República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 0 2 0 2 1 0 2 2 1 8 9 A 2 *

(21) BR 102021022189-5 A2

(22) Data do Depósito: 05/11/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 23/05/2023

(54) Título: PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE PRITCHARDIA PACÍFICA

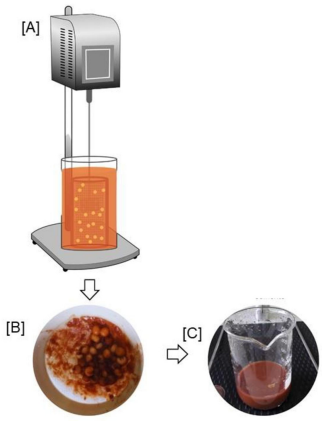
(51) Int. Cl.: A23N 5/00.

(52) CPC: A23N 5/004.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA; RAQUEL PEDROSA BEZERRA; KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO; JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA; THIAGO PAJEU NASCIMENTO; ANNA GABRIELLY DUARTE NEVES.

(57) Resumo: PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE Pritchardia pacífica. A presente proposta de invenção trata de uma metodologia que integra separação do exocarpo e tegumento de sementes e extração de proteínas em um único processo. O processo proposto é composto pelas seguintes etapas: 1) preparação da semente, 2) separação de tecidos da semente, extração e filtração e 3) centrifugação. A preparação da semente é realizada por solução desinfetante (hipoclorito de sódio) e posterior jato de água. Extração e filtração são realizadas em agitador mecânico acoplado com hélice pá e filtro acoplado em volta da hélice, onde tegumento e exocarpo das sementes são removidos e homogeneizada em solução tampão com NaCl. O extrato é obtido após centrifugação do material. Como exemplo, a lectina extraída utilizando a metodologia apresentada foi aferida em atividade hemaglutinante onde obteve LogAH igual a 5,42. Pode-se afirmar que esse método é capaz de reduzir etapas, tempo total do processo, o uso de equipamentos e reagentes para extração de proteínas, além de possibilitar a recuperação de outras partes da semente. Desta forma, pode ser aplicado em indústrias do setor biotecnológico tais como biomédica, farmacêutica e alimentícia.



PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica*

Campo da invenção

[0001] A presente patente de invenção propõe um processo para extração de proteínas de interesse biotecnológico, especificamente lectinas, do exocarpo e do tegumento de sementes de *Pritchardia pacifica,* reduzindo a contaminação por moléculas presentes em outros tecidos da semente e consequentemente otimizando o rendimento da extração e purificação. Esta invenção está situada no campo da biotecnologia, aplicável em setores como biomédico, farmacêutico e alimentício.

Fundamentos da invenção

[0002] As lectinas reconhecem e ligam-se reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos presentes, por exemplo, em glicolipídios e glicoproteínas e não estimulam resposta imunológica. Desta forma, apresentam as mais frequentes aplicações biomédicas e atividades biológicas como atividade antimicrobiana, reconhecimento de tipos sanguíneos, marcador tumoral, modulação imunológica, em suplementos nutracêuticos, entre outras (Cavada *et al*., Process Biochemistry v.93, p. 104- 114, 2020). Apesar de estarem ligadas a processos biológicos em diversos organismos, são descritas majoritariamente em plantas, sendo encontradas em todos os tecidos (NASCIMENTO, C. O. *et al.* Preparative Biochemistry and Biotechnology, v.50, n.7, p. 655–663, 2020).

[0003] Diversos métodos estão descritos na literatura para obtenção de lectinas, e proteínas em geral, a partir de sementes, estes normalmente seguem inúmeros passos que promovem uma demanda energética e tempo de produção.

[0004] Dentre as etapas que decorrem no processo estão: limpeza da semente, trituração, extração por meio de agitação com solventes, filtração, precipitação salina, centrifugação e exaustivas técnicas de purificação (Adamude, F. A. *et al.* Scientific African, v.7, 2019; Madayi, D., Surya, P.H., Elyas, K.K. Biological Macromolecules, v.163, n.15, p.431-441, 2020).

