



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102023011976-0 A2

(22) Data do Depósito: 16/06/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
05/12/2023

(54) Título: FORMULAÇÃO À BASE DE ÁLCOOL GRAXO ETOIXILADO E TERPENOS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS

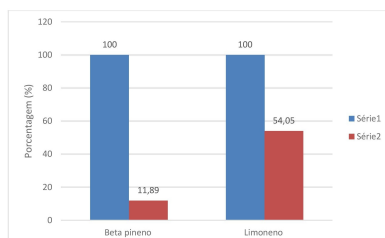
(51) Int. Cl.: A01N 27/00; A01N 25/30; A01P 1/00.

(52) CPC: A01N 27/00; A01N 25/30.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): DENISSE TATIANA MOLINA AULESTIA; JÚLIO CÉSAR DE CARVALHO; CARLOS RICARDO SOCCOL; LAURA SEBBEN GALARCE.

(57) Resumo: FORMULAÇÃO À BASE DE ÁLCOOL GRAXO ETOIXILADO E TERPENOS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS. O presente pedido de invenção trata de uma formulação contendo terpenos como limoneno e beta-pineno e o tensoativo ou surfactante ÁLCOOL GRAXO ETOIXILADO 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 ÁLCOOL GRAXO ETOXILADO 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, eliminar ou controlar contaminantes bacterianos 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. Atualmente, por exemplo, o mercado das microalgas encontra-se na faixa de 4 até 300 dólares por kg de biomassa seca.

[003]. A biomassa pode ser produzida mediante dois tipos de sistemas: abertos e fechados, porém fatores como o metabolismo das microalgas, custo de produção, energia usada, nutrientes e tipo de produto determinarão a escolha das melhores condições.

[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, como bactérias, protozoários e fungos podem atuar nas culturas como competidores, parasitos ou consumidores, gerando perdas ou danos significativos nos cultivos e, portanto, na indústria.

[005]. Alguns métodos físicos e químicos podem ser usados com o objetivo de controlar, reduzir ou eliminar os contaminantes biológicos presentes nos cultivos de microalgas. Idealmente, esses métodos não afetam a microalga, mas matam ou inibem o crescimento de organismos contaminantes. Por exemplo, nas patentes **CN104069521A** e **CN108865894A/B** detalha-se o uso de dióxido de cloro em concentrações de 0.1 até 20 ppm, além de soluções feitas à base de antibióticos. Além disso, os controles podem ser realizados baseados nas mudanças de pH (**US009181523B1**) ou na combinação de processos físicos como centrifugação e hipoclorito de sódio (**CN107513499A**).

[006]. Em termos de tecnologia, atualmente, a patente BR1120170082322B1 descreve uma formulação elaborada usando o terpeno limoneno e diferentes tipos de tensoativos (aniônicos e aniônico não polimérico). No entanto, as faixas reportadas são maiores (50% do terpeno limoneno, 10% de tensoativo) que as utilizadas no presente pedido. Adicionalmente, a composição é utilizada para o controle de insetos ou ácaros, sendo uma formulação para tratar plantas e safras, e não para aplicação em meios líquidos.

[007]. As metodologias e formulações anteriormente descritas não são suficientes ou específicas para controlar a

contaminação nos cultivos de microalgas devido à sua baixa especificidade, 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 controle de pragas que afetam plantas vasculares, enquanto essas substâncias, se usadas em cultivos de microalgas, podem ser tóxicas, ou permanecer nos efluentes do processo após a colheita das microalgas, causando impacto ambiental ou exigindo tratamentos custosos após sua aplicação. Portanto, há necessidade de gerar formulações e protocolos de aplicação que contenham produtos naturais e ambientalmente amigáveis, tais como terpenos, substâncias propostas na presente invenção.

[008]. 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

[009]. 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, resultando na perda parcial ou total (*crash*) dos mesmos, causando problemas econômicos.

[010]. Atualmente, o uso de substâncias naturais é uma ferramenta que permite controlar, reduzir ou diminuir os contaminantes presentes nos cultivos de microalgas. Os óleos essenciais são um grupo de compostos voláteis naturais, lipofílicos e odoríferos produzidos como

metabólitos secundários em plantas e conhecidos desde a antiguidade principalmente pelas propriedades terapêuticas. Alguns deles possuem atividades anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais, citotóxicas e antimicrobianas (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).

[011]. Os principais compostos em óleos essenciais são terpenos, terpenoides e outros compostos aromáticos e alifáticos. A ação antibacteriana desses compostos depende das 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, linalool entre outros têm sido estudados para o controle de diversos patógenos clínicos ou alimentares, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* K2068, *Escherichia coli* O 157:H7 devido a suas propriedades antimicrobianas (Santos De Oliveira Dias, et al., *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, 2022; Liu, et al., *Microbial Pathogenesis*, v. 141, p. 103980, 2020; Doyle, et al., *Fitoterapia*, v. 139, p. 104405, 2019; Rivas da Silva et al., *Molecules*, v. 17, p. 6305-6316, 2012).

