



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(21) BR 102023012701-0 A2

(22) Data do Depósito: 23/06/2023

(43) Data da Publicação Nacional:
09/04/2024

(54) **Título:** FORMULAÇÃO À BASE DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) E TERPENOS PARA CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO BIOLÓGICA EM CULTIVOS DE MICROALGAS

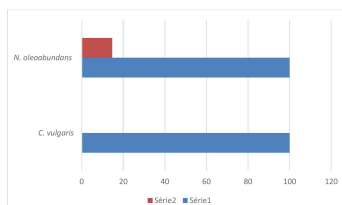
(51) **Int. Cl.:** A01N 27/00; A01N 35/06; A01N 25/30; A01P 1/00.

(52) **CPC:** A01N 27/00; A01N 35/06; A01N 25/30.

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

(72) **Inventor(es):** DENISSE TATIANA MOLINA AULESTIA; JÚLIO CÉSAR DE CARVALHO; CARLOS RICARDO SOCCOL; ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO À BASE DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) 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 LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) 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.



RELATÓRIO DESCRITIVO

FORMULAÇÃO À BASE DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) 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 4 até 300 dólares por kg de biomassa seca.

[003]. A biomassa pode ser produzida mediante dois tipos de sistemas: abertos e fechados, porém alguns fatores como metabolismo da microalga, 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 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 significativas nos cultivos e, portanto, na indústria.

[005]. Alguns métodos físicos e químicos ou a combinação deles 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, 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. Além disso, a empresa *BEIHAI HAIJIAN BIOTECHNOLOGY CO LTD* descreve na patente **CN107624791A** formulações que contêm um conjunto de sais e ácidos tais como, bicarbonato de sódio, bicarbonato de amônio, cloreto de cálcio, dióxido de cloro, tiosulfato de sódio, ácido cítrico, selenito de sódio, e ácido fúlvico para o controle de contaminantes biológicos.

[006]. Adicionalmente, alguns processos físicos são descritos nas patentes **US009181523B1** e **WO20140/74790A1** nas quais o controle é baseado nas mudanças de pH e no tratamento dos cultivos com campos elétricos, respectivamente. As tecnologias podem combinar o uso de

metodologias físicas e químicas. Na patente **CN107513499A**, depositada pela empresa *ENN SCI & TECHNOLOGY DEV CO LTD* é usada uma combinação de cloro e centrifugação para aumentar a eficiência do processo.

[007]. 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 nesse documento são maiores (50% do terpeno limoneno e aproximadamente 10% de tensoativo) que as utilizadas no presente pedido. Adicionalmente, a formulação é utilizada para o controle de insetos ou ácaros, sendo um produto para tratar plantas e safras, e não para aplicação em meios líquidos.

[008]. Adicionalmente, o documento CN1465244A apresenta um inseticida sanitário usado para controle de insetos no campo agrícola, e não para aplicação em meios líquidos. A formulação é elaborada usando o terpeno d-citreno, um agente surfactante Lauril sulfato de sódio ou n-alkil benzeno sulfonato de sódio, um agente diluente podendo ser água ou álcool e finalmente um agente estabilizante como gama-lactonas, aldeído de pêssego e óleo de silicone. Entretanto, o terpeno utilizado na formulação é diferente ao reportado no presente pedido (limoneno ou beta-pineno), além das faixas utilizadas (terpeno 1%-10%, surfactante 1%-21%) serem maiores as apresentadas no relatório. Adicionalmente é necessária a adição de substâncias que permitam estabilizar o produto (gama-lactonas, aldeído de pêssego e óleo de silicone) etapa que não é realizada no presente pedido devido que a formulação proposta apresenta estabilidade a diferentes temperaturas.

[009]. 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 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.

[010]. 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

[011]. 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.

[012]. 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).

[013]. 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).

[014]. 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.

[015]. 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).

[016]. 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.

[017]. 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. Esses compostos são 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).

[018]. Essas substâncias são aplicadas em formulações de produtos com aplicabilidades nas indústrias alimentar, cosmética, farmacêutica, petrolífera e outras. Entretanto, aspectos como biodegradabilidade, bioacumulação, toxicidade e irritação podem limitar seu uso. Motivo pelo qual existe uma tendência de substituição dos surfactantes sintéticos derivados da indústria petroquímica por outros de origem natural.

