República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 1005241-0 A2

(22) Data de Depósito: 17/12/2010

(43) Data da Publicação: 28/07/2015
(RPI 2325)

(54) Título: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PIGMENTOS LIBERADOS NO MEIO, EM CULTIVOS DE MICROALGAS DA CLASSE EUSTGMATOPHYCEAE

(51) Int.Cl.: C12N1/12; C09B61/00

(73) Titular(es): Universidade Federal Rural de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Pernambuco

(72) Inventor(es): Ana Lucia de Figueiredo Porto, Eduardo Pereira Gomes, José Luiz de Lima Filho, Ranilson de Souza Bezerra, Suzan Diniz Santos, Tatiana Souza Porto

(57) Resumo: PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PGMEMTOS LIBERADOS NO MEIO, EM CULTIVOS DE MICROALGAS DA CLASSE EUSTGMATOPHYCEAE A presente invenção diz respeito a um Processo para obtenção de pigmentos liberados no meio, em cuilivos de mieroalgas da classe Eus/igniatophycecic. O processo 5de acordo com a presente invenção primeiramente induz, por meio da manipulação das condições de cultivo, a produção aumentada de pigmentos entre eles carotcnóides. Em um segundo momento do processo, através de simples técnicas de centrifugação há a separação dc uma biomassa rica cm polissacarídeos, células viáveis, e do bioproduto, pigmento contendo carolenóides, que poderá ter diversas aplicações.

RELATÓRIO DESCRITIVO DA PATENTE DE INVENÇÃO

PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE PIGMENTOS LIBERADOS NO MEIO, EM CULTIVOS DE MICROALGAS DA CLASSE *EUSTIGMATOPHYCEAE.*

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a um processo para a indução da produção aumentada e de separação seletiva de um composto bioativo caracterizado como pigmento, contendo carotenóides, de alto valor agregado em cultivo de microalgas da classe *Eustigmatophyceae*. Mais particularmente, a presente invenção refere-se primeiramente ao ajuste das condições de cultivo que tornem favoráveis a produção aumentada do referido pigmento que é liberado no meio de cultura pela microalga da classe *Eustigmatophyceae*. Em um segundo momento há o processo de recuperação e separação, através de simples técnicas de centrifugação, do pigmento carotenóide rico em astaxantina.

DESCRIÇÃO DO ESTADO DA TÉCNICA

Microalgas, nome atribuído a um vasto grupo (cerca 40.000 espécies catalogadas) de microrganismos, fototróficos, ou mesmo heterotróficos facultativos,

estão na base da cadeia alimentar e são responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2007). Comercialmente já são explorados bioprodutos originários de culturas microalgais aplicáveis na indústria química, de alimentos e de fármacos, tais como pigmentos, gorduras, óleos, açúcares e componentes bioativos funcionais (OLAIZOLA, 2003; SPOLAORE et al., 2006).

As microalgas são organismos fotossintetizantes, utilizam eficientemente a energia solar para fixar CO_2. Apresentam uma variedade de pigmentos, destacando-se, a clorofila e os carotenóides (SANCHEZ *et al.,* 2005). Os carotenóides nas microalgas apresentam funções importantes no sistema fotossintético e no sistema de fototaxia. Como pigmentos acessórios, eles captam energia luminosa de comprimento de onda que são fracamente captados pela clorofila, aumentando desta forma a eficácia da fotossíntese. Além disso, os carotenóides desempenham um papel protetor, por dissipar eficazmente o excesso de energia, prevenindo a formação de espécies reativas de oxigênio e desativando o oxigênio singleto gerado durante o processo de fotossíntese, o que é a base para seu poder antioxidante (JACKSON, 2008).

As microalgas da classe *Eustigmatophyceae* são encontradas em águas doces, salobras e marinhas, sendo algas unicelulares cocóides, com parede celular polissacarídica e de aparência verde-amareladas, sendo agrupadas em sete gêneros contendo cerca de 12 espécies. (ANDERSEN *et al.*, 1998). HIBBERD & LEEDALE (1970) observaram a presença de um eyespot fora do cloroplasto, no zoósporos de certas células coccoides, esta característica foi chave para distinguir, organismos antes classificados como xantoficeaes, em uma nova classe denominada *Eustigmatoficeae* - nome derivado do grego *eu- verdadeiro* e *stigma-spot- ponto*, com referência ao eyespot

(também conhecido como stigma). O eyespot faz parte do complexo responsável pelo sistema de fototaxia da célula flagelada caracterizando-se por ser um corpo vermelho-alaranjado composto de gotículas (contendo carotenóides), sendo desprovido de membrana. Os cloroplastos amarelo-esverdeados também contém pigmentos como a clorofila *a* e o carotenóide violaxantina, como o principal pigmento acessório . Outros pigmentos carotenóides acessórios em *Eustigmatophyceae* são o beta-caroteno, vaucheriaxantina, e outras xantofilas como astaxantina e cantaxantina. (VAN DEN HOEK, et al, 1995; VOLKMAN et al. 1993; LEE, R. E. 1999).

