



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

(21) BR 102020022866-8 A2



(22) Data do Depósito: 10/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 24/05/2022

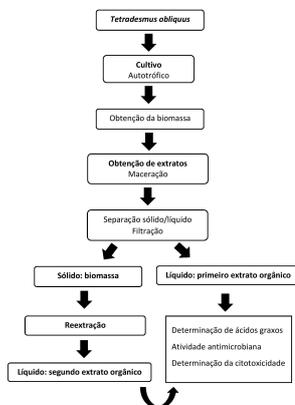
(54) **Título:** EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO

(51) **Int. Cl.:** A61K 36/05; A61P 17/02; A61P 31/04.

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

(72) **Inventor(es):** ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; RAQUEL PEDROSA BEZERRA; ALEXSANDRA FRAZÃO DE ANDRADE; REBECA GONCALVES DE MELO; MILLENA PATRÍCIO DO NASCIMENTO FERREIRA; JORGE VINÍCIUS FERNANDES LIMA CAVALCANTI; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDAO COSTA.

(57) **Resumo:** EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO. A presente patente de invenção refere-se à preparação de um extrato orgânico obtido a partir da biomassa da microalga *Tetrademus* (*Scenedesmus*) *obliquus* obtido em duas extrações consecutivas. O extrato apresenta ácidos graxos com potencial antibacteriano e que podem auxiliar no tratamento de lesões em geral, particularmente lesões incisais, escoriações ou lacerações cutâneas. A biomassa microalgal cultivada autotroficamente foi concentrada e a parede celular foi sensibilizada pela utilização de solventes orgânicos obtendo fração sólida e líquida. A fração líquida foi concentrada e denominada de extrato celular e a fração sólida foi reutilizada para uma segunda extração seguindo a mesma metodologia utilizada anteriormente. O extrato apresentou ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico e linolênico que são grandes mediadores pró-inflamatórios com potencial de acelerar o processo de cicatrização, além de não ser tóxico para células da pele e apresentar atividade antibacteriana. Ademais, apresenta um método de extração com maior custo-benefício e produção acessível com aplicação na área da biotecnologia, farmacêutica e nutracêutica que visa, principalmente, contribuir na atividade antibacteriana e em resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição do tecido epitelial.



EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO

Campo da invenção

[001] A presente invenção refere-se à preparação de um extrato orgânico obtido a partir da biomassa da microalga *Tetradismus (Scenedesmus) obliquus* por meio de maceração em duas extrações consecutivas com otimização do rendimento lipídico. É um método mais rápido, fácil e econômico quando comparado a outros utilizados proporcionando ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico e linolênico com potencial cicatrizante e antimicrobiano, estando no campo da biotecnologia, farmácia e nutracêutica.

Fundamentos da invenção

[002] A pele tem o papel de proteger o corpo humano de danos, influências externas e invasões microbianas, da mesma forma que sustenta os fluidos corporais (ZHAO et al., *Biomaterials.*, v. 122, p. 34–47, 2017). Fatores como doenças dermatológicas, queimaduras, infecções microbianas, acidentes e outros danos físicos, químicos ou biológicos, podem afetar o tecido da pele e dar origem aos ferimentos cutâneos (THAPA et al., *Acta Biomaterialia.*, v. 103, p. 52–67, 2020). A cicatrização é um processo essencial que está relacionado com a participação de células do sangue e uma série de componentes que tem a função de regenerar e reparar as estruturas cutâneas (GONZALEZ et al., *An. Bras. Dermatol.*, v. 91, n. 5, p. 614-20, 2015). A ferida classificada como aguda tem um processo de cicatrização esperado e continua em até 14 dias após a lesão. Já ferida classificada como crônica é aquela em que a cicatrização não ocorre como esperado e se faz necessário uma intervenção terapêutica após o período de seis semanas. As lesões crônicas apresentam um elevado custo ao sistema de saúde, uma vez que requerem um período de cuidado maior e possuem um alto risco de infecções (DOWSETT et al., *Wounds International* 2015., v. 6, n. 2, p. 17–21, 2015).

