



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

CARTA PATENTE Nº BR 102017003172-1

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 102017003172-1

(22) Data do Depósito: 16/02/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 05/06/2018

(51) Classificação Internacional: C09B 61/00; C09B 23/00.

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA

(73) Titular: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 94877586000110. Endereço: AV. ITÁLIA, KM 8 - CAMPUS CARREIROS - CAIXA POSTAL 474, Rio Grande, RS, BRASIL(BR), 96203-900, Brasileira; FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA - UNIPAMPA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 09341233000122. Endereço: RUA GENERAL OSÓRIO, N.º 900, CENTRO, Bagé, RS, BRASIL(BR), 96400-590, Brasileira

(72) Inventor: SUSANA JULIANO KALIL; LUISA SALA; CAROLINE COSTA MORAES.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 16/02/2017, observadas as condições legais

Expedida em: 14/11/2023

Assinado digitalmente por:

Alexandre Gomes Ciancio

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



“PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA”

[001] Ficocianina é uma ficobiliproteína presente em algumas microalgas e cianobactérias. É um pigmento azul fotossintético que pode ser utilizado como corante natural em alimentos e em cosméticos. Estudos têm mostrado que a Ficocianina age como um estimulante do sistema imunológico aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer e úlceras. Quando extraída e purificada, apresenta ação antioxidante frente aos radicais hidroxílicos e radicais peróxidos. Também pode ser utilizada como traçador bioquímico em imunoensaios, microscopia e citometria em função de suas propriedades fluorescentes.

[002] Há uma crescente demanda por produtos naturais, como proteínas e enzimas, pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas. Tal fato é devido às inúmeras vantagens que a extração de bioprodutos apresenta, frente à síntese química de compostos. Existem, entretanto, algumas carências que devem ser supridas e estão constantemente sendo investigadas em pesquisas científicas, como é o caso dos processos de rompimento celular, que é um fator limitante para o sucesso da extração. O uso de Ficocianina como corante natural azul na indústria de alimentos e de cosméticos em substituição ao uso de corantes sintéticos é atrativo. Atualmente, o mercado consumidor tem clamado por produtos cada vez mais naturais. O uso de corantes sintéticos em alimentos, produtos de confeitaria e bebidas tem sido restringido, devido a sua associação confirmada ou suspeita com o aumento do desenvolvimento do câncer ou a indução de reações alérgicas.

[003] Para a seleção da técnica de rompimento celular devem ser considerados vários fatores, tais como: tamanho e susceptibilidade da célula à ruptura, estabilidade do produto, rendimento do processo, tempo e temperatura do processo, gasto energético, além do custo e do capital de investimento.

[004] Vários solventes podem ser utilizados para a ruptura celular e/ou extração de biomoléculas a partir de micro-organismos. Nos últimos anos, uma nova classe de sais, os líquidos iônicos (LIs), tem sido utilizada como solventes. LI é um sal orgânico no estado líquido que consiste em um cátion orgânico combinado com um ânion orgânico ou inorgânico. Outro solvente que pode ser utilizado é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

[005] Os processos de ruptura celular que estão disponíveis atualmente não atuam de forma seletiva na ruptura celular e extração de compostos, encarecendo dessa forma o custo para obtenção de um bioproduto comercial.

[006] Insere-se neste contexto o interesse na obtenção de Ficocianina pelo fato desta possuir algumas propriedades de interesse farmacêutico e alimentício. Dessa forma, a obtenção deste biocomposto de forma simples e econômica é de grande interesse ao setor industrial. Este processo aqui proposto, que utiliza líquido iônico e EDTA para liberação seletiva do bioproduto Ficocianina é altamente atrativo e economicamente vantajoso, uma vez que não implica em utilizar processos prévios ou posteriores de purificação.

[007] O processo aqui descrito, objeto da presente patente de invenção, apresenta o desenvolvimento de um novo processo de ruptura celular e extração de Ficocianina a partir de fontes microalgais, incluindo cianobactérias. Para tal, são utilizados LI ou EDTA em conjunto com outros solventes aquosos (podendo ou não conter compostos orgânicos) para a ruptura celular, e para a extração são utilizados solventes aquosos (contendo ou não compostos orgânicos). A Ficocianina obtida a partir deste processo apresenta grau de pureza alimentar (superior a 0,7), podendo ser utilizada na indústria de alimentos sem processos de purificação posteriores à extração, diminuindo assim os custos de obtenção.

[008] O agente de ruptura celular é composto por (i) LI (preferencialmente acetato de trietilamônio) com concentração de 0,01% a 100% (m/m) (preferencialmente 10% (m/m)) diluído em solvente aquoso (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4) ou (ii) EDTA com concentração

de 0,001 mg/mL a 600 mg/mL (preferencialmente 1,0 mg/mL) diluído em solvente aquoso (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4).