[019]. Lauril Sulfato de sódio (LSS) ou Lauril éter sulfato de sódio (LESS) são tensoativos aniônicos sulfatados utilizados no mercado de cosméticos, para higiene do cabelo, devido ao seu alto poder de detergência, boa formação de espuma e baixo custo (Braga, *tese Análises Comparativas de Formulações Cosméticas Sulfatadas X Formulações Não Sulfatadas*, 2016).

[020]. Atualmente as formulações contendo Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Lauril éter sulfato de sódio (LESS) são unicamente usadas na indústria cosmética, farmacêutica, alimentar e no controle de insetos, como foi descrito anteriormente no estado da arte. Atualmente, não há formulações baseadas no uso de tensoativos Lauril sulfato de sódio ou

Lauril éter sulfato de sódio e terpenos para o controle de contaminação biológica em cultivos de microalgas. No entanto, o 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 amigáveis como, por exemplo, os produtos naturais (terpenos) e tensoativos (Lauril Sulfato de Sódio ou Lauril éter sulfato de sódio) utilizados na presente invenção.

[021]. 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 não precisaria de tratamentos após aplicação do método descrito na presente invenção.

Listagem das figuras

[022]. Figura 1. Tubos contendo as formulações com surfactante ou tensoativo Lauril sulfato de sódio ou Lauril éter sulfato de sódio e os terpenos Limoneno e Beta-pineno.

[023]. A figura 2 apresenta a redução dos contaminantes biológicos (bactérias) em cultivos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Neochloris oleoabundans* usando a concentração de 100 ppm dos terpenos limoneno e beta-pineno.

Descrição detalhada da Invenção

[024]. A invenção consiste em uma formulação contendo os seguintes terpenos: limoneno ou beta-pineno e os seguintes surfactantes ou tensoativos: Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Lauril Éter Sulfato de Sódio (LESS). Para isso, os terpenos podem estar presentes na faixa de 0.05% até 0.1% (m/m), ainda que os melhores resultados sejam na faixa de 0.075% até 0.1% (m/m) quando o terpeno é o limoneno ou 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.

[025]. A mistura contendo terpenos e surfactantes 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.

[026]. As formulações finais poderão ser adicionadas diretamente nos cultivos de microalgas nas seguintes concentrações: entre 50 ppm até 100 ppm espera-se uma inibição de 100% usando o terpeno beta-pineno no cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, conforme a tabela 1; com uma adição de 90 ppm até 100 ppm, conforme a tabela 1 usando o terpeno limoneno a redução será de 80% até 90% no cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans*.

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

Exemplos

Exemplo 1: Obtenção de formulação ou formulações contendo o surfactante Lauril Sulfato de Sódio (LSS) e os terpenos limoneno ou beta-pineno.

[028]. Foram adicionados 4g do surfactante Lauril Sulfato de Sódio (LSS) ou Lauril éter sulfato de sódio em béqueres contendo 0.1g dos terpenos limoneno ou beta-pineno, 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 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.

[029]. 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 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.

[030]. 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* ou *Chlorella vulgaris*, 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.

[031]. 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.

[032]. Um cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* contaminado inicialmente com 36,5 MUFC (milhões de unidades formadoras de colônia) apresentou uma redução de 100% usando uma concentração entre 50 ppm até 100 ppm do terpeno beta-pineno. A concentração final das bactérias controladas foi de 0 MUFC, resultado que se destaca aos dados apresentados no estado da técnica (figura 2).

[033]. Um cultivo da microalga *Neochloris oleoabundans* contaminado inicialmente com 18,5 MUFC apresentou uma redução de 89% usando uma concentração entre 90 ppm e 100 ppm do terpeno limoneno. A concentração final das bactérias controladas foi de 16,6 MUFC, resultado que se destaca aos dados apresentados no estado da técnica (figura 2).

Tabela 1. Exemplos de Formulações usando surfactante Lauril Sulfato de Sódio (LSS)

Terpeno	Porcentagem (m/m) terpeno	Porcentagem (m/m) surfactante	Porcentagem de redução das formulações com maior potencial	Dosagem do terpeno (ppm)	Volume usado da formulação (mL/L)
Beta-pineno	0.075	4	100	50 ppm	66,67 mL/L
Beta-pineno	0.1	5	100	100 ppm	100 mL/L
Limoneno	0.075	4	89	90 ppm	120 mL/L
Limoneno	0.1	5	89	100 ppm	100 mL/L

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 Lauril sulfato de sódio ou Lauril éter sulfato de sódio 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 os terpenos beta-pineno e limoneno estarem presentes, preferencialmente, na concentração de 0.075% 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, caracterizado pela aplicação em culturas microalgais, em dosagem de 50 – 100 ppm, para controle de contaminação biológica.

