



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 011621 3

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 75095679000149

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua XV de Novembro, 1299 - Centro

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 80060-000

País: Brasil

Telefone:

Fax:

Email: coord.pi@ufpr.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): FORMULAÇÃO À BASE DE POLISSORBATO 20 E TERPENOS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS

Resumo: O presente pedido de invenção trata de uma formulação contendo óleos essenciais como linalool, anetol, carvona e cineol e o tensoativo ou surfactante Polissorbato 20 para controlar, reduzir ou eliminar diferentes contaminantes biológicos tais como bactérias, protozoários ou fungos em cultivos de microalgas. As formulações avaliadas são consideradas amigáveis com o ambiente e não apresentam toxicidade aos cultivos de microalgas.

Figura a publicar: 2

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 4

Nome: DENISSE TATIANA MOLINA AULESTIA

CPF: 01407145967

Nacionalidade: Equatoriana

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Rua Cel. Francisco H dos Santos

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 81530-980

País: BRASIL

Telefone: (41) 984 799135

Fax:

Email: denissemolina.119@gmail.com

Inventor 2 de 4

Nome: JÚLIO CÉSAR DE CARVALHO

CPF: 87779021904

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Cel. Francisco H dos Santos

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 81530-980

País: BRASIL

Telefone: (41) 999 634903

Fax:

Email: jccarvalho@ufpr.br

Inventor 3 de 4

Nome: CARLOS RICARDO SOCCOL

CPF: 27558479991

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Cel. Francisco H dos Santos

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 81530-980

País: BRASIL

Telefone: (41) 999 634903

Fax:

Email: soccol@ufpr.br

Inventor 4 de 4

Nome: SUSAN GRACE KARP

CPF: 04676788983

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Cel. Francisco H dos Santos

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 81530-980

País: BRASIL

Telefone: (41) 333 52814

Fax:

Email: susan.karp@ufpr.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Resumo	Resumo.pdf
Relatório Descritivo	Relatório descritivo.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	OB810511.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

RESUMO**FORMULAÇÃO À BASE DE POLISSORBATO 20 E TERPENOS PARA CONTROLE
DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS**

O presente pedido de invenção trata de uma formulação contendo óleos essenciais como linalool, anetol, carvona e cineol e o tensoativo ou surfactante Polissorbato 20 para controlar, reduzir ou eliminar diferentes contaminantes biológicos tais como bactérias, protozoários ou fungos em cultivos de microalgas. As formulações avaliadas são consideradas amigáveis com o ambiente e não apresentam toxicidade aos cultivos de microalgas.

FORMULAÇÃO À BASE DE POLISSORBATO 20 E TERPENOS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção trata de uma formulação contendo terpenos e um tensoativo ou surfactante como substâncias de controle para reduzir ou eliminar contaminantes de diferentes tipos (bactérias, protozoários ou fungos) em cultivos de microalgas. Esta invenção tem aplicação na área de processos e produtos para alimentação humana e animal, biomoléculas para a área farmacêutica, cosmética e biocombustíveis.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. As microalgas são microrganismos fotossintéticos que podem ser unicelulares, cenobiais, multicelulares ou coloniais. Devido à alta eficiência fotossintética e facilidade de crescimento em diferentes tipos de substratos ou resíduos é possível produzir biomassa para ser utilizada em diversos setores industriais, tais como alimentar, farmacêutico, cosmético, energético, entre outros. As primeiras tecnologias foram desenvolvidas utilizando os cultivos de *Chlorella* e *Spirulina* com produções superiores a 35 toneladas por ano.

[003]. A biomassa pode ser produzida mediante dois tipos de sistemas: abertos e fechados, porém alguns fatores como o metabolismo das microalgas, custo de produção, energia usada, nutrientes e tipo de produto determinarão a escolha das melhores condições. Atualmente, por exemplo, o mercado das microalgas encontra-se na faixa de 4 até 300 dólares por kg de biomassa seca.

[004]. Os sistemas fechados permitem o cultivo em condições foto autotróficas, mixotróficas ou heterotróficas com redução na incidência de contaminação. Por outro lado, os sistemas abertos são geralmente usados por serem mais econômicos que os fechados. Dentre as desvantagens dos sistemas abertos destacam-se a menor produtividade quando comparado aos sistemas fechados e a maior dificuldade no controle da pureza dos cultivos. Sabe-se que os contaminantes biológicos podem atuar nas culturas como competidores, parasitos ou consumidores, gerando perdas ou danos significativos nos cultivos e portanto na indústria.