[003] A influência econômica e social, que ferimentos na pele exercem sobre o mundo, está diretamente ligada à sua ampla ocorrência abrangendo pessoas de todas as

idades, principalmente idosos, os quais são vítimas de doenças que estão relacionadas ao envelhecimento da população mundial. Patologias como diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade também afetam o processo de cicatrização (THOMAS et al., *Drugs & Aging.*, v. 18, n. 8, p. 607-620, 2001; VOWDEN et al., *Wounds International.*, v. 7, n. 2, p. 10-15, 2016). Apesar da existência de fármacos, ainda é alta a incidência de ferimentos crônicos e úlceras que podem resultar em complicações adversas como amputações e mortes, que contribuem ao gasto excessivo e afetam o âmbito psicológico e social de inúmeros indivíduos (MANDELBAUM et al., *An Bras de Dermatol.*, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003).

[004] O tratamento das feridas teve início na antiguidade e obteve melhorias de acordo com a necessidade de uma cicatrização mais rápida e eficiente. Os primeiros recursos terapêuticos utilizados foram extratos de plantas que eram aplicados diretamente sobre os ferimentos (ARAÚJO et al., *R. Interd.*, v. 8, n. 2, p. 60-67, 2015). Entretanto, existe a problemática atual de que os agentes terapêuticos utilizados no presente, na maioria das vezes, possuem uma eficiência inadequada da mesma forma que apresentam um número significativo de efeitos colaterais, como alergias, irritações, inchaços, alterações na função dos rins e agravamento de patologias. Por conseguinte, a busca por biofármacos e produtos que possam ter eficácia melhorada, originados de plantas e microrganismos se tornou um dos focos da ciência contemporânea (BUDOVSKY et al., *Wound Repair and Regeneration.*, v. 23, n. 2, p. 171–183, 2015).

[005] As microalgas são microrganismos unicelulares capazes de combinar técnicas autotróficas e heterotróficas para o seu crescimento, sendo chamado de cultivo mixotrófico, o qual assimila simultaneamente fontes inorgânicas e orgânicas de carbono (LEUPOLD et al., 2013). As microalgas conseguem sobreviver em condições severas, que incluem variações de salinidade, temperatura e intensidade de luz. Adicionalmente, o meio de cultivo pode ser manipulado com o objetivo de induzir a síntese e acúmulo de metabólitos primários ou secundários (DERNER et al., *Ciência Rural*, v.36, n.6, 2006).

[006] Em relação aos componentes presentes nas microalgas estão as xantofilas (principalmente astaxantina e cantaxantina), vitaminas como a C e E, enzimas,

polímeros como polissacarídeos e amido, aminoácidos, esteróis e lipídios (DERNER et al., *Ciência Rural*, v.36, n.6, 2006). Dessa forma, as microalgas ganharam destaque biotecnológico já que a sua biomassa pode ser transformada em inúmeros produtos como suplementos alimentares, nutracêuticos e fonte de energia (MATHIMANI et al., *J. Clean. Prod.*, v. 208, p. 1053-1064, 2019).

[007] A microalga *Tetradesmus (Scenedesmus) obliquus* tem destaque na literatura principalmente em seu uso para a produção de biocombustíveis, no tratamento de águas residuais e na extração de bioativos para atividade biológica (SHAHID et al., *Sci. Total Environ.*, v. 704, 2020). Em sua composição existe um alto teor de ácidos graxos, os quais desempenham papel importante na estruturação das células, uma vez que conseguem intermediar o processo de cicatrização. Também estão presentes compostos fenólicos biologicamente ativos com propriedade antifúngica (MARREZ et al., *Heliyon*, v. 5, v. 3, 2019). Nesta espécie também são encontrados carotenoides como neoxantina, lodoxantina, violaxantina, luteína e β caroteno na qual neutralizam radicais livres existentes nos tecidos, contribuindo com atividade antioxidante (CHU et al., *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 59, p. 3004–3013, 2011).