[014]. Embora a toxicidade de alguns desses terpenos tenha sido avaliada na microalga *Neochloris oleoabundans*, as faixas de concentração dos terpenos e forma de aplicação avaliados são diferentes das apresentadas no presente relatório (Molina-Aulestia, et al.,

Journal of Applied Phycology, v. 34, p. 261–267, 2022). Além disso, a faixa efetiva contra bactérias não foi avaliada nesse documento.

[015]. 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 anfifílicos, 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).

[016]. 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 limitam o uso dos surfactantes. Motivo pelo qual existe uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos derivados da indústria petroquímica por outros de origem natural.

[017]. Atualmente, os tensoativos de interesse industrial são biodegradáveis, também conhecidos como tensoativos verdes. Tais substâncias reduzem o impacto ambiental por serem degradados pelos microrganismos presentes na natureza e, devido à ausência de ramificações nas cadeias carbônicas, a biodegradabilidade dessas moléculas pode ocorrer em até mais ou menos 24 horas (Nitschke, et al., *Quim. Nova*, v. 25, p. 772-776, 2002).

[018]. O surfactante álcool graxo etoxilado é um tensoativo biodegradável, não iônico, com alto desempenho desengraxante, sendo adequado para uma ampla variedade de aplicações industriais como produção de detergentes e desengordurantes. Atualmente, os

estudos usando esse surfactante são orientados a formulações que possam ser usadas no controle de insetos, como foi descrito anteriormente no estado da arte. Para o controle de contaminação biológica em cultivos de microalgas, atualmente, não há formulações baseadas no uso de tensoativos álcool graxo etoxilado e terpenos. No entanto, esse uso em outras atividades atesta a baixa toxicidade do surfactante. Portanto, o objetivo é gerar produtos amigáveis de menor poder poluente que possuam agentes ambientalmente amigáveis como, por exemplo, os produtos naturais (terpenos) e surfactantes biodegradáveis (álcool graxo etoxilado) como o utilizado na presente invenção.

[019]. 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 contempla formulações autodispersantes que utilizam substâncias químicas naturais (terpenos), em concentrações menores que as apresentadas nos trabalhos citados no estado da arte, 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

[020]. A figura 1 apresenta os tubos contendo as formulações com o surfactante álcool graxo etoxilado C10 e os terpenos limoneno e beta-pineno.

[021]. A figura 2 apresenta a redução dos contaminantes biológicos (bactérias) em cultivos da microalga *Neochloris oleoabundans* usando o terpeno limoneno e beta-pineno em 100 ppm.

Descrição detalhada da Invenção

[022]. A invenção consiste em uma formulação contendo os seguintes terpenos: limoneno ou beta pineno e o seguinte surfactante ou tensoativo: álcool graxo etoxilado C10. Para isso, os terpenos podem estar presentes na faixa de 0.05% até 0.1% (m/m), ainda que os melhores resultados sejam obtidos na faixa de 0.09% a 0.1% (m/m) quando o terpeno é o beta-pineno; enquanto o surfactante encontra-se na faixa de 4 até 5% (m/m). O processo de mistura é realizado a temperatura ambiente com agitação mecânica durante 10 minutos.

[023]. A mistura contendo terpenos e surfactante é reesuspensa em água correspondendo entre 94.90% até 95.95% (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.

[024]. As formulações finais poderão ser adicionadas diretamente nos cultivos de microalgas nas seguintes concentrações: entre 90 ppm até 100 ppm espera-se uma inibição de 53% até 88% usando o terpeno beta-pineno; com uma adição de 90 ppm até 100 ppm, conforme a tabela 1 usando o terpeno limoneno a redução será de 40% até 50%.

[025]. As formulações devem ser adicionadas nos cultivos de microalgas contaminadas deixando-as atuar durante algumas horas, preferencialmente durante 24 horas.

Exemplos

Exemplo 1: Obtenção de formulação ou formulações contendo o surfactante álcool graxo etoxilado e os terpenos beta-pineno ou limoneno.

[026]. Foram adicionados 4g do surfactante álcool graxo etoxilado C10 em béqueres contendo 0.1g dos terpenos beta-pineno ou limoneno, 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 95.95g 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 e a faixa que apresentou os resultados surpreendentes.

[027]. 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.

[028]. 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.

[029]. 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.

[030]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado inicialmente com 18,5 MUFC (milhões de unidades formadoras de colônia) apresentou uma redução entre 53% até 88% usando uma concentração entre 90 ppm até 100 ppm do terpeno beta-pineno. A concentração final das bactérias controladas foi de 1,63 MUFC, resultado que se destaca aos dados apresentados no estado da técnica (figura 2).

[031]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado inicialmente com 18,5 MUFC apresentou uma redução de 40% até 50% usando uma concentração entre 90 ppm e 100 ppm do terpeno limoneno. A concentração final das bactérias controladas foi de 8,56 MUFC, resultado que se destaca aos dados apresentados no estado da técnica (figura 2).

