemplo, composições.

[033] Em um dos farmacêutica, por exemplo, mercados mais promissores, a bromelina purificada pode na produção de medicamentos na indústria ser utilizada, como princípio ativo que auxilia na digestão; terapêutica de cardiopatias; artrite reumatóide; traumas cirúrgicos; edemas; sinusites; terapias contra carcinomas; administração concomitantemente com antibióticos **(PIZA, I. M. '1'; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; PIZA, P. L. B. '1'. Atividade da enzima bromelina em plantas de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), sob condições de salinidade "in vitro". Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 68-74, 2002)**; aplicada na digestão de vermes, como por exemplo, *Ascaris* e *Trichuris*; desbridamento de feridas, nas queimaduras principalmente nas de 3º grau; minimizar as dores menstruais **(FREIMAN, L. O.; SABAA, A. U. O. Determinação de proteína total e escore de aminoácidos de bromelinas extraídas dos resíduos do abacaxizeiro (*Ananas comosus*). (L.) Merrill. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas. v.19, n.2, p.170-173, 1999)**; usada como solução para preparação de suspensão de hemácias para tipagem sanguínea **(CESAR, A. C. W. Análise de Viabilidade Econômica de um Processo de Extração e Purificação da Bromelina do Abacaxi. Campinas, 2005. 111 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, 2005).**

[034] Além disso, a bromelina purificada pelo processo aqui descrito pode assumir também posição na indústria de alimentos no que diz respeito à produção de amaciantes de carnes, de queijos, no preparo de alimentos infantis e dietéticos **(SARTORELLO, M.**

C. Estudo do processo de extração da bromelina em sistema descontínuo água, polietilenoglicol e polissacarídeo da goma do cajueiro. Campinas, 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, 2004), de biscoitos a partir de farinha de trigo com alto teor protéico, produção de ovos desidratados, leite de soja isolado; no tratamento de couros e produção de detergentes (PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G.; PIZA, P. L. B. T. Atividade da enzima bromelina em plantas de Abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), sob condições de salinidade "in vitro". Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 68-74, 2002).

[035] Além das vantagens produtivas, o processo proposto e o produto obtido apresentam-se como ecologicamente corretos, já que pode utilizar resíduos agrícolas que antes não teriam utilização produtiva, como os resíduos das plantações de abacaxi, que ainda são descartados sem destinação adequada no meio ambiente. Isso acrescenta valor ambiental ao processo, que pode ser caracterizado como uma tecnologia limpa, além de permitir economia de recursos financeiros, já que utiliza como matéria prima produtos de baixo valor agregado.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[036] A presente invenção apresenta processo de purificação de bromelina caracterizado por compreender as etapas de obtenção do extrato bruto, filtração e centrifugação, cromatografia molecular. O de troca iônica, cromatografia de exclusão processo proposto pode apresentar-se simplificado, eliminando etapas em casos em que a aplicação da bromelina não requer alta pureza e é executado a uma temperatura de 0 a 15°C, preferencialmente de 0 a 4°C. Ainda, o processo utiliza materiais vegetais, preferencialmente resíduos agroindustriais, mais preferencialmente resíduos agroindustriais do abacaxizeiro obtendo bromelina com altos valores de atividade proteolítica. A invenção trata ainda da bromelina purificada, com atividade proteolítica elevada, e da utilização da bromelina obtida nos setores farmacêutico, cosmético, bebidas e alimentos, em sua forma pura ou em formulações, preferencialmente composições.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[037] A invenção, podem ser, juntamente com vantagens adicionais da mesma, mais bem explanadas e compreendidas mediante referência às figuras em anexo e a seguinte descrição:

- A **Figura 1** anexa apresenta um fluxograma simplificado das principais etapas do processo proposto.
- A **Figura 2** anexa apresenta o Cromatograma do Extrato Bruto eluído em coluna de CM-Celulose com tampão de AcNa 1 M.
- A **Figura 3** anexa apresenta o Gel SDS-PAGE a 15% da fração de maior atividade do extrato bruto (FEB), submetido à eluição em coluna de CMC com AcNa 1 M (M- Marcador de peso molecular, 1- FEB).
- A **Figura 4** anexa apresenta o Cromatograma obtido em HPLC da fração de maior valor de atividade proteolítica em coluna C18. Utilizando um gradiente de 0 -80% água-acetoni trila fluxo 0,5 ml/min por 80 min.
- A **Figura 5** anexa apresenta o Cromatograma do extrato bruto em coluna de Sephadex G-50 com tampão de AcNa 1 M após corrida em CM-Celulose.
- A **Figura 6** anexa apresenta o Gel SDS-PAGE a 15% da Fração com maior atividade proteolítica coletada na coluna de Sephadex G-50 (M - Marcador de Peso Molecular, 1 - Fração).
- A **Figura 7** anexa apresenta o Cromatograma obtido em HPLC da bromelina em coluna C18. Utilizando um gradiente de 0 -80% água-acetonitrila fluxo 0,5 ml/min por 80 min.
- A **Figura 8** anexa apresenta o *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) da bromelina fornecido pelo MS MALDI-TOF-TOF.
- A **Figura 9** anexa apresenta o Espectro do peptídeo de relação m/z 951.
- A **Figura 10** anexa apresenta o Espectro do peptídeo de relação m/z 1584.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[038] O processo, produto e usos descritos na presente invenção podem ser mais bem detalhados e compreendidos mediante referência às figuras presentes neste pedido e a seguinte descrição:

