



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102022022600-8 A2

(22) Data do Depósito: 07/11/2022

(43) Data da Publicação Nacional:
21/05/2024

(54) **Título:** PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA

(51) **Int. Cl.:** C07K 14/765; C12P 21/06; C07K 1/14; C07K 1/02; C07K 1/12.

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

(72) **Inventor(es):** ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO; ELIVELTON VERISSIMO DE SOUZA; THIAGO PAJEÚ NASCIMENTO; RENATA VITÓRIA DA SILVA SOBRAL; KETHYLEN BARBARA BARBOSA CARDOSO; JUANIZE MATIAS DA SILVA BATISTA; ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA; ANA CRISTINA LIMA LEITE.

(57) **Resumo:** PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA. A presente proposta de invenção refere-se a uma metodologia para extrair a albumina oriunda do plasma sanguíneo humano, a partir da degradação trombolítica. A técnica proposta é composta pelos seguintes processos: 1] Degradação trombolítica, 2] Obtenção de peptídeos e 3] extração e purificação. A obtenção dos peptídeos é realizada por meio da formação do trombo no plasma sanguíneo humano e em seguida degradado pela serino protease, que foi sintetizada pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262. A extração foi realizada em um tubo de ensaio graduado utilizando o sistema de duas fases aquosas composto por água destilada, Polietilenoglicol (4000g/mol) e sal (fosfato). A albumina foi obtida após a separação das fases, sendo particionada para a fase PEG, onde através de eletroforese PAGE nativo apresentou um peso molecular de 65 KDa. Com isso, pode-se afirmar que esse método tem a capacidade de reduzir as etapas de extração de Albumina do plasma sanguíneo humano, além de otimizar o tempo total do processo e o uso de reagentes danosos a estrutura da molécula de interesse. Nesse sentido, pode ser utilizada por indústrias de biotecnologia, sobretudo nas grandes áreas biomédicas e farmacêuticas.

PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA

Campo da invenção

[001] A presente patente de invenção mostra a extração da Albumina oriunda do plasma sanguíneo humano, que possui um grande interesse nas indústrias de biotecnologia, no intuito de reduzir as moléculas que excedem o substrato nos modelos atuais de extração, além de minimizar os impactos à proteína extraída, otimizando a purificação do produto final. Esta invenção poderá ser aplicada em indústrias e laboratórios incluídas no campo biotecnológico, que buscam alternativas com baixo custo na extração e purificação de produtos biológicos.

Fundamentos de invenção

[002] A albumina é um dos constituintes mais abundantes presentes no sangue, preenchendo em cerca de 50% de suas proteínas totais, sendo produzida por células hepáticas (Peters et al. 1995; Raoufinia et al., *Advanced Pharmaceutical Bulletin* v. 6, n. 4, p. 495-507, 2016). Constituída por cerca de 585 Aminoácidos, tal proteína possui peso molecular de aproximadamente 66,5 KDa (Nakae et al., *Acute Medicine & Surgery* v. 4, n. 3, p. 251-254, 2017), exercendo papéis importantes de atividades biológicas, como a regulação da pressão oncótica, e o auxílio no carreamento de diversos metabólitos e fármacos endógenos e exógenos (Raoufinia et al., *Journal Of Immunoassay And Immunochemistry* v. 39, n. 6, p. 687-695, 2018).

[003] Diversos métodos são utilizados para a extração de Albumina Sérica Humana (ASH). A purificação a frio com etanol, é uma das técnicas mais usuais. Dentre as etapas que compõe o processo descrito acima estão: a extração de etanol separada por precipitação e a eletroforese analítica para monitorização e/ou identificação da albumina. Contudo não conseguem produzir albumina significativamente purificada (Kistler, P. et al., *Methods of plasma Protein, Fractionation Academic Press, London*, p.209, 1980; Jacobs, R. et al., *Journal of Chromatography B*, vol 817, p.145-151, 2005). Além desta, uma outra técnica usada para a purificação de ASH, são os métodos cromatográficos

utilizando coluna DEAE-Sepharose de fluxo rápido e purificado por tampão de acetato, precedido de uma condensação e sedimentação em ação do etanol resfriado (Raoufinia et al., Journal Of Immunoassay And Immunochemistry v. 39, n. 6, p. 687-695, 2018). No entanto, estas metodologias requerem exaustivas etapas até sua conclusão, no que demandaria tempo e matéria prima no que se refere ao custo benefício.

[004] O processo de extração dessas proteínas utilizando Sistemas aquosos bifásicos também foi realizado tendo o plasma do sangue bovino como biopolímero, usando a técnica LASER CO₂ (Farshad et al., Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, v. 163, 2021). No entanto, a adição de mais uma técnica iria tornar o processo mais complexo, além de ter sido utilizado o sangue de boi, o que difere do sangue humano.