O gênero *Nannochloropsis sp.* pertencente a classe *Eustigmatoficeae* contém uma gama de pigmentos como por exemplo clorofila *a*, beta-caroteno, violaxantina, vaucheriaxantina e outras xantofilas como cantaxantina e astaxantina (ketocarotenoides). Este gênero é resistente a variações ambientais e de fácil cultivo sendo utilizado como alimento na aqüicultura, como fonte de pigmentos e ácidos graxos poliinsaturados PUFA (SUKENIK, 2000; TONON et al., 2002; ZITTELLI et al., 2003).

Carotenóides como a astaxantina têm um forte potencial antioxidante. Extratos naturais de microalgas contendo astaxantina têm sido aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) para consumo humano como nutricêuticos, suplemento alimentar, fabricação de padrões, entre outros (NIKI, 2010). Astaxantina representa 28% do mercado mundial de carotenóides o qual foi de US$ 766 milhões em 2007 com expectativa de crescimento anual de 2,3% até o ano de 2015 (MARZ, 2008).

Com a manipulação das condições ambientais de cultivo (luz, temperatura e nutrientes, etc) muitas espécies de microalgas podem ser induzidas a sintetizar metabólitos de interesse como proteínas, carboidratos, lipídeos e pigmentos entre eles

carotenóides. (DAYANANDAA *et al.*, 2007; TAKAGI, 2006; GORDILLO *et al.*, 2001). Não necessitando de precipitação, tampouco solos férteis, as microalgas toleram variadas condições ambientais como as de regiões áridas e semi-áridas, utilizando águas salinizadas de aqüíferos, estuários ou do oceano. O uso de águas residuais também pode suprir os nutrientes requeridos para seu crescimento e produção. (TAKAGI et al., 2006; ARESTA et al., 2005; TSUKAHARA & SAWAYAMA, 2005; SHEEHAN et al., 1998). Desta forma as microalgas podem ser produzidas em sistemas abertos ou fechados em regiões semi-áridas e em solos não férteis, utilizando água salobra de aqüíferos, marinha ou mesmo residuais.

Existem patentes nacionais relacionadas processos e produtos provenientes de microalgas como processos de produção com o objetivo de se obter biomassa, formas de conservação, obtenção de extratos e para produção de biogás (PI0701072-9 A2; PI0801270-9 A2; PI 0605365-3 A; PI0804611-5 A2; WO 2008/000431 A2 e PI0703245-5 A2). Várias patentes internacionais reivindicam métodos e processos de cultivo e separação de pigmentos entre outros (US 2005/0214897 A1; US 2007/0196894 A1; EP 1 138757 A1 e US 7306669 B1), porém não se encontra contemplado em patente o processo para a produção aumentada, recuperação e separação do pigmento contendo carotenóides liberado no meio pela microalga da classe *Eustigmatophyceae,* que é o objeto da presente invenção.

APRESENTAÇÃO DOS PROBLEMAS EXISTENTES

A obtenção de pigmentos naturais comumente envolve complexas técnicas de custo elevado, além do uso de solventes não recomendados por órgãos de controle como 5o FDA (USA) e ANVISA (BR), quando o produto é destinado ao uso farmacêutico, alimentício ou cosmético. Por outro lado, em muitos casos tais pigmentos estão complexados a outras substâncias e estão presentes no meio intracelular, o que torna o processo de extração e separação laborioso, refletindo no custo final do produto.

10 A presença de alguns bioprodutos, provenientes do metabolismo celular, são resíduos que no meio de cultivo tornam-se, muitas vezes, um fator limitante inibindo o crescimento e a obtenção de altas densidades celulares nos sistemas de cultivo. Para tornar economicamente viável o cultivo de microalgas em larga escala são necessários esforços no sentido de otimizar o rendimento do produto principal e de aproveitar 15outros bioprodutos gerados, agregando valor à produção.

APRESENTAÇÃO DA SOLUÇÃO EM LINHAS GERAIS

A presente invenção vem solucionar os problemas citados, não apenas quando 20propõe um processo de cultivo que proporciona um aumento na produção de pigmentos das microalgas para o meio extracelular (meio de cultura), mas quando também propõe um processo caracterizado pela simplicidade e pelo baixo custo, que recupera tal composto bioativo.