[039] Como demonstrado na **Figura 1**, para o processo de extração da bromelina a partir de material vegetal são pesados de 100 a 500 gramas, preferencialmente 450 g, do material vegetal, preferencialmente da família das bromeliáceas, mais preferencialmente o caule do abacaxizeiro. O caule é triturado por 3 - 10 minutos juntamente com 200 - 1000 ml solução de extração (H_2SO_4 a uma concentração de 0,1 mol/L a 1 mol/L e Na_2SO_4 de 0,1 a 2 mM em pH 1,3 - 5,5). Em seguida, o extrato é filtrado. Todo o procedimento é executado a uma temperatura de 0 a 15°C. Após filtração o extrato é centrifugado a 14.750 x g, por 20 minutos. Assim, recolhe-se o sobrenadante e realizam-se as etapas posteriores.

[040] Na cromatografia de troca iônica, as resinas trocadoras de cátions, preferencialmente carboximetilcelulose, são inicialmente equilibradas com tampão acetato 0,005 a 0,05 M pH 2 - 6. Após equilíbrio, a amostra é aplicada deixando-a em contato com a resina por 1 hora. A amostra é então eluída com um fluxo de 0,5 a 1,0 mL/min, com tampão acetato de sódio 0,2 - 1 M pH 3 - 5,5. As frações são coletadas com volumes entre 3 mL e 15 mL. A presença das proteínas durante a cromatografia é monitorada pela leitura espectrofotométrica a 280 nm, utilizando o tampão acetato como branco.

[041] Para a cromatografia de filtração em gel foi utilizada resina Sephadex G-50 fina. A resina é empacotada na coluna, que é equilibrada com tampão acetato 0,005 a 0,05 M, pH 2 - 6. Um volume da amostra de proteína é aplicado e deixado em contato com a resina por 30 min a 2 horas. A amostra é então eluída com tampão acetato 0,2 - 1 M pH 3 - 5,5. O fluxo de eluição é de 0,5 a 1,0 mL/min, coletando-se o eluente conforme anteriormente descrito.

[042] A modalidade da invenção descrita no presente documento tem por objetivo a purificação da bromelina a partir de produtos orgânicos, podendo estes produtos serem resíduos agroindustriais. Desta forma, a bromelina obtida através do processo proposto pode ser utilizada isolada ou em composição com outros produtos, em diversos setores industriais, como alimentício, cosmético e farmacêutico.

[043] O processo proposto acima pode apresentar-se simplificado, eliminando etapas em casos em que a aplicação do produto obtido, a bromelina, não requer alta pureza.

Assim, a depender da aplicação dada à bromelina obtida, em qual tipo de indústria será utilizada, os custos podem ser reduzidos ainda mais.

[044] O método de purificação da bromelaína utilizando carboximetilcelulose foi capaz de purificar o composto aproximadamente 3,01 vezes o nível do extrato bruto, e a coluna Sephadex® purificou o composto aproximadamente 16,86 vezes

[045] Assim, as modalidades da invenção descritas no presente documento apresentam-se como um avanço no estado da técnica já que, permitem a purificação de bromelina de maneira eficiente e economicamente viável. Desta forma, o processo industrial da purificação da bromelina poderá ter resultados melhorados, de forma ambientalmente sustentável, gerando um produto adequado para aplicação em diversos setores industriais.

Exemplos

[046] As avaliações da bromelina obtida utilizando o processo proposto demonstraram a obtenção de um produto adequado, puro e de atividade preservada. Os resultados obtidos estão representados nas tabelas e figuras indicadas.

EXEMPLO 1 - Avaliação de diferentes soluções de extração

[047] Extratos protéicos foram obtidos, em cinco diferentes soluções de extração: Solução ácido sulfúrico/sulfato de sódio pH 4,5, tampão acetato pH 3,6, tampão acetato pH 4,0, 10 tampão acetato pH 5,0 e tampão fosfato pH 7,0.

[048] Os valores de atividade específica das enzimas proteolíticas foram maiores nos extratos obtidos com tampões acetato pH 5 (28,81 U/mg) e ácido sulfúrico/sulfato de sódio (32,08 U/mg) (**Tabela 2**).