[008] *T. obliquus* apresenta um perfil rico em ácidos graxos do tipo ômega, que são manuseados principalmente na indústria alimentícia e para a produção de biocombustíveis (BERMUDEZ-SIERRA, *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.*, v. 16, n. 2, p. 88-98, 2018). Em seu perfil de ácidos graxos é possível encontrar ácido linoleico e ácido linolênico, sendo esses os ácidos graxos essenciais (AGE) mais citados em termos de cicatrização na literatura. São precursores na síntese de ácidos graxos como os ácidos araquidônicos (AA), eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que são importantes na manutenção da fluidez das membranas e na síntese de outras moléculas, como a prostaglandina, que conseguem alterar reações inflamatórias e aceleram o processo de reparação tecidual. (NADZIR et al., *Biofuels*. p 1-10. 2019; MANHEZI et al., *Rev. bras. enferm.* v .61 n .5, 2008). (ISMAGULOVA et al., *J Appl Phycol.*, v. 13, n. 5, p. 2737–3750, 2017).

[009] Os documentos que antecedem o presente documento descrevem a extração de lipídios de plantas, macroalgas e microalgas com potencial cicatrizante e formas farmacêuticas. Alguns métodos utilizados podem ser encontrados nos documentos patentários e artigos a seguir.

[010] Syarina et al. (EXCLI J., v. 14, p. 385-393, 2015) avaliaram o potencial cicatrizante de extratos da cianobactéria *Spirulina platensis*. Os extratos foram obtidos através da maceração, onde foram utilizados os solventes metanol, etanol e água ultrapurificada e foi realizado um ensaio de scratch assay *in vitro* em fibroblastos primários para determinação da propriedade cicatrizante. Os extratos provenientes de metanol e etanol demonstraram um aumento na quantidade de células, porém não auxiliaram na migração celular. No entanto, foi observado que o extrato mostrou um resultado significativo em relação à atividade cicatrizante, por apresentar em sua composição compostos fenólicos, ácidos graxos e seus derivados. Uma migração celular acelerada e oclusão mais eficiente da ferida foi observada entre as células tratadas em comparação com as células não tratadas, considerando como uma nova fonte de agentes terapêuticos. Esse documento de patente difere pelo método de reextração de lipídios da biomassa de *Tetrademus (Scenedesmus) obliquus* utilizando os solventes orgânicos hexano, acetato de etila e etanol.

[011] A patente KR101814523B1 se refere a uma composição cosmética que contém material derivado das microalgas *Chlorella vulgaris* AG10032, *Chlorella vulgaris* AG30007, *Scenedesmus accuminatus*, *Scenedesmus quadricauda* e *Botryococcus* sp. A extração lipídica foi realizada utilizando da mistura dos solventes cloróformio, metanol e água (seguindo a técnica de Bligh & Dyer) seguida de sonicação. Testes de viabilidade celular foram realizados por ensaio de MTT, em que a concentração de 0,01% não afetou a viabilidade celular. Em seguida foi realizada a formulação em creme a base de carbopol que mostra ter efeito no melhoramento dos sinais de expressão da pele. Esse documento de patente se difere pelo método de extração de lipídios utilizando a maceração e a reextração da biomassa residual para melhoramento do rendimento orgânico. Além disso, utiliza os solventes orgânicos hexano, acetato de etila e etanol, manipulando apenas uma espécie de microalga.

[012] O extrato metanólico da macroalga marrom *Padina gymnospora* obtido através de percolação mostrou induzir a proliferação e migração celular de fibroblastos (L929) quando submetido ao ensaio de scratch assay para a determinação da sua atividade cicatrizante. Este resultado pode ser justificado pelo potencial cicatrizante do perfil de ácidos graxos de *P. gymnospora*, em que são destacados os ácidos linolênico, α -linoleico e ácido oleico (BALIANO et al., Revista Brasileira de Farmacognosia., v. 26, n. 6, p. 714-719, 2016). Esse documento de patente difere por utilizar extrato lipídico obtido por maceração, a qual se caracteriza como uma técnica menos onerosa em comparação ao método de percolação.