[009] As células microalgais são ressuspensas no agente de ruptura celular com concentração de 0,0001 mg_{célula}/mL a 40 mg_{célula}/mL (preferencialmente 1,50 mg_{célula}/mL), posteriormente homogeneizadas por 0 min a 150 min (preferencialmente 30 s) e permanecem em contato com o agente de ruptura celular por 0 h a 150 h (preferencialmente 1 min).

[010] A temperatura do processo de ruptura celular é de 4 °C a 70 °C (preferencialmente 25 °C).

[011] O processo de ruptura celular pode ser mantido sob agitação mecânica ou orbital de até 250 rpm ou em repouso (preferencialmente em repouso).

[012] Após o processo de ruptura celular, as células microalgais são recuperadas por centrifugação, filtração ou decantação (preferencialmente filtração) e ressuspensas em água ou solução tampão (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4) com concentração de 0,0001 mg_{células}/mL a 100 mg_{células}/mL (preferencialmente 0,5 mg_{células}/mL) para a extração seletiva de Ficocianina.

[013] Durante a extração, a suspensão celular é mantida em repouso ou sob agitação de até 250 rpm (preferencialmente em repouso).

[014] A temperatura do processo de extração está na faixa de 10 °C a 60 °C (preferencialmente 25 °C).

[015] Após a manutenção da célula na solução tampão por um período de tempo entre 0 h a 336 h (preferencialmente 24 h) da extração se obtém uma solução de Ficocianina com pureza alimentar (superior a 0,7 podendo atingir até 1,2).

[016] Ficocianina resultante pode ser liofilizada, seca, congelada ou mantida em solução aquosa.

REIVINDICAÇÕES

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA

1. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, caracterizado por utilizar líquido iônico (LI) acetato de trietilamônio ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para liberação seletiva do bioproduto Ficocianina com grau de pureza maior que 0,7 (podendo ser utilizada como corante na indústria alimentícia) a partir de fontes microalgais, incluindo cianobactérias.

2. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 1, é caracterizado pela utilização de LI ou EDTA em conjunto com outros solventes (aquosos podendo ou não conter compostos orgânicos) para a ruptura celular, e para a extração são utilizados solventes aquosos podendo ou não conter compostos orgânicos.

3. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 2, é caracterizado pelo agente de ruptura celular ser composto por (i) LI acetato de trietilamônio com concentração de 0,01% a 100% (m/m) (preferencialmente 10% (m/m)) diluído em solvente aquoso (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4) ou (ii) EDTA com concentração de 0,001 mg/mL a 600 mg/mL (preferencialmente 1,0 mg/mL) diluído em solvente aquoso (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4).

4. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 3, é caracterizado pelas células microalgais incluindo cianobactérias serem ressuspensas no agente de ruptura celular com concentração de 0,0001 mg_{células}/mL a 40 mg_{células}/mL (preferencialmente 1,50 mg_{células}/mL), posteriormente homogeneizadas por 0 min a 150 min (preferencialmente 30 s) e

permanecerem em contato com o agente de ruptura celular por 0 h a 150 h (preferencialmente 1 min).

5. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 4, é caracterizado pela temperatura do processo de ruptura celular ser de 4 °C a 70 °C (preferencialmente 25 °C).

6. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 5, é caracterizado pelo processo de ruptura celular ser mantido sob agitação mecânica ou orbital de até 250 rpm ou em repouso (preferencialmente em repouso).

7. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 6, é caracterizado por após o processo de ruptura celular, as células são recuperadas por centrifugação, filtração ou decantação (preferencialmente filtração) e ressuspensas em solvente aquoso (preferencialmente Tris-SO₄ 50 mM e pH 7,4) com concentração de 0,0001 mg_{células}/mL a 100 mg_{células}/mL (preferencialmente 0,5 mg_{células}/mL) para a extração seletiva de Ficocianina.

8. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 7, é caracterizado pelo processo de extração ser mantido em repouso ou ainda sob agitação mecânica ou orbital de até 250 rpm (preferencialmente em repouso).

9. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 8, é caracterizado pela temperatura do processo de extração ser de 10 °C a 60 °C (preferencialmente de 25 °C).

10. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 9, é caracterizado pelo processo de extração durar por um período de tempo entre 0 h a 336 h (preferencialmente 24 h).

11. PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 10, é caracterizado

por obter uma solução de Ficocianina com grau de pureza alimentar (superior a 0,7 podendo atingir até 1,2).

12.PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FICOCIANINA UTILIZANDO LÍQUIDO IÔNICO E EDTA, de acordo com a reivindicação 11, é caracterizado pela ficocianina resultante do processo ser liofilizada, seca, congelada ou mantida em solução aquosa.