[049] **Tabela 1 - Valores de proteínas totais, atividades proteolíticas e específica dos extratos proteicos obtidos em diferentes tampões de extração**

Soluções de extração	Proteínas Totais (mg/mL)	Atividade Proteolítica (U/mL)	Atividade Específica (U/mg)
H2S04/ Na2S04	1,17	37,54	32,08
Acetato pH 3,6	0,458	9,71	21,20
Acetato pH 4,0	1,13	15,56	13,76
Acetato pH 5,0	0,48	13,83	28,81
Fosfato pH 7	0,878	17,19	19,57

[050] O extrato obtido com a solução extratora ácido sulfúrico/sulfato de sódio 1-6, preferencialmente pH 4,5, foi o que apresentou maior rendimento de extração de proteínas totais, além de maior atividade proteolítica. Mais ainda, o extrato obtido através desta solução também resultou em proteínas com o maior valor de atividade específica para enzimas proteolíticas.

EXEMPLO 2 - Confirmação da obtenção de proteína pré-purificada

[051] A coluna de troca iônica como etapa única de purificação da bromelina, foi viável. A proteína aumentou em 3,01 vezes a pureza em relação ao extrato bruto. Deve-se, no entanto, levar em consideração a utilização da bromelina purificada, caso não tenha necessidade de um alto grau de pureza essa metodologia foi viável.

[052] Com a simplificação do processo de obtenção da bromelina, se partirmos de 75 g de matéria orgânica, obtém-se, após a primeira etapa de purificação (CMC), 10 a 50 mg, preferencialmente 20 g, de proteína pré-purificada e que, após processo completo, gera 3 a 20 mg, preferencialmente 6 mg, de proteína pura.

[053] A pré-purificação apresenta-se como um processo econômico e que permite a obtenção da bromelina, o que pode ser evidenciado pelos resultados apresentados a seguir.

[054] A cromatografia por CMC do extrato, utilizando o tampão AcNa, 0,1 a 1 M, preferencialmente 1 M, pH 1 a 6, pode ser analisada como suficiente na purificação de bromelina, pois o perfil (Figura 2) da proteína (quadrado aberto) se superpõe perfeitamente ao de atividade proteolítica (quadrado fechado).

[055] Entretanto, quando a fração que apresentou maior atividade proteolítica foi corrida no SDS-PAGE a 15 % (**Figura 3**), observa-se uma dupla banda no gel, quase que imperceptível.

[056] Este resultado, com a obtenção de duas bandas na eletroforese foi corroborado quando a fração foi eluída no HPLC que pode ser observado no respectivo cromatograma, com a obtenção de dois picos (Figura 4), possivelmente referente às duas proteínas que são eluídas em diferentes tempos de retenção. O Pico 1, referente à possível proteína aniônica contaminante e o pico 2, referente à bromelina.

EXEMPLO 3 - Confirmação da obtenção de proteína purificada

[057] Para a completa purificação da bromelina foi realizada a cromatografia por exclusão molecular, utilizando a coluna de Sephadex G-50. As frações obtidas na CMC foram coletadas e juntadas, aplicadas na coluna, sendo então eluída com AcNa 01 - IM, preferencialmente 1 M. Foram coletadas 50 frações nessa coluna (**Figura 5**).

[058] Após coleta e dosagem da atividade proteolítica em todas as frações observou-se que houve uma recuperação de 89% em relação ao extrato inicial.

[059] A purificação da bromelina para este caso foi bem-sucedida, levando à forma pura, como podemos observar no perfil cromatográfico (**Figura 5**). Pode-se observar, da mesma forma, que o perfil de proteína (quadrado aberto) se superpõe perfeitamente ao de atividade proteolítica (quadrado fechado).

Adicionalmente, ficou bem evidente no gel SDS PAGE 15% que houve ainda um clareamento, evidenciando que existe apenas uma banda no gel (**Figura 6**).

[060] A fração com maior valor de atividade foi então preparada para ser aplicada ao HPLC. O cromatograma da fase reversa confirmou a presença de apenas uma proteína (Pico 1), eluída nos primeiros 10 min (**Figura 7**).

EXEMPLO 4 - Comprovação da pureza da bromelina obtida

[061] Para comprovação da pureza da bromelina obtida pelo processo proposto e eficiência do referido processo, após a eletroforese, foi realizada a espectrometria de massas da banda referente ao peso molecular da bromelina. A banda foi cortada e digerida de acordo com Shevchenko et al. (1996), com modificações.

[062] A espectrometria de massas do spot do gel da fração da cromatografia em sephadex cortado e tripsinizado forneceu um "peptide mass fingerprint" (identidade) da bromelina, o que confirmou sua pureza através da identidade da proteína (**Figura 8**).

[063] Do fingerprint o espectrômetro selecionou 10 peptídeos de maior intensidade para submeter ao seqüenciamento. Os mais efetivos para identificação foram os peptídeos da relação m/z 951 e 1584 (Figuras 9 e 10, respectivamente).

[064] O programa de buscas Mascot usou a lista de massas desses dois espectros e forneceu a sequência mais provável para os dois peptídeos (Tabela 2).