[013] Dall'Oglio et al. (J. Braz. Chem. Soc. v. 30 n.3, 2019) realizaram estudos experimentais relacionados à extração celular usando a microalga *Scenedesmus sp* com o objetivo de maximizar o rendimento lipídico. O cultivo foi realizado com a suplementação de nutrientes em estação de tratamento de águas residuais. O extrato foi obtido por meio de diferentes métodos como misturas de solventes, clorofórmio metanol (2:1) e clorofórmio etanol (2:1); extração por ultrasonicação assistida, agitação magnética acoplada a um condensador e pré-tratamento (banho de água e forno). Para otimizar o rendimento lipídico foi realizado um novo procedimento de extração a partir da biomassa residual da microalga utilizando o mesmo procedimento de extração. A segunda extração realizada com clorofórmio metanol atingiu 20% da quantidade lipídica obtida do primeiro procedimento por 1 h e 15% por 2 h. Já com clorofórmio etanol (2:1), alcançou 34% do primeiro rendimento lipídico obtido por 1 h e 15% por 2 h. Esse documento de patente difere ao utilizar o meio autotrófico para o cultivo da microalga sem necessidade de suplementação de fonte orgânica. Além disso, o extrato orgânico foi obtido pelo método de maceração junto a uma reextração utilizando o mesmo método, configurando simplicidade, custo-benefício e eficiência.

[014] Mazumdar et al. (Journal of Traditional and Complementary Medicine, 2019) investigaram o potencial cicatrizante do extrato das folhas de *Annona reticulata* Linn. por meio do ensaio *in vitro* de *scratch assay*. O extrato foi obtido a partir do método de maceração com a utilização do solvente etanol. As células de fibroblastos e queratinócitos submetidas ao extrato demonstraram um resultado de proliferação

celular e cicatrização acelerada em relação ao controle positivo utilizado. Os autores indicam que o extrato etanólico possui derivados de lipídios capazes de desencadear eventos celulares envolvidos com o processo de cicatrização. Esse documento de patente difere por propor o extrato orgânico da microalga *Tetradismus (Scenedesmus) obliquus* obtido por maceração em duas extrações consecutivas que proporcionam maior rendimento lipídico. Além disso, apresenta ácidos graxos com importância biotecnológica inclusos no processo de regeneração tecidual.

[015] O documento BRPI0720863A2 trata da extração de lipídios a partir da biomassa de *Chenopodium quinoa* Willd com o objetivo de desenvolver uma composição farmacêutica para o uso cosmético, dermatológico ou nutracêutico. Para a obtenção do óleo bruto de quinoa utilizaram o solvente n-hexano através do método de percolação. Entre a composição bioquímica do extrato estão presentes majoritariamente os ácidos graxos palmítico, oleico e principalmente linoleico. Em um teste de proliferação dos fibroblastos com uso de MTT e com a utilização do concentrado de óleo de quinoa foi observada a estimulação da proliferação celular e a síntese dos diferentes componentes da matriz extracelular. A patente WO2015044254A1 se refere à extração de lipídios de origem vegetal do gênero *Passiflora* e a formulação de um cosmético para uso dermatológico e tópico. A extração pode ser realizada preferencialmente a pressão a frio em prensa mecânica. A composição compreende um extrato lipídico no qual estão presentes principalmente os ácidos graxos palmítico, oleico e linoleico. A formulação tem atividade cicatrizante e possui o objetivo de prevenir e tratar distúrbios ou patologias da pele, membranas mucosas ou tegumentos. A patente WO2011091492A1 detalha o uso de um extrato lipídico de *Bixa orellana* L., para uso tópico com atividade cicatrizante. O extrato das sementes foi obtido com utilização do solvente etanol, o qual permaneceu em contato com a biomassa íntegra para realizar a extração do óleo. A formulação compreendeu uma pomada cicatrizante contendo o óleo essencial de urucum com a adição de um excipiente como a vaselina ou bases hidrossolúveis. A composição cosmética tem eficácia na cicatrização da epiderme e das mucosas em geral, redução dos sintomas da psoríase e cicatrização de feridas provenientes da diabetes. Esse documento de

patente difere por utilizar a biomassa da microalga *Tetrademus (Scenedesmus) obliquus*, uma microalga que é caracterizada como uma fonte de simples obtenção de bioativos, a partir do cultivo autotrófico. Além disso, apresenta um significativo custo benefício ao ser obtido em duas extrações consecutivas e possui biomoléculas com atividades biológicas envolvidas na cicatrização de lesões cutâneas.