A técnica, objeto do presente pedido de patente, recupera o pigmento , composto bioativo que é liberado no meio, não sendo necessário assim o uso de técnicas laboriosas para a acessibilidade do composto bioativo como a ruptura celular, a extração do interior da célula ou a descomplexação de outras substâncias nos compartimentos celulares.

Outra vantagem da técnica ora exposta é que os pigmentos contendo carotenóides como astaxantina são liberados no meio livres de clorofila, portanto não se faz necessário a separação desta por meio de solventes químicos comumente utilizados na recuperação de pigmentos carotenóides de microalgas.

O composto bioativo, pigmento contendo carotenóides, poderá ser utilizado também na produção de extratos contendo carotenóides por meio das técnicas de extração com solventes (preferencialmente reagentes GRAS aprovados pelo FDA/ANVISA) ou outras técnicas de extração de carotenóides.

A presente invenção vem agregar valor ao processo de cultivo da microalga da classe *Eustigmatophyceae* devido ao aproveitamento de um resíduo que antes era descartado contribuindo com o manejo sustentável do processo. Somando-se que a retirada dos subprodutos metabólicos propicia a reutilização do meio para realimentar o sistema de cultivo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO

Processo para obtenção de pigmentos liberados no meio de cultura em cultivos de microalgas da classe E*ustigmatophyceae,* se caracteriza primeiramente pela indução

do cultivo para uma produção aumentada do referido pigmento. Esta indução se dá pela manipulação das condições de cultivo como se segue: Quando a cultura estiver próximo a atingir o final da fase logarítmica aplica-se um regime de fotoperíodo variando entre 8 e 16 horas de escuro. Durante a fase clara do referido fotoperíodo ajusta-se a intensidade de iluminação incidente entre a faixa de 20 a 80μmol quanta m^{-2} s^{-1}, e/ou do comprimento de onda na ordem de 450 a 500 nanômetros. Em paralelo reduz-se a agitação ou a aeração a condições de 20 a 50 rpm ou 0,2 a 0,5 vvm respectivamente. Em seqüência é cessada a oferta da fonte de nitrogênio.

O aumento da concentração de pigmentos pode ser observado pela leitura espectrofotométrica (480nm) do meio de cultura centrifugado a 4.500 por 3 min. Decorrido 3 a 5 dias obedecendo o referido procedimento realiza-se a separação das células viáveis e do meio contendo os pigmentos e outros resíduos provenientes do metabolismo celular. Esta separação ocorre por processo de centrifugação. Inicialmente a baixas rotações, em torno de 500 a 1500 rpm, por um período de 1 a 3 min a 4° C separa-se os resíduos de alta densidade provenientes do metabolismo, como parede celular e outros agregados rico em polissacarídeos. O sobrenadante daí resultante passará por uma seqüência de centrifugações obedecendo a um aumento de rotação que proporcione primeiramente a precipitação das células viáveis, podendo a velocidade de rotação variar entre 2000 rpm a 4500 rpm por um período de 3 a 5 min. a 4° C. Com o sobrenadante resultante desta última centrifugação será realizada mais um passo de centrifugação a uma rotação entre 10.000 e 18.000 rpm por um período de 5 a 10 min. a 4° C. O precipitado obtido que é o produto bioativo, pigmento contendo carotenóides, poderá ter aplicação direta, ou passar por processo de secagem, liofilização ou passar

por processo de extração com solventes preferencialmente os GRAS ou outros processos de extração para então ser utilizado. O líquido sobrenadante, translúcido resultante do último processo de centrifugação pode ser enriquecido com nutrientes e ser destinado para realimentar o sistema de cultivo.

EXEMPLO E EXEMPLO COMPARATIVO

A microalga *Nannochloropsis oculata* UTEX LB 2164 é cultivada em água marinha adicionada do meio de cultura Guillard f/2 em condições estéreis em um fotobioreator com volume de trabalho de 4l. Como características físico-químicas de cultivo: temperatura constante de 25° C; inoculo de 10^6 células; aeração inicial de 1 vvm e iluminação inicial de 80 μM quanta m^{-2} s^{-1} de intensidade de luz incidente (ILI), obedecendo um foto período de 12h/12h (claro/escuro); regime de alimentação da fonte de nitrogênio, seguindo uma adição diária do equivalente a 1/5 da concentração do meio Guillard; pH 8,5 mantido por adição de gás CO_2 ou NaOH 1,5M. O crescimento celular é acompanhado por contagem de células em câmara de Neubauer. Verificado o final da fase exponencial a aeração é cessada, a iluminação convertida para 10 μM quanta m^{-2} s^{-1} de ILI, o fotoperíodo 8h:16h claro/escuro; também a alimentação com nitrogênio é interrompida, a cultura é levemente agitada. Após este período de 3 dias a cultura é centrifugada primeiramente a uma velocidade 800 rpm por 2 min a 4° C. O precipitado resultante contendo resíduos de cultivo rico em polissacarídeos é separado e o sobrenadante é mais uma vez centrifugado a 3.500 rpm por 5 min. a 4° C, tendo como precipitado células viáveis. O sobrenadante resultante é mais uma vez centrifugado a