[065] Tabela 2 – Provável sequência dos dois peptídeos obtidos por espectrometria de massas

Carga do Peptídeo (m/z)	Provável Sequência ¹
951	WGEAGYIR
1584	TNGVPNSAYITGYAR

¹ Lista de abreviaturas dos aminoácidos na **Figura 7**.

[066] A análise nos três bancos de dados confirmou a pureza da bromelina, revelando uma identidade de 95 a 100 %.

[067] O NCBI analisou os dois peptídeos e identificou um FBSB precursor [Ananas comosus] de código de acesso gi2463584, com 95 a 100 % de identidade com a bromelina.

[068] Outro banco de dados analisado foi o SwissProt, que mais uma vez confirmou a pureza da bromelina, que ao blastar os dois peptideos confirmou uma identidade de 95 - 100% com bromelina, de código de acesso BROM2_ANACO.

[069] O MSDB também analisou os dois peptídeos. O peptideo de razão m/z 951 demonstrou alta similaridade com a ananaina, identificado como AN8 precursor. **Rowan, A.D., Buttle, D.J., Barrett, A.J., 1990. 'The cysteine proteinases of the pineapple plant. Biochem. J. 266, 869-875** descrevem a presença de quatro proteases principais presentes em abacaxi (Ananas comosus): bromelina do fruto, bromelina do talo, ananaina e comosaina.

[070] A ananaina apresenta 77 % de identidade na sequência de aminoácidos com a bromelina (**LEE, K.L.; ALBEE, K. L.; BERNASCONI, R. J.; EDMUNDS, 'I. Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and Other plant cysteine proteases. Journal of Biochemistry. Grã-bretanha v. 327. p. 199-202, 1997**). O presente peptídeo está na região N-Terminal da bromelina, porção esta que é idêntica as demais cisteíno-proteases, porque compõe principalmente a região do sítio catalítico (**CABRAL, H. Análise Funcional e Estrutural Comparativa com Papaína e Bromelinas. São Paulo, 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Biofísica Molecular). Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho-UNESP, 2005**).

[071] Se alinharmos apenas um fragmento das duas proteínas bromelina e ananaina observa-se que a diferença para este peptídeo está apenas em um aminoácido, a bromelina possui alanina (A) enquanto a ananaina possui o aminoácido glicina (G).

Bromelina do Caule	WGAKWGEAGYIR
Ananaina	WGAGWGEGGYIR

[072] Dessa forma, era de se esperar que, como proteases da mesma família possuem várias regiões idênticas nas sequências primárias, algum peptídeo tivesse alta

identidade com a ananaiína ou outras proteases. A provável sequência dada pelo massas do peptídeo de relação m/z 951 é da bromelina.

[073] Quando o MSDB analisa o segundo peptídeo de relação m/z 1584, é confirmado a pureza da bromelina, pois ele identifica como provável bromelina do caule, também com 95 a 100 % de identidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de purificação de bromelina caracterizado por compreender as seguintes etapas **em sequência**:

- a. Obtenção do extrato bruto;
- b. Filtração e Centrifugação;
- c. Cromatografia de troca iônica;
- d. Cromatografia de exclusão molecular;

Processo de purificação de bromelina caracterizado por utilizar material vegetal, da família das bromeliáceas, o caule do abacaxizeiro;

Processo de purificação de bromelina, caracterizado por, conforme etapa a., triturar o material vegetal com uma solução de extração, uma solução de extração contendo H_2SO_4 a uma concentração de 0,1 mol/L a 1 mol/L e Na_2SO_4 de 0,1 a 2 mM em pH 1,3 - 5,5;

Processo de purificação de bromelina, caracterizado por, conforme etapa c., o sobrenadante obtido na etapa b. ser aplicado em resinas trocadoras de cátions, carboximetilcelulose, para a cromatografia de troca iônica;

Processo de purificação de bromelina caracterizado por, conforme etapa d., ser utilizada a resina Sephadex G-50 fina para a cromatografia de filtração em gel.

2. Processo de purificação de bromelina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por utilizar material vegetal e solução de extração na proporção de 1:2 (g:mL).
3. Processo de purificação de bromelina, de acordo com reivindicação 1, caracterizado por, conforme etapa b., o extrato ser filtrado e centrifugado para a obtenção do sobrenadante.
4. Processo de purificação de bromelina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por as resinas trocadoras de cátions serem inicialmente equilibradas com tampão acetato 0,005 a 0,05 M, pH 2 – 6.
5. Processo de purificação de bromelina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a amostra ser eluída com um fluxo de 0,5 - 1 mL/min, com tampão acetato de sódio 0,2 - 1 M pH 3 - 5, 5, coletando-se amostras com volumes entre 3 mL e 15 mL.
6. Processo de purificação de bromelina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, a resina ser empacotada na coluna, que é equilibrada com tampão 25 acetato 0,005 a 0,0 5 M, pH 2 – 6.
7. Processo de purificação de bromelina, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a amostra ser 3/4 eluída com um fluxo de 0,5 a 1 mL/min, com tampão acetato de sódio 0, 2 - 1 M pH 3 - 5, 5, coletando-se amostras com volumes entre 3 mL e 15 mL.
8. Processo de purificação de bromelina, de acordo com as reivindicações de 1 a 7, caracterizado por todo o procedimento ser executado a uma temperatura de 0 a 15°C, preferencialmente de 0 a 4°C.
9. 9. Processo de purificação de bromelina, de acordo com as reivindicações de 1 a 7 caracterizado por utilizar materiais vegetais, resíduos agroindustriais, resíduos agroindustriais do abacaxizeiro.