[016] A presença de lipídios pode aumentar a expressão de mediadores pró inflamatórios em feridas cutâneas, além de exercer atividades antibacterianas e antifúngicas (KIM et al., J. Invest. Dermatol., v. 138, n. 5, p. 1176-1186, 2018), demonstrando uma variedade de atividades em relação aos produtos atualmente comercializados. Nesse contexto, o presente invento apresenta simples cultivo, sendo derivado de um insumo natural. Com isso, o desenvolvimento e dito “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO” proposto neste documento de patente de invenção possui o parâmetro de novidade, pois até o presente nenhum trabalho científico ou técnico compreendido no estado da técnica possui a tecnologia de obtenção, desenvolvimento e aplicação semelhantes, podendo ser utilizado preferencialmente como um método potencial cicatrizante sobre lesões cutâneas por apresentar bioativos com importância biotecnológica importantes no processo de regeneração tecidual. Destaca-se ainda que a tecnologia proposta neste documento de patente de invenção apresenta também os outros critérios de patenteabilidade, como atividade inventiva e aplicação industrial, requisitos estes necessários para a concessão da patente requerida.

Breve descrição dos desenhos

[017] A presente invenção é descrita a seguir e melhor compreendida através da Figura 1.

A Figura 1 apresenta preparação do extrato celular e as atividades subsequentes.

Descrição detalhada da invenção

[018] O objetivo do presente invento é propor um método de extração orgânica a partir da biomassa da microalga *Tetrademus obliquus*. O extrato possui meio de

obtenção simples e rápido e rendimento considerável em extrações consecutivas da biomassa microalgal, além de possuir ácidos graxos com atividade biológica como ácido oléico, α -linolênico e linoleico capazes de serem coadjuvantes em tratamentos para doenças de pele e promover a cicatrização de lesões cutâneas.

[019] A preparação do extrato orgânico procedeu-se inicialmente com o cultivo celular da microalga em meio autotrófico para obtenção da biomassa, concentração de biomassa microalgal, extração e reextração de lipídios, por fim, a caracterização do extrato.

[020] Para a produção da biomassa, as microalgas podem ser cultivadas de modo autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. Preferencialmente, a microalga deve ser cultivada em meio de cultivo padrão BG-11 com uma concentração celular inicial de 50 mg/mL. Os meios de cultura devem ser previamente esterilizados por método físico e/ou químico.

[021] Os recipientes dos cultivos devem ser, preferencialmente, transparentes ou translúcidos para permitir a incidência de luz nos cultivos. Os cultivos devem ser aerados e iluminados naturalmente e/ou artificialmente com intensidade luminosa de 20 – 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$, preferencialmente, a 52 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ até as células atingirem a fase exponencial de crescimento celular. A temperatura do cultivo deve ser mantida entre 10 e 40 °C, preferencialmente, entre $27\pm 1^\circ\text{C}$ em pH de 6,0 a 8,0 preferencialmente 7,2.

[022] As células devem ser concentradas através da separação das células do meio de cultura para a extração de lipídios e seus ácidos graxos com possível propriedade cicatrizante. Os métodos de separação podem ser por sedimentação, centrifugação, filtração, floculação, preferencialmente filtração. Posteriormente, os lipídios podem ser extraídos por métodos físicos, químicos ou associação de ambos, tais como homogeneização, ultrassom, micro-ondas, sonicação, fluidos pressurizados, preferencialmente maceração. Solventes orgânicos podem ser utilizados, preferencialmente, hexano, acetato de etila e etanol, adicionados separadamente em uma proporção de 0,1 (1 mg/mL) até 80% p/v (800 mg/mL), preferencialmente 10 p/v (100 mg/mL), em que a mistura permanece em contato por 1-96h, preferencialmente

48h. Após a extração, a porção sólida foi separada da fração líquida para obtenção do extrato lipídico, por método físico, preferencialmente, filtração. Opcionalmente, a fração sólida deve ser submetida a uma segunda extração na qual o mesmo método deve ser utilizado para otimização da obtenção de extrato.