15.000 rpm por 10 min a 4° C. O precipitado resultante, o produto bioativo, pigmento contendo carotenóides. Para verificação da composição de carotenóides do bioproduto, procede-se uma extração com solvente orgânico para posterior identificação e quantificação dos carotenóides por meio da técnica de HPLC. O protocolo da análise em HPLC é conduzido utilizando uma coluna C18 fase reversa DIONEX ACCLAIN, 5 μm, 120 Å, 46 x 100 e o equipamento ÄKTA Purifier de injeção automática, controlado pelo software UNICORN 4.11. A cromatografia isocrática a 23 °C a um fluxo de 0,2 mL min^{-1}, volume de injeção 50 μL e os picos detectados a um comprimento de onda de 480 nm. Através do presente processo pode-se obter do composto bioativo liofilizado 102mg g^{-1} de pigmentos carotenóides dos quais 367 μg ml^{-1} é de astaxantina.

Fica, portanto demonstrado que a utilização do processo de produção aumentada e separação seletiva de pigmentos liberados no meio de cultivo das microalgas da classe *Eustigmatophyceae* induz a sintetiza metabólica de um bioproduto, pigmento contendo carotenóides e separa seletivamente este bioproduto pigmento que poderá ter aplicação direta, ou passar por processo de secagem, liofilização ou passar por processo de extração com solventes preferencialmente os GRAS ou outros processos de extração para então, ser utilizados pela indústria química, de alimentos, de cosméticos e de fármacos.

REIVINDICAÇÕES

Processo para obtenção de pigmentos liberados no meio, em cultivos de microalgas da classe E*ustigmatophyceae,* **caracterizado por:**

1. Através da manipulação das condições de cultivo e extração dos pigmentos, resultar na indução para a produção aumentada destes pigmentos;

2. aplicar um regime de fotoperíodo variando ente 8 a 16h quando a cultura atingir o final da fase logarítmica e, durante a fase clara do referido fotoperíodo, a intensidade de iluminação incidente ser ajustada entre a faixa de 20 a 80 μmol quanta m^{-2} s^{-1}, e/ou do comprimento de onda na ordem de 450 a 500 nanômetros.

3. estar incluso no processo a redução da agitação ou aeração para condições de 20 a 50 rpm ou 0,2 a 0,5 vvm respectivamente;

4. promover em seqüência a diminuição ou cessação da oferta de nitrogênio ou qualquer fator que favoreça o aumento da relação carbono:nitrogênio.

5. separar seletivamente o pigmento presente no meio de cultura, por processo de centrifugação onde primeiramente em baixas rotações, entorno de 500 a 1.500 rpm é obtida biomassa rica em polissacarídeos como pecipitado.

6. Prosseguir a separação descrita na reinvindicação número 5, a obtenção de células viáveis a partir de centrifugação do sobrenadante resultante da centrifugação anterior nas condições de rotação entre 2000 rpm a 4500 rpm provenientes.

7. realizar o processo de separação seletiva do pigmento que ocorre por processo de centrifugação do sobrenadante resultante da reinvindicação 6 nas condições de rotação entre 10.000 rpm a 18.000 rpm onde se obtém como sobrenadante o líquido translúcido (que adicionado com nutrientes e ser destinado para realimentar o sistema de 5cultivo) e como precipitado um produto bioativo, caracterizado como pigmento contendo carotenóides que poderá ter aplicação direta, ou passar por processo de secagem, liofilização ou passar por processo de extração com solventes preferencialmente os GRAS ou outros processos de extração para então, ser utilizados pela indústria química, de alimentos, de cosméticos e de fármacos.

RESUMO

A presente invenção diz respeito a um Processo para obtenção de pigmentos liberados no meio, em cultivos de microalgas da classe *Eustigmatophyceae*. O processo 5de acordo com a presente invenção primeiramente induz, por meio da manipulação das condições de cultivo, a produção aumentada de pigmentos entre eles carotenóides. Em um segundo momento do processo, através de simples técnicas de centrifugação há a separação de uma biomassa rica em polissacarídeos, células viáveis, e do bioproduto, pigmento contendo carotenóides, que poderá ter diversas aplicações.