10.10. Processo de purificação de bromelina, de acordo com as reivindicações de 1 a 9, caracterizado por compreender a obtenção de bromelina com altos valores de atividade proteolítica, preferencialmente 89%.

DESENHOS

FIG. 1

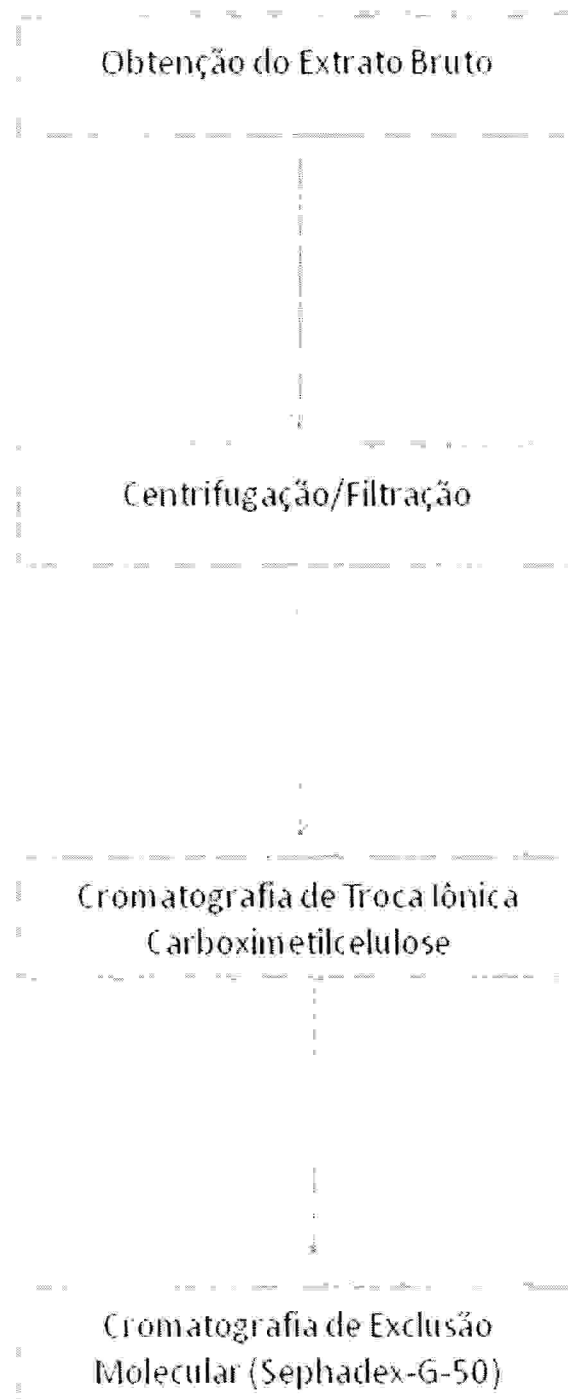


FIG. 2

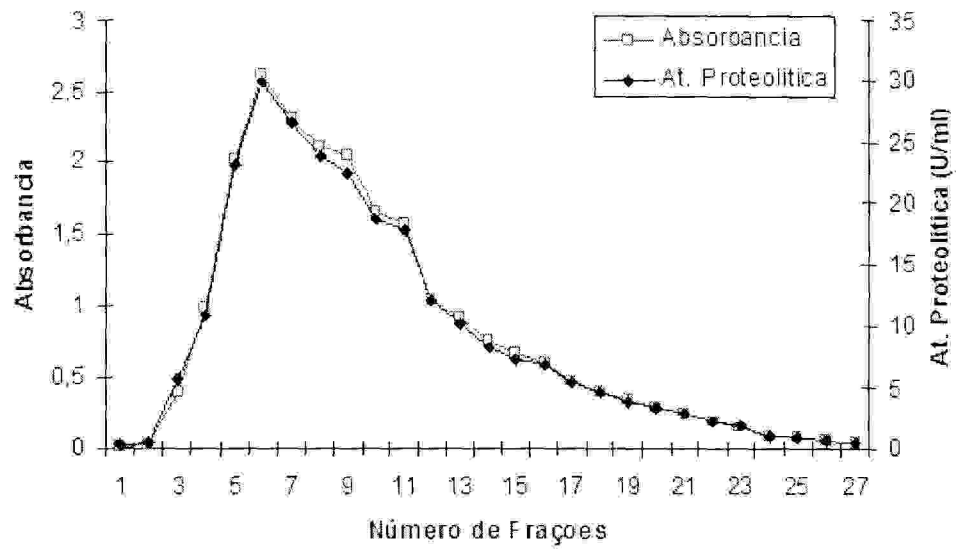


FIG. 3

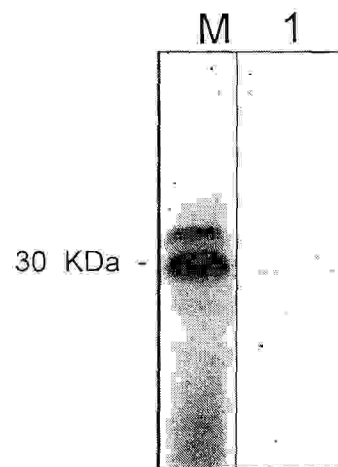


FIG. 4

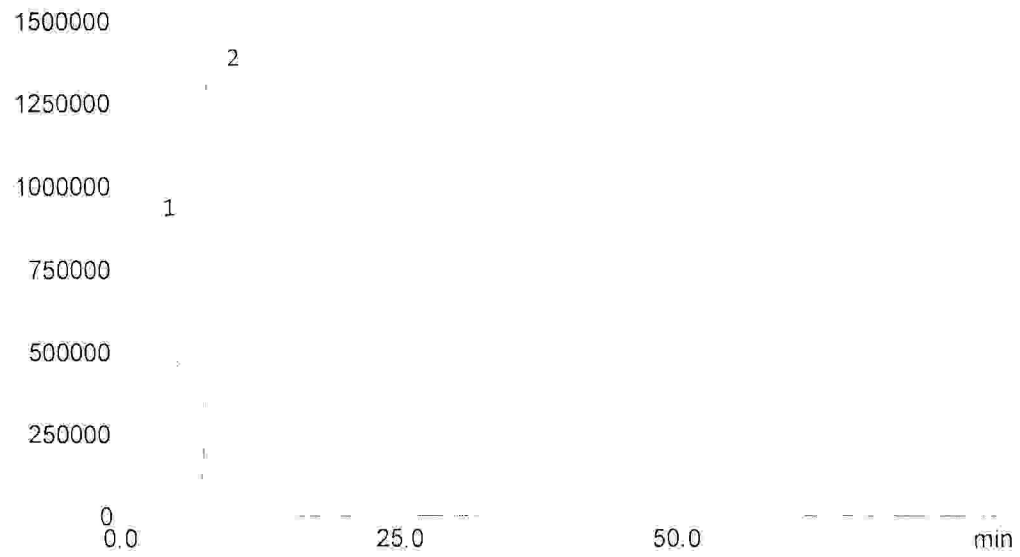