[0005] As técnicas descritas abordam as sementes como unidades indivisíveis, desconsiderando sua morfologia. Entretanto, os componentes dos diferentes tecidos que compõem uma semente variam de acordo com sua função e da fisiologia do vegetal (Pozo, D. G. *et al.* Horticulturae. MDPI. V.64, n.6, p. 1-9., 2020). Além disso, tais metodologias põem em risco a integridade da proteína de interesse, sendo assim necessário o desenvolvimento de processos que satisfaçam os direcionamentos e aplicações industriais de sementes.

[0006] O processo de extração de proteínas de sementes também pode ser antecedido por separação de exocarpo e tegumento, esta etapa é utilizada para diminuição de contaminantes presentes nesta camada protetora, ou para extração de bioprodutos presentes na mesma (Torres, M. E. L. M. *et al.* Process Biochemistry v.89, p.169-176, 2019). Entretanto a adição de outra etapa a extração torna o processo mais complexo.

[0007] O processo proposto nesta patente reduz as etapas de produção enquanto aumenta a recuperação da proteína, uma vez que proporciona a extração de moléculas presentes no exocarpo e tegumento sem que haja trituração do endosperma, reduzindo possibilidade de contaminantes. Além de realizar concomitantemente a filtração do extrato. Assim, favorece o isolamento e purificação da molécula de interesse de modo mais rápido e eficiente.

[0008] A metodologia utilizada na separação do exocarpo junto ao tegumento e extração de proteínas deve levar em consideração a morfologia do material vegetal. As sementes de palmeiras são geralmente redondas, ovoides ou, raramente, elípticas. Podem ser livres ou aderentes ao pericarpo. Quando livres, o tegumento seminal é espesso e se observa uma cicatriz na superfície que se destaca na germinação e é chamada de opérculo (Yocum, H.G. American Horticultural Magazine. v.43, n.2, p.200-201, 1964; Pozo, D. G. et al. Horticulturae. MDPI. V.64, n.6, p. 1-9., 2020).

[0009] Outras sementes possuem o tegumento mais delgado, como é o caso das sementes de *Pritchardia pacifica* (Yocum, H.G. American Horticultural Magazine. v.43, n.2, p.200-201, 1964; Pozo, D. G. et al. Horticulturae. MDPI. V.64, n.6, p. 1-9., 2020). Facilitando a separação entre o exocarpo, o tegumento e o endosperma por meio de agitação mecânica e extração da proteína de interesse como proposto nesta invenção.

[00010] O presente invento difere do atual estado da técnica por proporcionar a extração de proteínas presentes na camada exterior das sementes de *Pritchardia pacifica,* exocarpo e tegumento sem que seja realizado trituramento da semente ou separação de seus tecidos em etapa anterior, enquanto promove simultaneamente a filtração do extrato.

[00011] Os documentos que antecedem a presente patente descrevem as etapas preparação da semente, extração e filtração de forma diferente do processo proposto como pode ser observado nos documentos patentários a seguir.

[00012] WO1982004380A1 utiliza vapor de solventes e posterior secagem resultando na separação do exocarpo e tegumento. Entretanto a alta temperatura utilizada pode resultar na desnaturação nas proteínas presentes. Esta invenção difere da citada por utilizar processo mecânico, em condições controladas de temperatura reduzindo a probabilidade da desnaturação proteica e a quantidade de processos na obtenção da proteína, além de compreender uma tecnologia que dispensa o uso de solventes minimizando a eliminação de rejeitos industriais.

[00013] WO2000027876A1 descreve a extração e purificação de lectinas de sementes a partir das seguintes etapas: separação manual do tegumento, secagem, moagem, extração com NaCl 0,9% em movimento, centrifugação, precipitação com sulfato de amônio, diálise, liofilização e cromatografia. A presente patente difere da descrita acima por realizar a separação do exocarpo e tegumento em agitador mecânico utilizando hélice pá (preferencialmente do tipo espátula) acoplado com filtro, realizando simultaneamente a separação entre as camadas exteriores e o endosperma da semente, extração da proteína e filtração do extrato, reduzindo quantidade de processos e tempo investido.