[005] A metodologia utilizada para extração de Albumina Sérica Bovina (ABS), deve levar em consideração o teor de extração e pureza, bem como seu rendimento de recuperação. Um sistema bifásico aquoso à base de líquido iônico. Para tanto, ILs à base de imidazólio, fosfônio e amônio, combinados com os ânions acetato, arginato e derivados de Good Buffers, foram sintetizados, caracterizados e aplicados no desenvolvimento de ABS (Rufino et al., Applied Sciences, v. 12, p. 707, 2022). Contudo, os experimentos com o soro do Plasma Sanguíneo Humano ainda estão sendo pouco estudados e pouco se sabe sobre as formas mais eficazes de extração da ASH.

[006] Diferentemente, o processo proposto nesta patente otimiza as etapas de extração preservando a conformação estrutural da proteína, em virtude de apresentar uma purificação da molécula presente no Plasma Sanguíneo Humano sem que haja danos a proteína ou contato com agentes nocivos, reduzindo possibilidade de contaminantes. Com isso, favorece o isolamento e purificação da molécula de interesse de modo mais eficiente.

[007] A presente patente difere do atual estado da técnica, pois propõe a extração da Albumina Sérica Humana utilizando sistema de duas fases aquosas, sem que haja danos a proteína recuperada, além de otimizar o tempo de extração tornando o processo mais rápido.

[008] Os documentos que antecedem a presente patente transcrevem as etapas de extração da Albumina Humana e Bovina a partir do Plasma sanguíneo, de forma diferente do proposto nesta invenção como podem ser analisados nos documentos patentários a seguir.

[009] GB2053926A Descreve a extração da albumina por cromatografia de afinidade em corante de triazina imobilizado de alta capacidade de absorção obtido por imobilização com hidróxido de metal alcalino. Além disso, também é eluída com uma solução contendo um ácido carboxílico, normalmente um sal de metal alcalino, e a albumina pode ser subsequentemente tratada termicamente para melhorar a sua atividade de aumento da aglutinação. O presente invento difere do citado, pois não passa por processos cromatográficos, utilizando S DFA, o que otimiza o custo benefício.

[0010] CN101830979A Descreve um método para separar a albumina sérica usando sistema de extração líquido-sólido. A extração é completa e gera albumina com teor de pureza alto, no entanto no processo é usado o sangue, além de ser repetido duas vezes nos seguintes processos: mistura em um modificador de e sal inorgânico, colocado horizontalmente no sistema de extração líquido-sólido em uma máquina de agitação elétrica e a albumina sérica é extraída para a fase sólida, após isso é adicionado sal orgânico e o sistema volta para a agitação elétrica, aumentando o tempo da técnica. Além disso, sistema é redividido na fase sólida do polímero e a fase líquida da solução salina, e só a partir desses processos a albumina sérica é extraída de volta para a fase líquida. Esta invenção difere da citada por apresentar os processos de separação usando o sistema em repouso, sem utilização de processos mecânicos para agitar, reduzindo os gastos com equipamentos, também é usado apenas o plasma sanguíneo excedente para extração do produto de interesse, cooperando para o custo benefício da matéria prima operada, além da técnica ser feita numa etapa.

[0011] CN106065029A Propõe um método de extração de albumina sérica bovina por varias etapas de concentração e troca de liquido por condução em ultrafiltração em uma solução de dissolução de proteína através de membranas

de ultrafiltração para obter concentrados de proteínas. Esses processos de filtração podem não aproveitar todo o rendimento da albumina desejada, pois algumas moléculas podem ser retidas. Essa invenção difere da citada por não utilizar filtros que faz com que o rendimento bruto do produto seja total.

[0012] CN102675444A Descreve a extração da albumina obtida a partir do suco de folhas de vegetais verde em algumas etapas que incluem a lavagem e trituração das folhas, aquecimento preservando o calor, secagem rápida da proteína da folha de alta pureza a alta temperatura para remover moléculas de glucosinolato e, por fim, separação das proteínas da folha e albumina, repetindo o processo duas vezes. Este invento difere do citado por utilizar técnicas de extração de albumina de origem vegetal.

[0013] CN102746396A Expõe a extração de albumina sérica bovina (ASB) criando uma micela a partir de um tensoativo do tipo Cm-s-Cm, para a extração da ASB na fase aquosa da micela reversa. Utilizando a liofilização a vácuo para obtenção da albumina. A presente invenção difere da citada por usar o soro bovino como fonte de extração da albumina.