[005]. Em termos de tecnologia, atualmente, métodos físicos e químicos são usados com o objetivo de diminuir ou controlar os contaminantes biológicos presentes nos cultivos de microalgas. Por exemplo, na patente **CN104069521A** detalha-se o uso de dióxido de cloro em concentrações de 0.1 até 20 ppm. Já na patente **CN108865894A/B**, observa-se a aplicação de uma solução feita à base de diferentes antibióticos. Adicionalmente, o controle de contaminantes biológicos pode ser realizado usando formulações que contêm um conjunto de sais e ácidos (bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônio, cloreto de cálcio, dióxido de cloro, tiosulfato de sódio, ácido cítrico, selenito de sódio, ácido fúlvico) como é mostrado na patente **CN107624791A** depositada pela empresa *BEIHAI HAIJIAN BIOTECHNOLOGY CO LTD*.

[006]. Adicionalmente, alguns processos físicos são descritos nas patentes **US009181523B1** e **WO20140/74790A1** nas quais o controle é baseado nas mudanças de pH e o no tratamento dos cultivos com campos elétricos, respectivamente. Adicionalmente, as tecnologias podem combinar o uso de metodologias físicas e químicas. Por exemplo, na patente **CN107513499A**, depositada pela empresa *ENN SCI &*

TECHNOLOGY DEV CO LTD é usada uma combinação de cloro e centrifugação aumentando a eficiência do processo.

[007]. Porém, todas as metodologias anteriormente descritas não são suficientes para controlar a contaminação nos cultivos de microalgas devido à baixa especificidade dos processos, fato que limita a aplicação industrial. Além disso, nas patentes citadas no estado da técnica é possível observar que as formulações usadas se encontram focadas no uso de substâncias que podem ser tóxicas para os cultivos de microalgas, ou permanecer nos efluentes do processo após colheita das microalgas, causando impacto ambiental ou exigindo tratamentos custosos após sua aplicação. Portanto, há necessidade de gerar protocolos que possam usar formulações naturais e ambientalmente amigáveis tais como terpenos e surfactantes, substâncias propostas na presente invenção.

[008]. Até o momento da escrita desse pedido de proteção foram encontrados documentos publicados referentes às formulações de terpenos com atividade biológica (**GB2408933A**; **WO2005113128A1**; **WO2014151449A1**) porém sendo usados como formulações biocidas para o controle de bactérias patogênicas na indústria humana (geração de fármacos) e alimentar (controle de contaminantes na produção de alimentos).

[009]. No pedido BR1020200142500 se descreve o processo de aplicação dos terpenos para reduzir os contaminantes bacterianos. No entanto, a novidade apresentada aqui é uma formulação contendo combinações de surfactante e terpenos que reduzem os contaminantes biológicos nos cultivos de microalgas.

Descrição da abordagem do problema técnico

[010]. Um dos principais problemas nos sistemas de produção de microalgas é a contaminação microbiana, a qual implica em dificuldades de processo e perdas econômicas. Em processos abertos a contaminação pode destruir os cultivos em 48 horas, resultando na perda parcial ou total (crash) dos mesmos, causando problemas econômicos.

[011]. Atualmente, o uso de substâncias naturais é uma ferramenta que permite controlar ou reduzir os contaminantes presentes nos cultivos de microalgas. Os terpenos são um grupo de compostos voláteis naturais produzidos como metabólitos secundários em plantas e são conhecidos principalmente pelas propriedades bactericidas e fungicidas, sendo amplamente utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, entre outras (Guimarães et al., *Molecules*, v. 24, p. 2471, 2009; Ali et al., *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v 5, p. 601-611, 2015; Bakkali et al., *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446-475, 2008). O grupo principal é composto por terpenos, terpenoides e outros compostos aromáticos e alifáticos. A ação antibacteriana pode ser influenciada pelas características estruturais e concentrações usadas (Silva et al., *Molecules*, v. 17, p. 6305-6316, 2012).