[00014] US2530272A descreve imersão em solvente para remoção de óleos presentes no tegumento e posteriormente imersão em solução com reagente alcalino, até que o tegumento se apresente intumescido e desprendido do endosperma. Esta também relata a possibilidade de precipitação de proteínas extraídas durante a imersão em solução alcalina. O presente invento difere do citado pois utiliza agitador mecânico cujo tambor é acoplado a filtro, realizando separação de exocarpo e tegumento do interior da semente, extração e filtração do extrato formado em processo singular. Desta forma, oferece metodologia rápida, eficiente e seguro, tendo em vista que reduz o número de etapas, a contaminação por moléculas provenientes de outros tecidos, a probabilidade de desnaturação proteica e a quantidade de resíduos químicos descartados.

[00015] A patente CN188559301A utiliza etapas de trituração, desengorduramento, precipitação, hidrólise ácida, lavagem com solvente orgânico e secagem para obtenção de melanina do tegumento de sementes de pimenta. Destoando, a presente invenção descreve metodologia que não utiliza etapa de trituramento, promovendo extração de proteínas presentes nos exocarpo e tegumento sem que haja contaminação por metabólitos presentes em outros tecidos da semente. Além disto, consegue realizar a filtração do extrato obtido simultaneamente por meio do acoplamento de filtro a base do tambor do agitador magnético.

[00016] CN111743067A descreve metodologia composta por processos de trituração em moinho de grãos e separação em peneira para obtenção de nutrientes do tecido de revestimento em grãos de arroz integral. A presente patente difere da citada por não utilizar processo de trituração, dessa forma, não compromete fisicamente o endosperma, reduzindo a quantidade de poluente no extrato. Além de realizar extração e filtração durante o mesmo processo.

[00017] CN105661566A detalha metodologia para separação do tegumento de sementes compostas por processo de congelamento seguido de super aquecimento e posterior fricção mecânica. Estes processos podem prejudicar a estrutura de proteínas causando desnaturação, sendo assim o presente invento propõe o uso de agitador mecânico acoplado a filtro, facilitando a obtenção e filtração do extrato do exocarpo e tegumento de sementes.

[00018] No atual estado da técnica também se encontra descrito modelo de aparelho utilizado para separação do tegumento de sementes, CN108402483A descreve equipamento composto por suporte acoplado a tambor embutido de dispositivo de separação de tecidos de sementes e filtro. A presente patente descreve processo de isolamento do tegumento por meio de agitador mecânico acoplado a filtro, realizando os processos de separação do exocarpo e tegumento, extração e filtração simultaneamente. O uso de equipamentos já disponíveis no mercado torna também esta metodologia mais acessível a indústria em geral.

Breve descrição dos desenhos

[00019] A presente invenção apresenta determinadas particularidades ilustradas na imagem descrita a seguir.

A Figura 1 ilustra hélice pá, do tipo espátula, utilizada em agitador mecânico para separação de exocarpo e tegumento das sementes de *Pritchardia pacifica* e extração de proteínas presentes no mesmo.

A Figura 2 ilustra cilindro composto por material poroso utilizado como filtro acoplado a tambor de agitador mecânico.

A Figura 3 ilustra modelo de agitador mecânico acoplado com filtro cilíndrico utilizado em processo de separação do tegumento de semente de *Pritchardia pacifica*, extração e filtragem de proteínas presentes neste.

A figura 4 detalha etapas na preparação do fruto para extração da proteína, bem como caracteriza as partes da semente que serão utilizadas e as que serão descartadas no processo. Como ilustrado, temos [A] fruto maduro colhido e armazenado, [B] fruto seco em estufa, [C] fruto descascado e [D] semente separada para processo de extração. Bem como podemos observar detalhadamente [E] o exocarpo da semente, parte homogeneizada no processo de extração de lectinas, [F] tegumento, parte que também passa por processo de homogeneizção [G] endosperma, interior da semente que é recuperado após processo de homogeneização, completamente separado do exocarpo em processo simultâneo à extração de proteínas.

A figura 5 ilustra etapas realizadas como exemplo da presente invenção, para extração de lectinas, onde pode-se observar [A] agitador mecânico acoplado a filtro silindrico em processo de extração e filtração de proteinas a partir de sementes de *Pritchardia pacifica,* [B] exocarpo completamente separado do tegumento e endosperma da semente, após processo de extração-filtração, e [C] extrato proteico filtrado, obtido após homogeneização em agitador mecânico, pré centrifugação.