[0014] EUA2015/0018475 A1 Propõe um Sistema de duas fases aquosas contendo álcool polivinílico uretanizado e ciclocopolímeros hidrofobicamente modificados formados a partir dos monômeros dialilammonioetanoato, 0-3 mol % de cloreto de dodecildiallamônio e dióxido de enxofre, os copolímeros tendo proporções variadas de polibetaína e polieletrólito aniônico. Essa invenção difere da técnica citada por propor o sistema útil para extração de biopolímeros contendo solventes que podem danificar a estrutura e função da proteína de interesse.

[0015] CN102430265A Descreve uma técnica de sistema de duas fases aquosas formado por surfactante misto ânion/cation que é induzido por fluoroálcool, um método de preparação e uma aplicação. O processo de extração apresentado compreende surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio, surfactante catiônico brometo de hexadecil trimetil amônio, hexafluoroisopropanol e água. Com isso, a técnica citada difere da citada, por

apresentar compostos que podem danificar as funções biológicas e estruturais da albumina.

[0016] CN107789861A Descreve um método de Sistema bifásico aquoso a partir da centrifugação do produto de interesse com hexafluoroisopropanol, sal de separação de fases e água. Difere da invenção proposta por precisar de centrifugação para separação das fases, além de utilizar hexafluoroisopropanol, podendo modificar a conformação da molécula de interesse, devido a sua volatilidade.

Descrição da invenção

[0017] A presente patente de invenção propõe a extração de albumina sérica presente no plasma sanguíneo humano a partir da degradação trombolítica por uma serino protease, utilizando sistemas de duas fases aquosas. Este processo extrai a proteína desejada sem que haja alterações biológicas na mesma, além de otimizar o tempo de trabalho e podendo ser aproveitado em larga escala pelas indústrias de biotecnologia.

[0018] O intuito da presente invenção é apresentar ao mercado uma metodologia de baixo custo benéfico, técnicas confiáveis e de fácil replicação, para uma extração rentável, além de ter baixa toxicidade. Apresenta vantagens por não realizar várias etapas nem utilizar compostos que podem prejudicar a estrutura física e biológica da molécula de interesse, além de não levar produtos contaminantes.

[0019] A metodologia apresentada nesta invenção para a extração da albumina sérica humana é composta pelas etapas a seguir: 1] Obtenção do plasma sanguíneo humano. 2] Obtenção da enzima por meio da fermentação de fungos filamentos 3] Obtenção dos peptídeos: onde são realizadas técnicas de formação do trombo no plasma, degradação trombolítica e a separação dos peptídeos, respectivamente. 4] Extração: onde são realizadas as etapas usando o sistema bifásico aquoso.

[0020] A etapa de obtenção do plasma [1] é realizada no intuito de utilizar apenas as bolsas de plasma excedentes. Os mesmos são obtidos a partir do processo de separação do sangue total rigorosamente avaliado antes de ser liberado, as quais estão dentro dos padrões para o fracionamento. Vários processos e etapas são percorridos para que uma bolsa de plasma seja destinada à indústria produtora de hemoderivados, começando com a seleção de doadores até a sua disponibilização para a indústria. Nos Hemocentros, o sangue total é coletado durante o processo de doação (cerca de ~450 mL) é recolhido em bolsa estéril e descartável. Após essa etapa é passado por um processo físico para a separação dos seus hemocomponentes, como concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas, plasma fresco congelado (PFC), plasma fresco congelado em 24 horas (PFC24), plasma isento de crioprecipitado III (PIC) e crioprecipitado.

[0021] A etapa para obtenção das enzimas [2], são utilizados fungos filamentosos *Mucor subtilissimus* UCP 1262, onde os esporos são coletados utilizando uma solução de nutrientes composta por extrato de levedura de 0,5%, 1% de glicose, 0,01% Tween 80, diluído em previamente esterilizado á 245 mM tampão de fosfato de sódio, pH 7, outro tampão que pode ser utilizado é a solução salina a 0,15M, embora o mais eficaz seja realmente o tampão fosfato de sódio, pH 7. Após a extração dos esporos, eles são contados em uma câmara de Neubauer para dar uma concentração final de 10^7 esporos/mL. Frascos de 125 mL-Erlenmeyer contendo 3,0 g de farelo de trigo com o substrato (teor de umidade de 50%) foram esterilizados autoclavados á 121 C°, 1 atm por 20 min, inoculado com as suspensões acima de esporos do *M. subtilissimus* UCP 1262, e incubado a 25°C por 72 h.