[012]. Embora aproximadamente 3000 terpenos sejam conhecidos hoje em dia, apenas cerca de 300 são comercialmente aplicados em diferentes tipos de indústrias. Sendo assim, a prospecção de atividade antimicrobiana dos terpenos e o desenvolvimento de formulações são estratégias interessantes para controle de microrganismos contaminantes.

[013]. Terpenos como *trans*-cinamaldeído, alfa e beta-pineno, limoneno, carvona, entre outros têm sido estudados para emprego no controle de diversos patógenos clínicos devido a suas propriedades antimicrobianas (Doyle, et al., *Fitoterapia*, v. 139, p. 104405, 2019; Rivas da Silva et al., *Molecules*, v. 17, p. 6305-6316, 2012). Porém,

nenhuma dessas substâncias têm sido testadas em cultivos de microalgas para controle ou redução de contaminantes biológicos.

[014]. Apesar da atividade antimicrobiana, a característica hidrofóbica dos terpenos limita sua aplicação direta em cultivos das microalgas. Portanto, se faz necessário o uso de substâncias que facilitem a dispersão dos terpenos nos cultivos. Os surfactantes são um grupo de compostos orgânicos anfílicos, ou seja, possuem partes hidrofóbicas e hidrofílicas amplamente usados na indústria como emulsionantes para dispersão e solubilidade de substâncias tais como os terpenos (Dias Ribeiro, *Estratégias de Processamento Verde de Saponinas da Biodiversidade Brasileira*, tese).

[015]. Essas substâncias são aplicadas em formulações de produtos com aplicabilidade nas indústrias alimentar, cosmética, farmacêutica, petrolífera e outras. Entretanto, aspectos como biodegradabilidade, bioacumulação, toxidez e irritação podem limitar seu uso. Por esse motivo, existe uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos derivados da indústria petroquímica por outros de origem natural.

[016]. Os polissorbatos (PSs) (PS20, PS80) são uma família de surfactantes não iônicos amplamente utilizados como excipientes em alimentos e produtos farmacêuticos. Seu alto valor de equilíbrio hidrofílico-lipófilo e uma baixa concentração crítica de micelas (CMC) são responsáveis pela alta atividade superficial, mesmo sendo usado em baixas concentrações. Por exemplo, em biofarmacêuticos encontram-se na faixa de 0,01 e 1 mg. mL⁻¹ (Martos A. et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v 106, p. 1722- 1735, 2017).

[017]. Atualmente as formulações contendo Tween 20 ou 80 (PS20, PS80) são unicamente usadas na indústria alimentar e farmacêutica, existindo poucos estudos sobre o desenvolvimento de

formulações ou produtos para o controle de contaminação biológica em cultivos de microalgas. No entanto, esse uso em outras atividades atesta a baixa toxicidade do surfactante. Portanto, o objetivo é gerar produtos ambientalmente amigáveis de menor poder poluente que possuam agentes ambientalmente amigáveis como, por exemplo, os produtos naturais (terpenos) e tensoativos (Tween 20/80) utilizados na presente invenção.

[018]. Partindo dessas informações, a presente invenção apresenta como vantagens o uso de substâncias com atividade antimicrobiana e surfactantes os quais exibem mínimo impacto no metabolismo das microalgas. Além disso, a presente invenção utiliza substâncias químicas naturais (terpenos), diferente dos trabalhos citados no estado da técnica, nos quais o controle de contaminação é feito usando métodos físicos ou químicos sem origem natural. Adicionalmente, a biomassa poderia não precisar de tratamentos após aplicação do método descrito na presente invenção.

Listagem das figuras

[019]. Figura 1 - Tubos contendo as formulações com o surfactante ou tensoativo Polissorbato 20 e os terpenos linalool.

[020]. Figura 2 - Redução dos contaminantes biológicos (bactérias) em cultivos da microalga *Neochloris oleoabundans* usando o terpeno linalool na faixa de 6.25 ppm até 100 ppm.

Descrição detalhada da Invenção

[021]. A invenção consiste em uma formulação contendo os seguintes terpenos: linalool, anetol, carvona ou cineol e o seguinte surfactante ou tensoativo: Polissorbato 20. Para isso, os terpenos encontram-se na faixa de 0.125% até 15% (m/m) enquanto os

surfactantes encontram-se na faixa de 0.5% até 10% (m/m). O processo de mistura é realizado a temperatura ambiente com agitação mecânica durante 10 minutos.