Tabela 1. Exemplos de Formulações usando surfactante Álcool Graxo etoxilado C10

Terpeno	Porcentagem (m/m) terpeno	Porcentagem (m/m) surfactante	Porcentagem de redução das formulações com maior potencial	Dosagem usada (ppm)
Beta-pineno	0.05	4	53	90
Beta-pineno	0.09	4	82	100
Beta-pineno	0.1	5	88	100
Limoneno	0.05	4	40	90
Limoneno	0.09	4	45	90
Limoneno	0.1	5	50	100

REIVINDICAÇÕES

1. FORMULAÇÃO para o controle de contaminação biológica em cultivos microalgais caracterizada por conter os terpenos beta-pineno ou limoneno e o surfactante ou tensoativo álcool graxo etoxilado C10 como ingredientes ativos.
2. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o terpeno estar presente na concentração de 0.05% a 0.1% (m/m).
3. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de o terpeno beta-pineno estar presente, preferencialmente, na concentração de 0.09% a 0.1%.
4. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de o surfactante estar presente na concentração de 4% a 5% (m/m).
5. FORMULAÇÃO de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter entre 94.90% e 95.95% (m/m) de água.
6. USO da formulação, conforme definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pela aplicação em culturas microalgais, em dosagem de 90 – 100 ppm, para controle de contaminação biológica.

DESENHOS

Figura 1

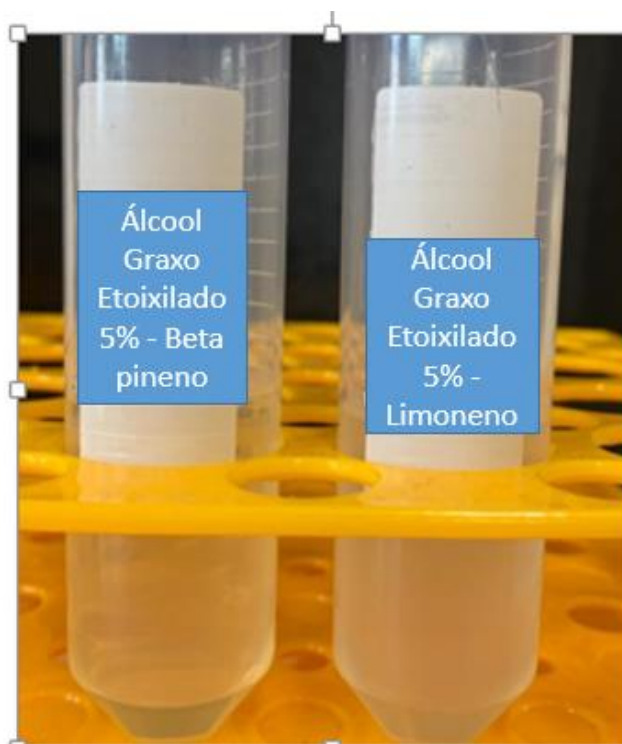
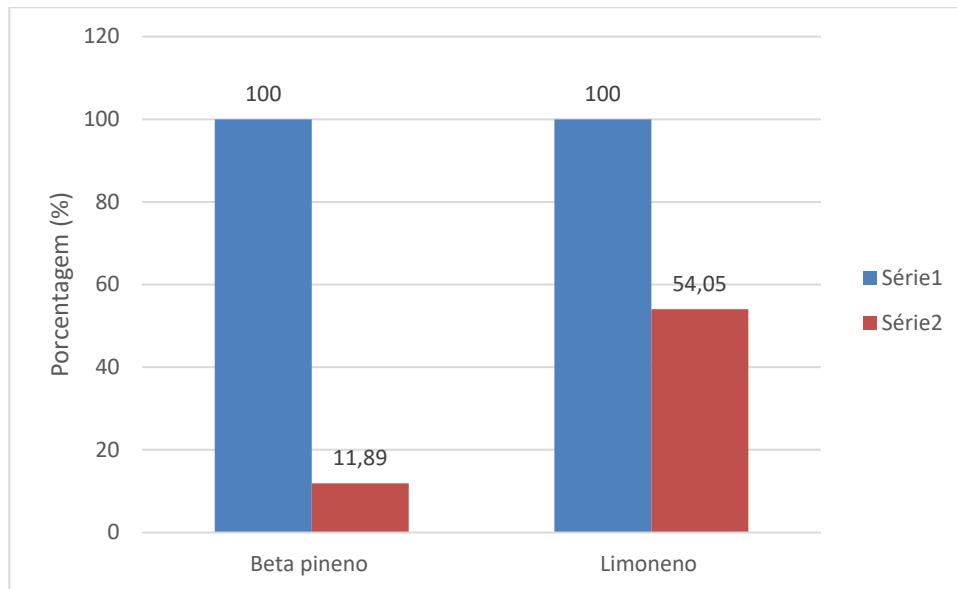


Figura 2



RESUMO**FORMULAÇÃO À BASE DE ÁLCOOL GRAXO ETOIXILADO E TERPENOS PARA
CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE
MICROALGAS**

O presente pedido de invenção trata de uma formulação contendo terpenos como limoneno e beta-pineno e o tensoativo ou surfactante ÁLCOOL GRAXO ETOIXILADO 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.