[0022] A extração enzimática é realizada após 72 h de fermentação. Para isso, 7,5 mL de tampão fosfato de sódio de 245 mM, pH 7, são adicionados por g de substrato, e os frascos colocados em shaker orbital a 150 rpm por 90 min em temperatura ambiente. As amostras são então centrifugadas a 3500 rpm por 10 min, e o sobrenadante é usado para determinação da protease e da atividade fibrinolítica.

[0023] Na terceira etapa [3] para obtenção dos peptídeos, são adicionados 1ml do plasma sanguíneo humano em um tubo de ensaio e junto a ele, 200 µL de solução de trombina para que fossem gerados trombos *in vitro* e levado ao banho Maria por 10 minutos à uma temperatura de 37 C°. Após a formação do trombo, são adicionados 200 µL da enzima produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, levados novamente ao banho Maria em dois tempos: 30 minutos e 60 minutos, à 37 C° e o degradado dos trombos são colocados em eppendorf 's e utilizados para as análises dos peptídeos obtidos desta reação.

[0024] A etapa de extração da albumina por sistema de duas fases aquosas [4] são adicionados em tubos de ensaio graduados de forma cônica, 3g de Polietilenoglicol (PEG) 4000, 3.12g de sal fosfato pH 7, 1.87g de água deionizada e 2g do peptídeo obtido da degradação trombolítica. Após a mistura de tudo no vórtex por 1 minuto, o mesmo ficou em repouso absoluto por um período de 60 minutos e obtivemos as duas fases de sal e PEG bem definidas por decantação. Em seguida os volumes das duas fases são mensurados e depois alíquotas das fases são retiradas separadamente para as análises de concentração proteica e suas bioatividades.

Exemplos de concretizações da invenção

Exemplo 1: A obtenção dos peptídeos utilizando uma serino protease produzida por fungos.

[0025] Para obtenção dos peptídeos foram adicionados 1ml do plasma sanguíneo humano em um tubo de ensaio e junto a ele, 200 µL de solução de trombina para que fossem gerados trombos *in vitro* e levado ao banho Maria por 10 minutos à uma temperatura de 37 C°. Após a formação do trombo, foram adicionados 200 µL da enzima produzida pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262, e levados novamente ao banho Maria, à 37 C°. A extração foi obtida após 60 minutos de degradação trombolítica.

Exemplo 2: Extração da albumina por sistema de duas fases aquosas.

[0026] Foram adicionados em tubos de ensaio graduados de forma cônica, 3g de Polietilenoglicol (PEG) 4000, 3.12g de sal fosfato pH 7, 1.87g de água deionizada e 2g do peptídeo obtido da degradação trombolítica. Após a mistura de tudo no vórtex por 1 minuto, o mesmo ficou em repouso absoluto por um período de 60 minutos e obtivemos as duas fases de sal e PEG bem definidas por decantação. No qual a albumina sérica humana concentrou-se na fase polimérica PEG.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA **caracterizada por** realizar a extração da albumina do plasma sanguíneo humano utilizando sistema bifásico aquoso, a partir de degradação trombolítica por uma serino protease.
2. PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** utilizar uma serino protease de origem biológica, sintetizada pelo fungo filamentoso *Mucor subtilissimus* para degradação trombolítica.
3. PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada por** utilizar um sistema de duas fases aquosas constituídos por Polietilenoglicol (PEG) 4000 e sal fosfato (pH 7), para extração da albumina humana a partir do plasma sanguíneo.

RESUMO**PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS DE ALBUMINA**

A presente proposta de invenção refere-se a uma metodologia para extrair a albumina oriunda do plasma sanguíneo humano, a partir da degradação trombolítica. A técnica proposta é composta pelos seguintes processos: 1] Degradação trombolítica, 2] Obtenção de peptídeos e 3] extração e purificação. A obtenção dos peptídeos é realizada por meio da formação do trombo no plasma sanguíneo humano e em seguida degradado pela serino protease, que foi sintetizada pelo fungo *Mucor subtilissimus* UCP 1262. A extração foi realizada em um tubo de ensaio graduado utilizando o sistema de duas fases aquosas composto por água destilada, Polietilenoglicol (4000g/mol) e sal (fosfato). A albumina foi obtida após a separação das fases, sendo particionada para a fase PEG, onde através de eletroforese PAGE nativo apresentou um peso molecular de 65 KDa. Com isso, pode-se afirmar que esse método tem a capacidade de reduzir as etapas de extração de Albumina do plasma sanguíneo humano, além de otimizar o tempo total do processo e o uso de reagentes danosos a estrutura da molécula de interesse. Nesse sentido, pode ser utilizada por indústrias de biotecnologia, sobretudo nas grandes áreas biomédicas e farmacêuticas.