[022]. A mistura contendo terpenos e surfactantes é ressuspensa em água correspondendo a 70% até 85% (m/m), mantendo a agitação mecânica por 10 minutos. As misturas são então armazenadas em frascos lacrados, previamente esterilizados. Com o objetivo de avaliar a estabilidade das soluções, as formulações foram mantidas a temperatura ambiente e em estufa a 35 °C.

[023]. As formulações finais poderão ser adicionadas diretamente nos cultivos de microalgas nas seguintes concentrações: com 6.25 ppm espera-se uma inibição de 50% até 70%; com uma adição de 12.5 ppm até 50 ppm a redução será de até 85% enquanto com uma concentração de 100 ppm a inibição poderá ser de até 99%.

[024]. As formulações serão adicionadas nos cultivos de microalgas contaminados deixando-as atuar durante algumas horas, preferencialmente de 1 até 24 horas.

Exemplos

Exemplo 1: Obtenção de formulação ou formulações contendo o surfactante Polissorbato 20 e os terpenos linalool, anetol, carvona ou cineol.

[025]. Foram adicionados entre 0.5% e 10% (m/m) do surfactante Polissorbato 20 em béqueres contendo entre 0.125 e 15% (m/m) dos terpenos linalool, anetol, carvona ou cineol, para controle de contaminação em cultivos de microalgas. O processo de mistura foi realizado à temperatura ambiente, com agitação mecânica durante 10 minutos. Finalmente, foram adicionados entre 70% e 85% (m/m) de água

mantendo a agitação mecânica durante mais 10 minutos. Todo o processo foi realizado em duplicata e as formulações finais foram armazenadas em tubos estéreis. Na tabela 1 descreve-se algumas das formulações realizadas.

[026]. A estabilidade das formulações foi avaliada mediante a formação de espuma a temperatura ambiente e em estufa a 35 °C. Adicionalmente, foram avaliadas a geração de microbolhas ou a presença de várias fases. Na figura 1 pode-se observar os tubos com as formulações finais, nenhuma delas apresentou formação de microbolhas ou a presença de fases distintas.

[027]. Para o controle dos contaminantes, inicialmente deve-se controlar a presença ou quantidade dos contaminantes biológicos (bactérias) nos cultivos de microalgas. Por exemplo, toma-se uma alíquota de 100 µL do cultivo homogêneo da microalga, por exemplo, *Neochloris oleoabundans*, para realizar as diluições, até 10⁻⁶. Para determinar o número de unidades formadoras de colônia uma alíquota de 100 µL das diluições 10⁻³ e 10⁻⁴ pode ser espalhada em placas de ágar nutriente (utilizando a técnica de *spread plate*), com incubação a 25°C durante 24 horas.

[028]. Finalmente, deve-se determinar a presença e/ou quantidade de bactérias finais no cultivo. Para isto, pode ser utilizado o mesmo procedimento de determinação de contaminantes iniciais.

[029]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado por bactérias pertencentes ao gênero *Microbacterium* sp., apresentou uma redução de 90% até 97% usando o terpeno linalool (figura 2).

[030]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado por bactérias pertencentes ao gênero *Shinella* sp., apresentou uma redução de 99% usando o terpeno linalool (figura 2).

[031]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado por bactérias pertencentes ao gênero *Aureimonas* sp., apresentou uma redução de 80% até 90% usando o terpeno linalool (figura 2).

[032]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado por bactérias pertencentes ao gênero *Exiguobacterium* sp., apresentou uma redução de 70% até 80% usando o terpeno linalool (figura 2).

Tabela 1. Exemplos de Formulações usando surfactante
Polissorbato 20

Terpeno	Porcentagem (m/m surfactante)	Porcentagem (m/m terpeno)
Linalool	2	0.125
Linalool	1.5	0.15
Linalool	1	0.5
Linalool	0.5	1
Linalool	0.15	2
Linalool	0.5	5
Linalool	0.5	10
Linalool	0.5	15
Anetol	0.5	1.5
Anetol	0.5	15
Anetol	1.5	10
Carvona	1.5	1.5
Carvona	10	10
Carvona	10	15
Cineol	1.5	1.5
Cineol	0.5	15
Cineol	10	10