FIG. 5

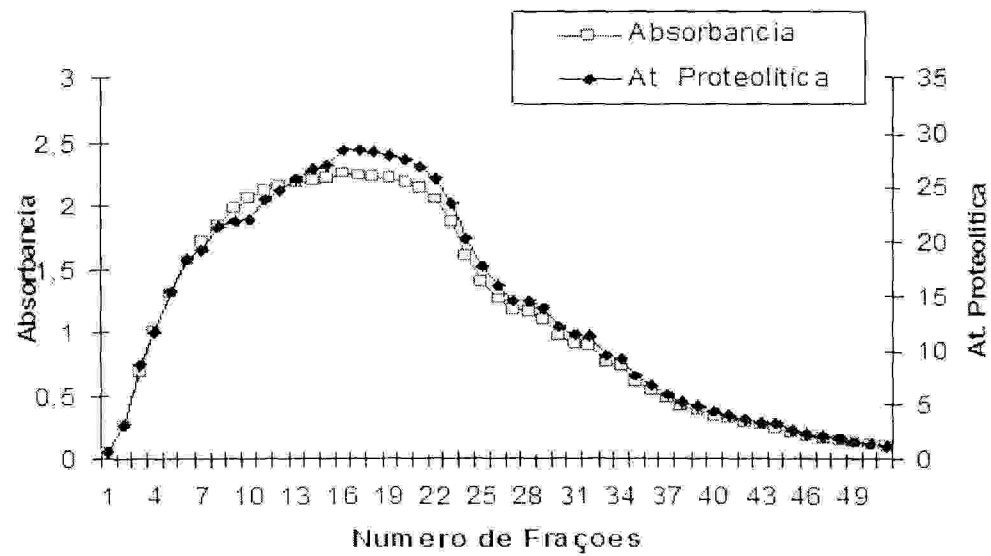


FIG. 6

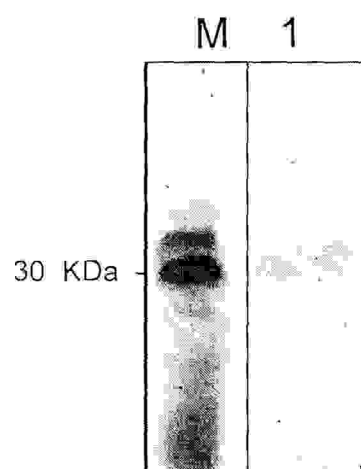


FIG. 7

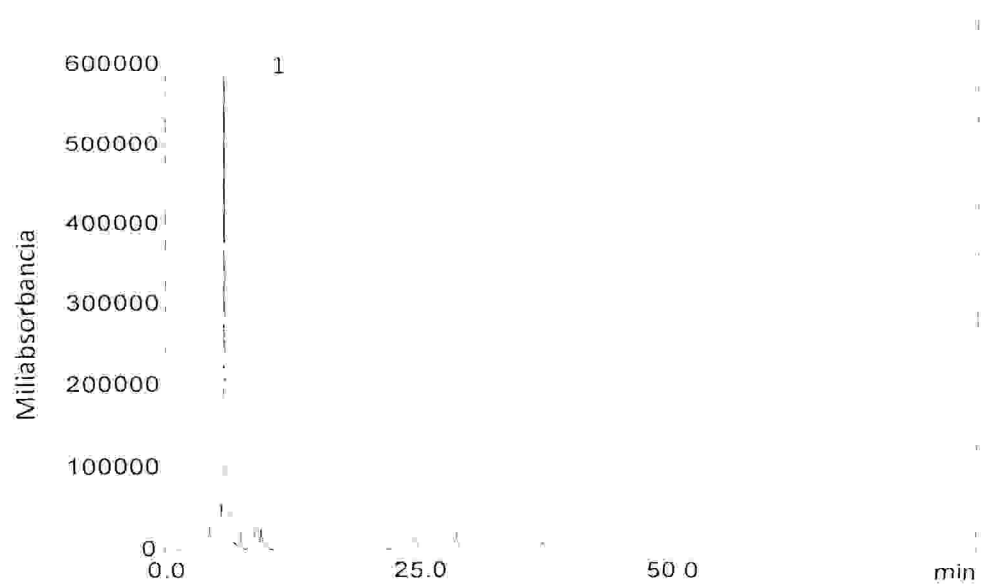


FIG. 8

4700 Reflector Spec #1 MC[BP = 951.4, 10703]