Exemplos de concretizações da invenção

Exemplo 1. Determinação do cultivo

[023] A microalga *Tetrademus (Scenedesmus) obliquus* (Sisgen 24.416.174/0001-06) isolada do açude de Apipucos (Recife, Pernambuco, Brasil). Este microrganismo foi cultivado em meio líquido em Erlenmeyers de 1L contendo 400 mL de meio de cultivo padrão BG-11 (STANIER et al., Bacteriological Reviews, v. 35, p. 171-205, 1971), com uma concentração inicial de 50 mg/mL, temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, intensidade luminosa de $52\pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^2\text{s}^{-1}$, pH 7,2 e sob constante aeração de ar atmosférico. Após atingir a fase estacionária de crescimento, a biomassa foi concentrada e estocada a 4°C para posterior extração.

Exemplo 2. Determinação dos extratos lipídicos

[024] Os solventes orgânicos, preferencialmente, hexano, acetato de etila e etanol, foram adicionados separadamente, proporção de biomassa:solvente de 1:10 (p/v), em que a mistura permaneceu em contato, preferencialmente, por 48h (ALMEIDA et al., Quím. Nova, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 1-4. Jan, 2018). Posteriormente, o extrato com o solvente foi submetido à filtração para separação da fração sólida e líquida. A fração sólida foi armazenada e posteriormente foi submetida a uma segunda extração pelo mesmo método utilizado na primeira extração para a otimização da obtenção de extratos. Para eliminação total do solvente, o extrato (fração líquida) foi armazenado em frasco de vidro dentro de dessecador. Os extratos foram identificados como EHS (extrato de hexano de *T. obliquus*), EAS (extrato de acetato de etila de *T. obliquus*) e EES (extrato de etanol de *T. obliquus*).

[025] Após a primeira extração (E1) a fração sólida foi submetida a uma nova extração (E2) através do mesmo método utilizado. O solvente acetato de etila extraiu maior quantidade de lipídios durante a primeira extração (E1), obtendo rendimento de 5,05%. Já o solvente hexano atingiu 3,5% e o etanol obteve 1,3% de rendimento. Ao

resgatar a biomassa e realizar o processo de reextração (E2) empregando o mesmo método, o rendimento do EAS alcançou 11,1%, mostrando um rendimento consideravelmente superior ao da primeira extração. O percentual lipídico do EES atingiu 4,4%, que também ultrapassa o rendimento da E1. Este resultado pode ser justificado pela reextração ter conferido uma maior sensibilização na membrana celular das microalgas que conseguiu expor os lipídios de maneira mais eficiente para o meio extracelular auxiliando a extração e gerando um maior rendimento lipídico. Durante a segunda extração o EHS apresentou o menor rendimento lipídico. Em uma terceira extração realizada posteriormente, o extrato de hexano atingiu 2,3% de rendimento.

Exemplo 4. Determinação de ácidos graxos

[026] Os extratos EHS, EAS e EES resultantes dos processos de extrações subsequentes foram avaliados em relação ao perfil dos ácidos graxos através de cromatografia gasosa. Inicialmente foi realizada a conversão dos extratos em ésteres metílicos, através de esterificação (HARTMAN e LAGO, Laboratory Practice., 22, 475-477, 1973); as amostras foram analisadas através de cromatografia gasosa onde uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos foi utilizada como padrão das amostras. O ácido palmítico (C16:0) teve a maior concentração entre todos os ácidos graxos com variação de 18,7% a 20,6%. Em seguida, estão presentes em todos os extratos em quantidades significativas o ácido α -linolênico, conhecido como ômega 3 (C18:3; 15,4% a 19,9%), ácido oleico (C:18:1; 5,74% a 8,93%), ácido láurico (C12:0; 3,28 a 3,07), ácido esteárico (C18:0; 1,82% a 2,33%), ácido palmitoléico (C16:1; 1,18% a 1,64) e ácido linoléico (C18:2; 1,21% a 1,46%).