DESENHOS

Figura 1

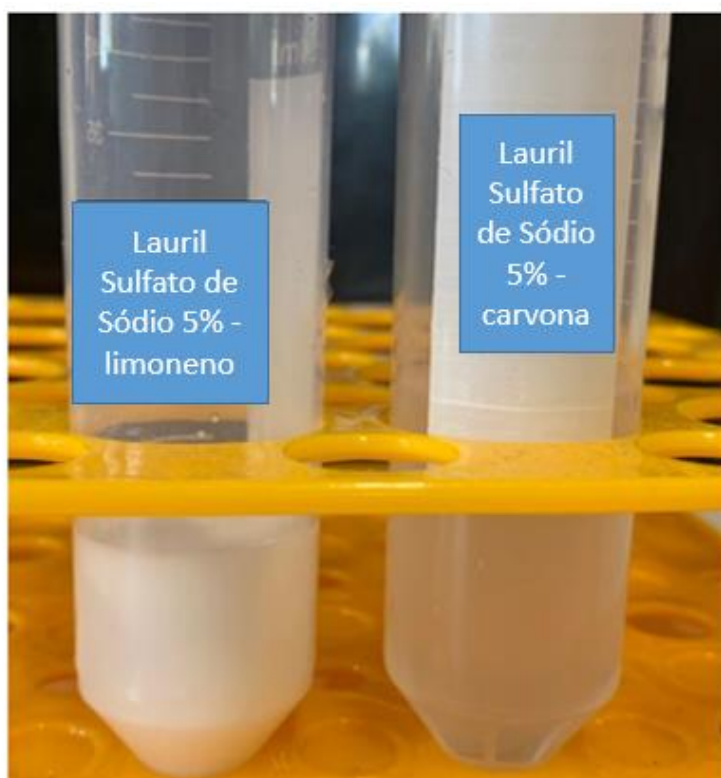
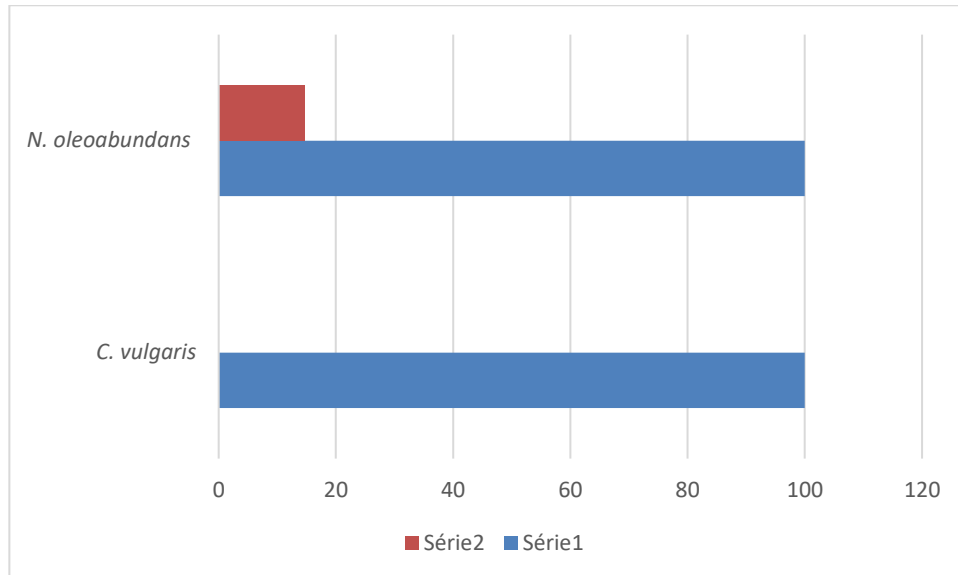


Figura 2



RESUMO**FORMULAÇÃO À BASE DE LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) 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 LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS) 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.