DESENHOS

Figura 1

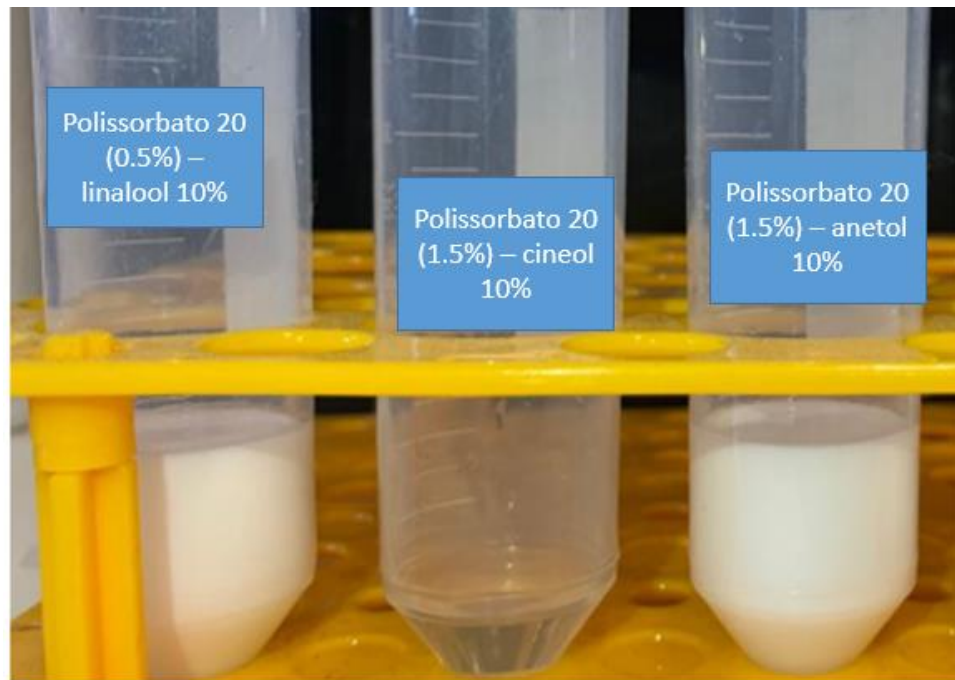
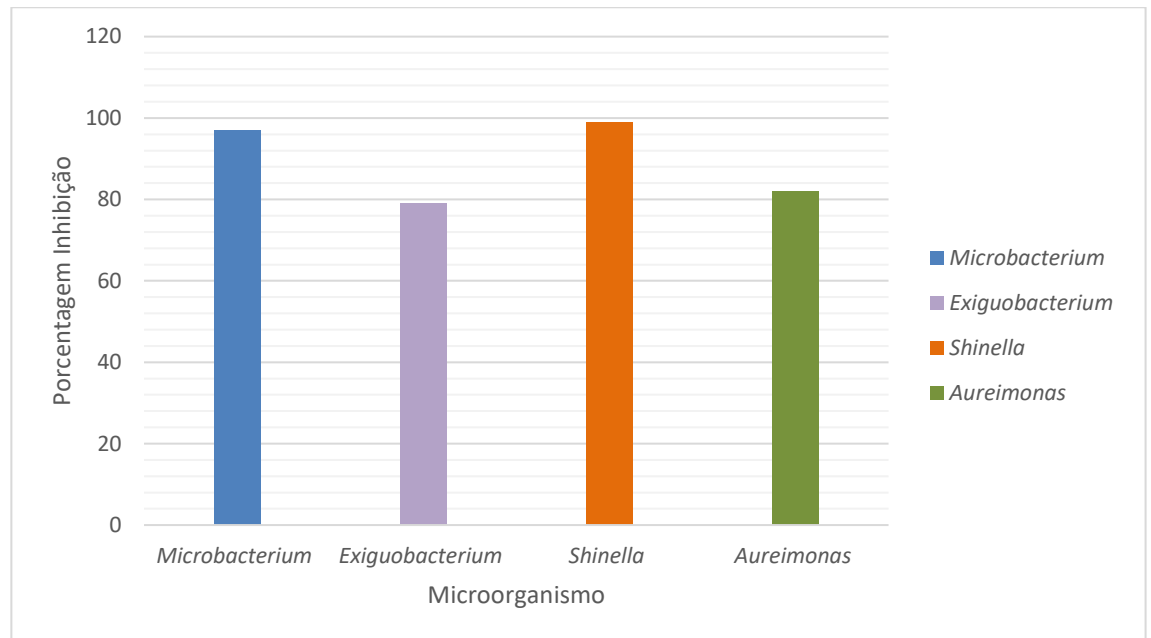