Descrição da invenção

[00020] A presente patente de invenção propõe um método de extração de proteínas presentes em exocarpo e tegumento de sementes de *Pritchardia pacifica,* preferencialmente lectinas. Este processo otimiza o rendimento de extração e reduz tempo de purificação para obtenção em larga escala na área industrial.

[00021] A potencialidade da presente inovação é colocar no mercado uma metodologia economicamente viável e tecnicamente eficaz. Apresenta vantagens por não realizar diversas técnicas de preparação para a extração como a moagem ou trituração das sementes, reduzindo a contaminação por outros metabólitos secundários e diluição da proteína de interesse. Além de não requerer maquinaria sofisticada ou desconhecida podendo ser utilizadas em indústrias do ramo da biotecnologia como biomédica, farmacêutica e alimentícia. A metodologia proposta ainda permite a recuperação do endosperma da semente para extração de outras moléculas de interesse, tendo em vista que este não é comprometido durante o processo proposto.

[00022] A metodologia proposta para a extração de proteínas, preferencialmente lectinas, do tegumento de sementes de *Pritchardia pacifica* é composta pelas seguintes etapas: 1) Preparação: onde são realizadas técnicas de lavagem e secagem da semente; 2) Extração: onde são realizadas, simultaneamente, técnicas de separação do ecxocarpo, tegumento e endosperma, extração e filtração do extrato obtido; 3) Centrifugação: onde é realizada a remoção primária de impurezas. A depender da indústria após estas etapas, deve ser realizada purificação da proteína.

[00023] A etapa de preparação (1) é realizada a priori para remoção de impurezas presentes na superfície exterior do exocarpo das sementes. O processo de lavagem é realizado por imersão em solução desinfetante, preferencialmente composta por hipoclorito de sódio (1%) por até 10 minutos, seguida de lavagem com jato de água destilada.

[00024] A técnica de secagem é realizada em estufa para reduzir a possibilidade de contaminação, onde permanecerão na temperatura de 30º a 60º, preferencialmente 40°C, durante 48h a 120h, preferencialmente 96h. As temperaturas e tempos foram definidos buscando a maior eficiência em função da possibilidade de desnaturação de proteínas frente a altas temperaturas.

[00025] Na segunda etapa, a separação do exocarpo e tegumento dos outros tecidos da semente é realizada conjuntamente à extração e filtração das proteínas presentes neste, preferencialmente lectinas. Este processo utiliza técnica de homogeneização em agitador mecânico, preferencialmente integrado com hélices do tipo espátula, como ilustrado na figura 1. Hélices do tipo espátula são indicadas por promoverem agitação e homogeneização do meio, sem que sejam danificados os outros tecidos da semente, além de serem recomendadas para amostras com alta viscosidade. Hélices integradas com lâminas não atingem o mesmo objetivo.

[00026] A filtração é realizada simultaneamente à extração, por meio de cilindro composto por material poroso de até 2mm (figura 2), acoplado no centro tambor onde será realizada a extração, como pode ser observado na figura 3.

[00027] A etapa de separação do exocarpo + tegumento, extração de proteínas e filtração (2) é realizada pela adição das sementes de *Pritchardia pacifica* em concentração de 15% (p/v) em solução de tampão (0,1M) e NaCl (0,15M). Recomenda-se tampões que utilizem a faixa de pH entre 6,5 e 8, preferencialmente 7,5 como citrato de sódio, Tris-HCl ou fosfato de sódio, preferencialmente fosfato de sódio. Este processo ocorre em agitador mecânico acoplado a filtro. As solução tampão juntamente com as sementes devem ser depositadas no interior do filtro cilíndrico acoplado ao tambor de extração. Esta etapa deve ocorrer em condições de 300rpm, temperatura entre 20°C e 30°C, preferencialmente 23°C, no período de 30 minutos à 2 horas, preferencialmente 1 hora.

[00028] Na etapa de centrifugação (3), o filtrado deve ser centrifugado a 8.000xg, em temperaturas estáveis entre 4°C e 10°C, preferencialmente 4°C. O sobrenadante obtido após esta etapa é o extrato bruto, podendo seguir para etapas de dosagens e purificação.

Exemplos de concretizações da invenção

[00029] A presente invenção é mais detalhada com os exemplos a seguir:

Exemplo 1. Preparação das sementes de *Pritchardia pacifica* para extração.