Exemplo 5. Atividade antimicrobiana

[027] A atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com metodologia de microdiluição em placa (NCCLS, 2003). A bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* UFPEDA700 e as bactérias gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA1019B, e *Escherichia coli* ATCC25922 foram cultivadas em 4mL de meio Muller-Hinton líquido por 18h em estufa bacteriológica, a 37°C. A concentração de bactéria foi de 10⁸ UFC/mL. Os extratos foram ressuspensos em DMSO (2%) e as concentrações dos extratos celulares utilizadas foram de 100mg/ml, 50 mg/ml, 25

mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml e 3,12 mg/ml. A microplaca foi mantida por 24h na estufa bacteriológica, a 37°C, e o crescimento celular foi determinado a 600 nm. O EAS obteve o melhor resultado inibindo o crescimento de todas as bactérias até a menor concentração. O EHS teve resultado positivo até a concentração de 6,25 mg/mL e o EES apenas conseguiu inibir totalmente o crescimento da bactéria *E.coli* na concentração de 100 mg/mL.

REIVINDICAÇÕES

1. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, **caracterizado por** compreender as etapas de: produção da biomassa da microalga, preferencialmente *Tetrademus (Scenedesmus) obliquus*, preparação do extrato celular compreendendo duas extrações consecutivas e apresentando bioativos com potencial cicatrizante e antimicrobiano.
2. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** biomassa ser obtida de cultivos autotróficos, heterotrófico ou mixotrófico, preferencialmente autotrófico.
3. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** preparação do extrato celular no qual consiste na obtenção de lipídios da biomassa em solvente orgânico por métodos como homogeneização, agitação, ultrassom, micro-ondas, sonicação, preferencialmente maceração.
4. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizada pela** utilização de solventes orgânicos, como metanol, água purificada, clorofórmio, acetona, butanol, preferencialmente hexano, acetato de etila ou etanol.
5. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pela** proporção de biomassa:solvente de 0,1 até 80% p/v, preferencialmente 10 % p/v.
6. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de

acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** período extração de 1 até 96h, preferencialmente 48h, seguida de segunda extração nas mesmas condições.

7. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** extrato celular conter ácidos graxos com atividade antimicrobiana, como α -linolênico e linoleico, considerados coadjuvantes em tratamentos para doenças de pele.
8. “EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”, **caracterizado por** extrato orgânico obtido por extrações consecutivas com ácidos graxos com potencial cicatrizante e antimicrobiano.