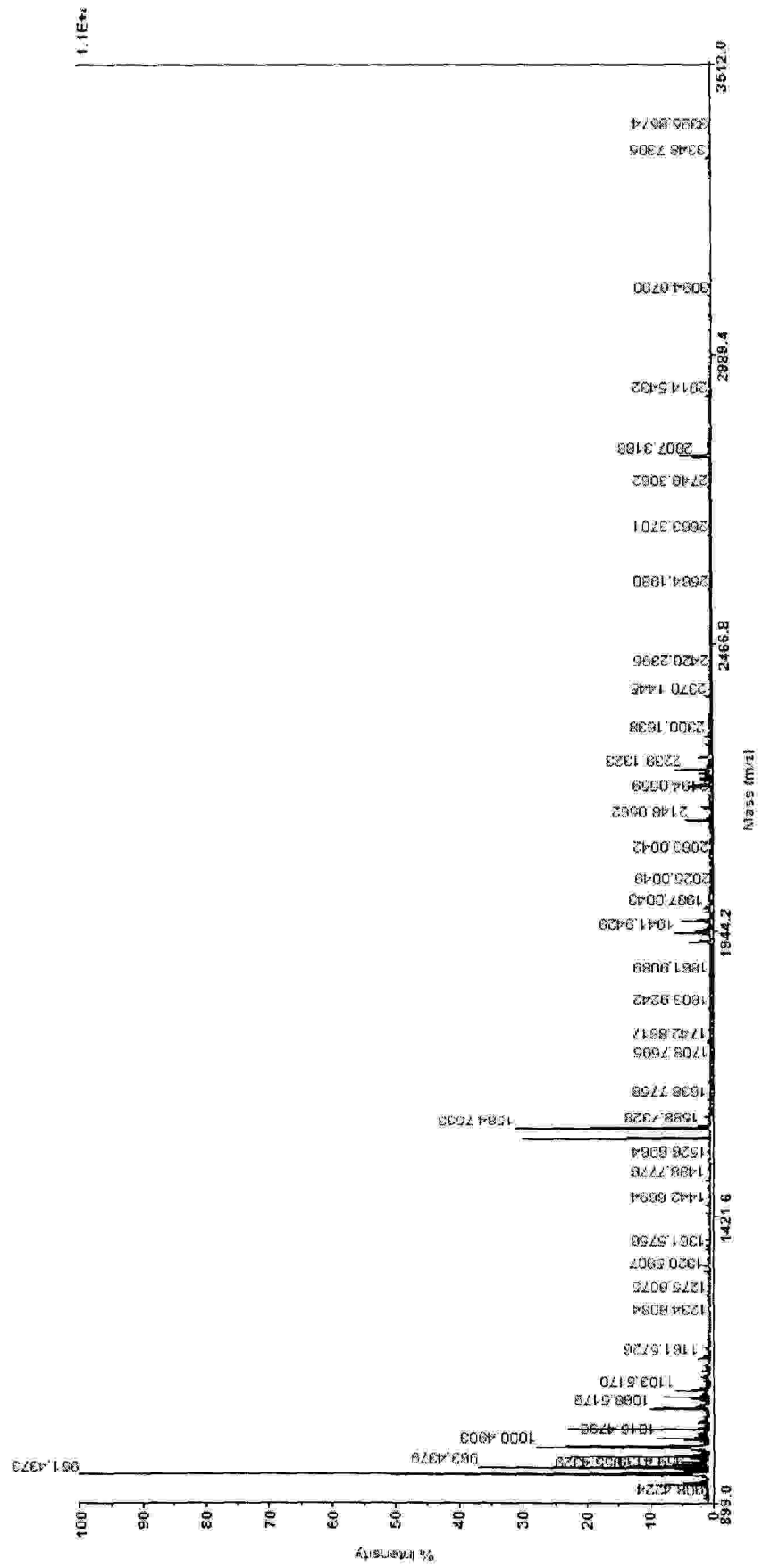


FIG. 9

4700 MS/MS Precursor 951.437 Spec #1[BP = 175.1, 2916]

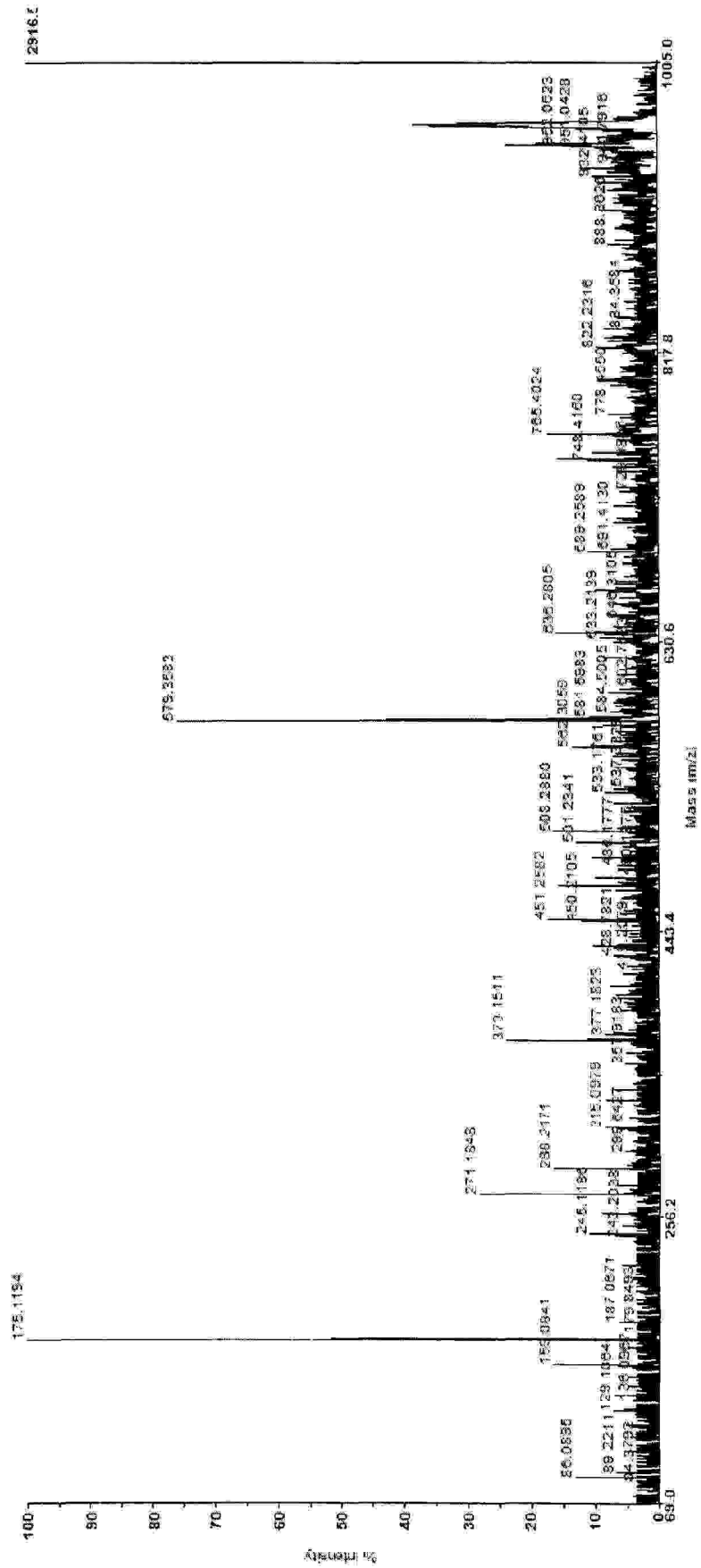


FIG. 10

4700 MS/MS Precursor: 1583.76 Spec #1 [BP = 1368.7, 3982]