[00030] A semente foi lavada por imersão em hipoclorito de sódio a 1% durante 10 minutos, seguido por jato de água destilada. As sementes passaram então por processo de secagem em estufa a 40°C durante 96 horas.

Exemplo 2. Extração de lectinas do tegumento de sementes de *P. pacifica.*

[00031] Para a obtenção do extrato aquoso, as sementes de *P. pacifica* em concentração de 15% (p/v) em solução tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,5) com NaCl (0,15M), foram submetidas a agitação em Agitador Mecânico acoplado com filtro cilindrico em tambor. A extração foi obtida após 1 hora em temperatura ambiente (23°C) sob agitação constante. O extrato bruto filtrado foi centrifugado a 4° C a 8.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante resultante foi considerado extrato bruto.

Exemplo 3. Atividade Hemaglutinante de extrato bruto obtido a partir da metodologia proposta.

[00032] A atividade hemaglutinante (AH) foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços, utilizando suspensão de eritrócitos de coelho (2,5% v/v) previamente tratado com glutaraldeído como substrato. Foi realizada diluição seriada da amostra em NaCl 0,15M, iniciando com 50 µL, em uma fileira de placas e em seguida, 50 µL da suspensão de eritrócitos foram adicionados a cada poço. A atividade hemaglutinante foi definido como o inverso do título que corresponde a uma menor diluição da amostra que apresentou hemaglutinação completa, após incubação por 45min. A atividade hemaglutinante específica foi definido como a razão entre atividade e a concentração de proteína (mg/mL) (Torres, M. E. L. M. *et al.* Process Biochemistry v.89, p.169-176, 2019). A atividade hemaglutinante presente no extrato foi expressa em Log^{AH} igual a 5,42, concretizando a extração de lectinas do exocarpo + tegumento das sementes como proposto na presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica* **caracterizado por** realizar simultaneamente a extração de proteínas, separação de exocarpo, tegumento e endosperma de sementes por meio de agitação mecânica e filtração do extrato proteico de *Pritchardia pacífica*.

2. PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** processo de separação do tegumento e extração ocorrerem em uma única etapa via agitador mecânico em velocidade de 300 rpm.

3. PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar hélice do tipo pá (espátula) para agitação.

4. PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica*, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar agitador mecânico acoplado a filtro cilíndrico, incorporado em interior do tambor (ou recipiente onde é realizada a extração) de agitador mecânico para obtenção do extrato proteico.