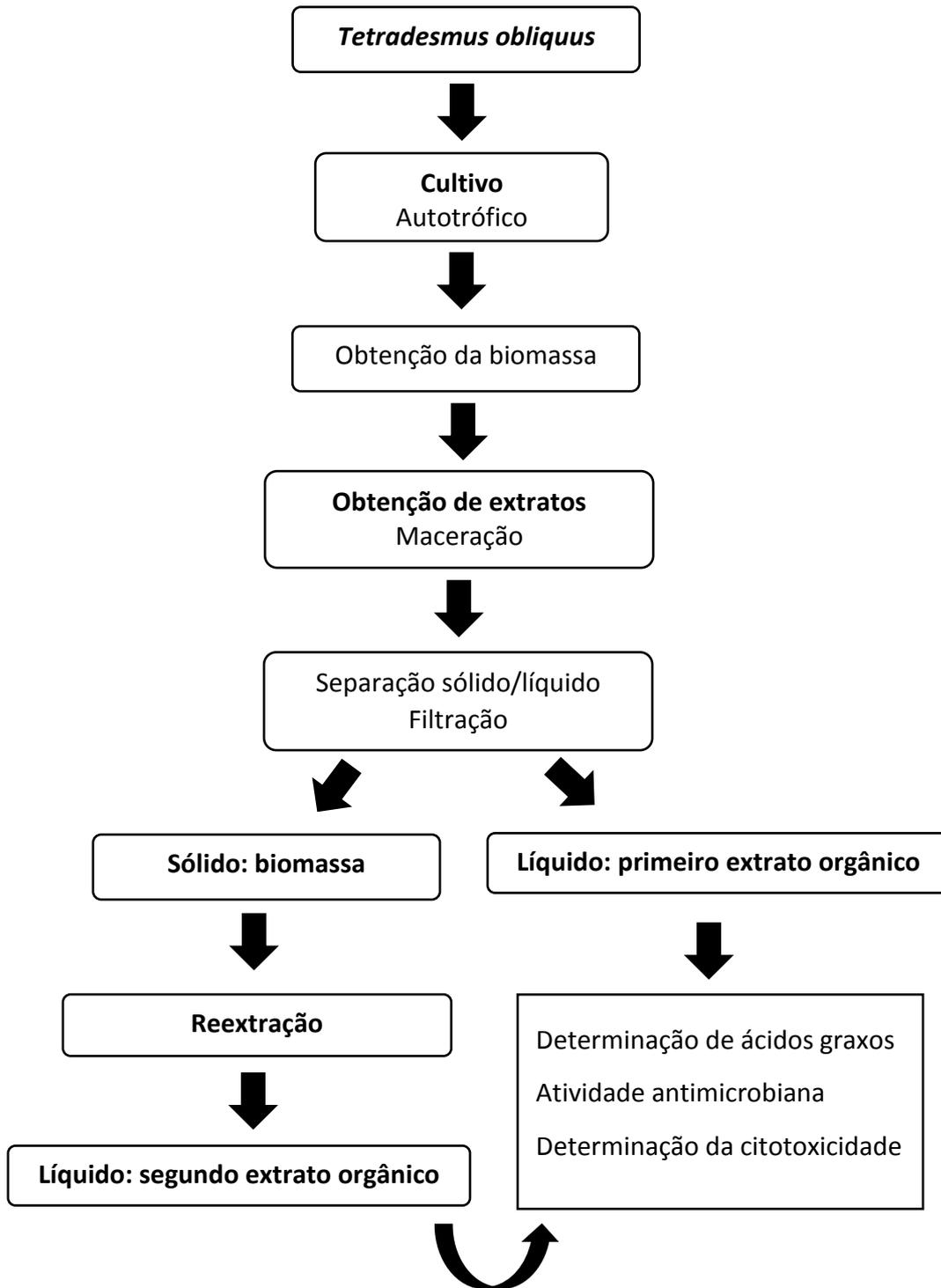


Figura 1

RESUMO

“EXTRATO ORGÂNICO OBTIDO A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES COM POTENCIAL CICATRIZANTE E ANTIMICROBIANO”. A presente patente de invenção refere-se à preparação de um extrato orgânico obtido a partir da biomassa da microalga *Tetrademus (Scenedesmus) obliquus* obtido em duas extrações consecutivas. O extrato apresenta ácidos graxos com potencial antibacteriano e que podem auxiliar no tratamento de lesões em geral, particularmente lesões incisas, escoriações ou lacerações cutâneas. A biomassa microalgal cultivada autotroficamente foi concentrada e a parede celular foi sensibilizada pela utilização de solventes orgânicos obtendo fração sólida e líquida. A fração líquida foi concentrada e denominada de extrato celular e a fração sólida foi reutilizada para uma segunda extração seguindo a mesma metodologia utilizada anteriormente. O extrato apresentou ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico e linolênico que são grandes mediadores pró-inflamatórios com potencial de acelerar o processo de cicatrização, além de não ser tóxico para células da pele e apresentar atividade antibacteriana. Ademais, apresenta um método de extração com maior custo-benefício e produção acessível com aplicação na área da biotecnologia, farmacêutica e nutracêutica que visa, principalmente, contribuir na atividade antibacteriana e em resultados mais rápidos e eficientes na cicatrização e reconstituição do tecido epitelial.