Figura 2



REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO caracterizada por conter terpeno natural e surfactante como ingredientes ativos para o controle de contaminação biológica em cultivos microalgais.
2. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o terpeno ser linalool, anetol, carvona ou cineol.
3. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o surfactante ou tensoativo ser Polissorbato 20.
4. FORMULAÇÃO de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada pelo fato de o terpeno estar presente na concentração de 0.125 a 15% (m/m).
5. FORMULAÇÃO de acordo com as reivindicações 1 e 3, caracterizada pelo fato de o surfactante estar presente na concentração de 0.5 a 10% (m/m).
6. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter entre 70% e 85% (m/m) de água.
7. USO de formulação tal qual descrita nas reivindicações anteriores, caracterizado pela aplicação em culturas microalgais em dosagem de 6.25 ppm até 100 ppm, para controle de contaminação biológica.

Nº do documento	Data	Descrição
2022OB810511	02/12/2022	ORDEN BANCÁRIA (OB)

Fase	Tipo de documento	Valor do documento
PAGAMENTO	OB FATURA	R\$ 210,00

Observação do documento

PAGAMENTO DE FATURA 29409161958716056/29409161958716234/29409161958716749 INPI, PROC 075718/2022-03, SUPERINTENDENCIA DE PARCERIAS E INOVACAO

DADOS DO FAVORECIDO

CPF/CNPJ/Outros	Nome
00.000.000/0001-91	BANCO DO BRASIL SA
	(*) Este favorecido é um intermediário que recebe o recurso e repassa para os favorecidos finais em faturas.

DADOS DO ÓRGÃO PAGADOR

Órgão Superior	Órgão / Entidade Vinculada	Unidade Gestora	Gestão
26000	26241	153079	15232
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA	UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

DETALHAMENTO DO DOCUMENTO

Processo

075718/2022-03

Relação de Empenhos Pagos pelo Documento

EMPENHO	SUBITEM	PAGO	INSCRITO EM RESTOS A PAGAR	RESTOS A PAGAR CANCELADOS	RESTOS A PAGAR PAGOS
2022NE003532	TAXAS	210,00	0,00	0,00	0,00

ANTERIOR

PRÓXIMA

Exibir 15 result

DOCUMENTOS RELACIONADOS



BAIXAR

DATA	FASE	DOCUMENTO RESUMIDO	ESPÉCIE
11/11/2022	EMPENHO	2022NE003532	NÃO SE APLICA

ANTERIOR

PRÓXIMA

Exibir 15 result

BANCOS DESTINATÁRIOS

CÓDIGO DA LISTA	CÓDIGO DO BANCO	NOME DO BANCO	NÚMERO DA AGÊNCIA	VALOR DO LANÇAMENTO
Nenhum registro encontrado				

ANTERIOR

PRÓXIMA

Exibir 15 result

FATURAS PAGAS

CÓDIGO DA LISTA	SEQUÊNCIA	CÓDIGO DO FAVORECIDO	FAVORECIDO	VALOR LANÇAMENTO	VALOR DESCONTO	VALOR JUROS	VALOR DEDUCAO	VALOR ACRÉSCIMO
153079152 322022LF0 01210	3	42.521.088/ 0001-37	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDA DE INDUSTRIAL	R\$ 70,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00
153079152 322022LF0 01210	2	42.521.088/ 0001-37	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDA DE INDUSTRIAL	R\$ 70,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00
153079152 322022LF0 01210	1	42.521.088/ 0001-37	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDA DE INDUSTRIAL	R\$ 70,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00	R\$ 0,00

ANTERIOR

PRÓXIMA

Exibir 15 result

PRECATÓRIOS PAGOS

CÓDIGO DA LISTA	NÚMERO DA PARCELA	VALOR PRACATÓRIO
Nenhum registro encontrado		

ANTERIOR

PRÓXIMA

Exibir 15 result