DESENHOS

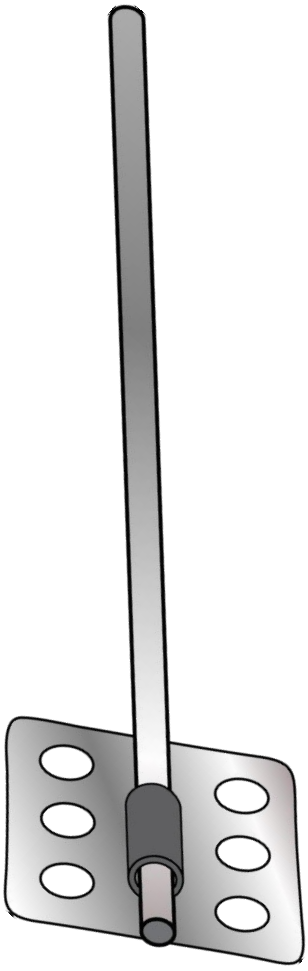


Figura 1

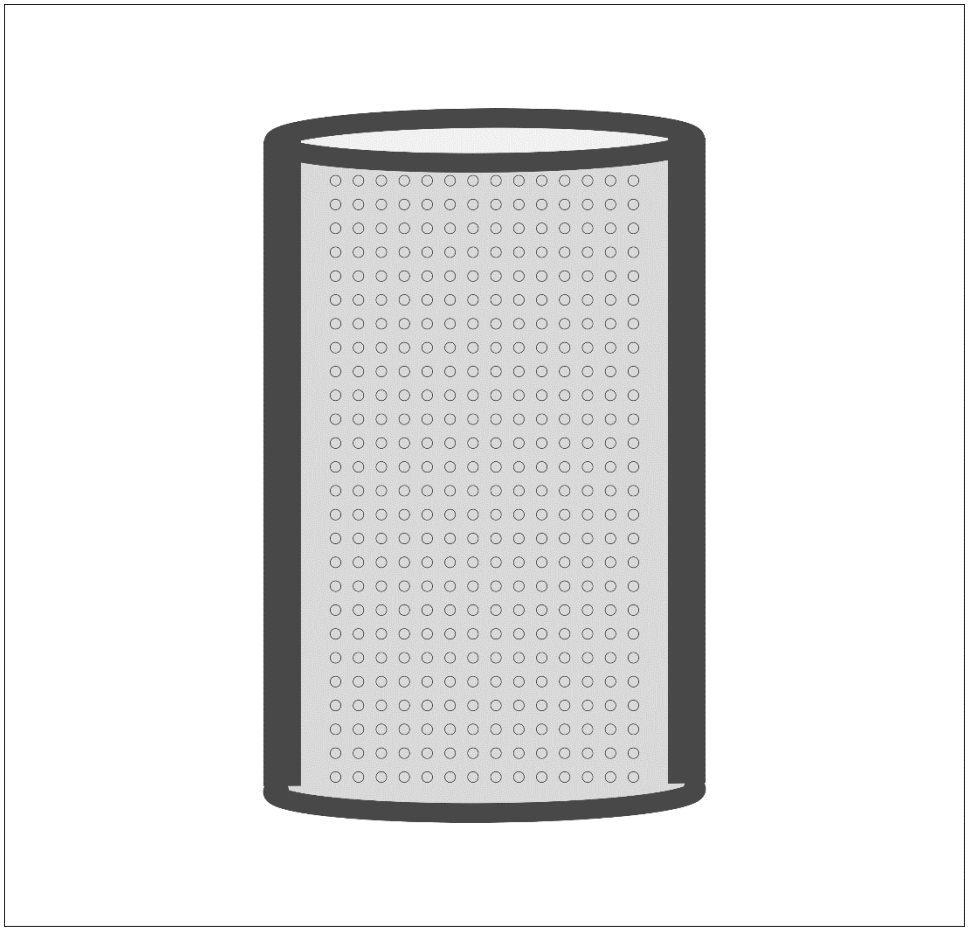


Figura 2

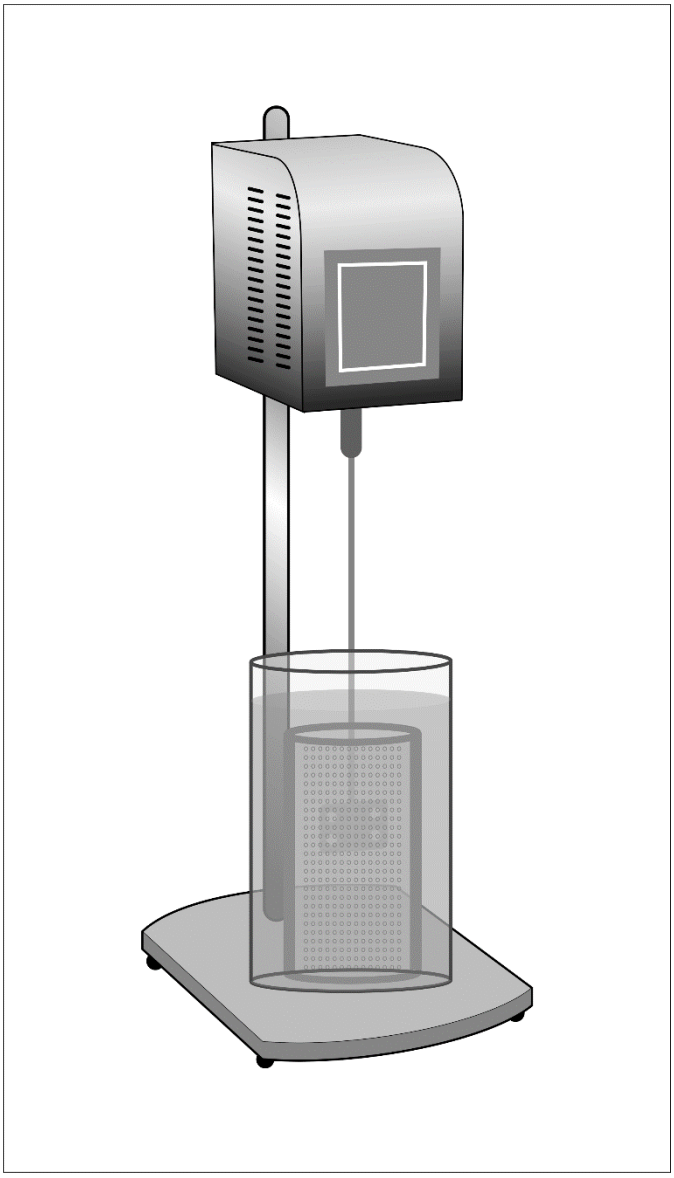


Figura 3

Figura 4

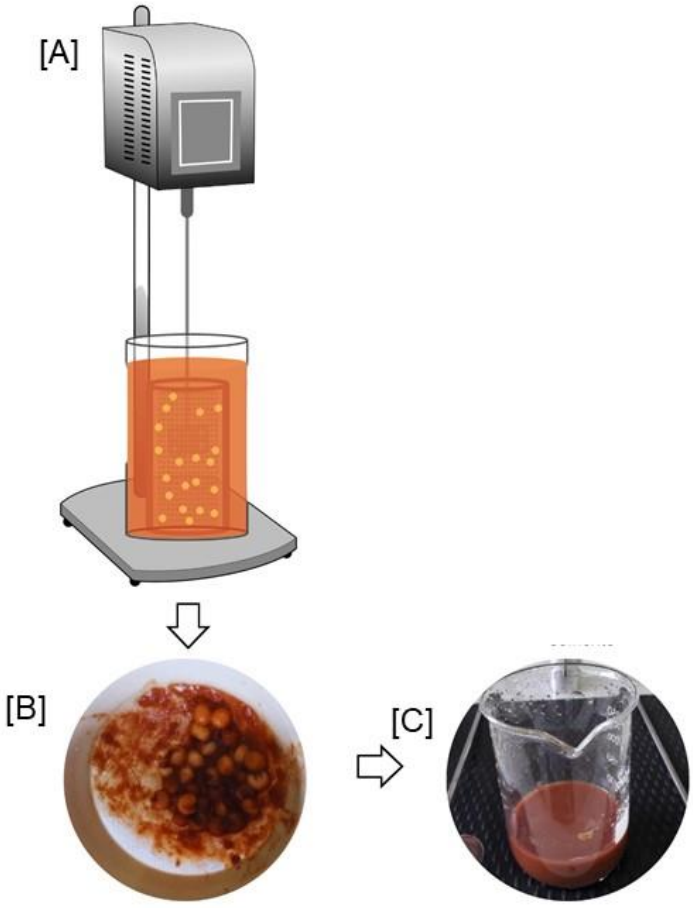


Figura 5

RESUMO

PROCESSO SIMULTÂNEO DE EXTRAÇÃO MECÂNICA E FILTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO EXOCARPO E TEGUMENTO DE SEMENTES DE *Pritchardia pacífica*

A presente proposta de invenção trata de uma metodologia que integra separação do exocarpo e tegumento de sementes e extração de proteínas em um único processo. O processo proposto é composto pelas seguintes etapas: 1) preparação da semente, 2) separação de tecidos da semente, extração e filtração e 3) centrifugação. A preparação da semente é realizada por solução desinfetante (hipoclorito de sódio) e posterior jato de água. Extração e filtração são realizadas em agitador mecânico acoplado com hélice pá e filtro acoplado em volta da hélice, onde tegumento e exocarpo das sementes são removidos e homogeneizada em solução tampão com NaCl. O extrato é obtido após centrifugação do material. Como exemplo, a lectina extraída utilizando a metodologia apresentada foi aferida em atividade hemaglutinante onde obteve Log^{AH} igual a 5,42. Pode-se afirmar que esse método é capaz de reduzir etapas, tempo total do processo, o uso de equipamentos e reagentes para extração de proteínas, além de possibilitar a recuperação de outras partes da semente. Desta forma, pode ser aplicado em indústrias do setor biotecnológico tais como biomédica, farmacêutica e alimentícia.