



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102019006567-2

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102019006567-2

(22) Data do Depósito: 01/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 29/10/2019

(51) Classificação Internacional: C05F 11/08.

(52) Classificação CPC: C05F 11/08.

(54) Título: HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DE MICROALGA E OBTENÇÃO DE PRODUTO À BASE DE AMINOÁCIDOS LIVRES PARA USO AGRÍCOLA

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA, Órgão Público. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, CURITIBA, PR, BRASIL(BR), 80010-200, Brasileira

(72) Inventor: GILDA MÓGOR; ATILA FRANCISCO MÓGOR; VINCE ÖRDÖG; ZOLTÁN MOLNÁR.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 01/04/2019, observadas as condições legais

Expedida em: 23/06/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



“HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA DE MICROALGA E OBTENÇÃO DE PRODUTO À BASE DE AMINOÁCIDOS LIVRES PARA USO AGRÍCOLA”

Campo da Invenção

[001].A presente patente de invenção propõe a técnica da hidrólise da biomassa da microalga *Arthrospira* sp. (*Spirulina* sp.), reconhecida fonte proteica, e seu uso como biofertilizante para a agricultura, sendo este produto isento de substâncias agrotóxicas e capaz de atuar direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade.

[002].Estudos desenvolvidos com a microalga (cianobactéria) indicaram a eficiência da hidrólise enzimática na quebra das moléculas proteicas em suas ligações peptídicas reduzindo-as às frações de aminoácidos livres, os quais podem atuar no metabolismo vegetal promovendo o crescimento das plantas.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003].Aumentar a produção agrícola preservando o meio ambiente tem sido um desafio constante para as pesquisas científicas, já que os sistemas agrícolas de produção precisam atender às demandas crescentes por alimentos com a introdução de tecnologias sustentáveis.

[004].Nesse sentido, existe a busca cada vez maior por insumos naturais em detrimento dos sintéticos. As crescentes preocupações tanto com a preservação do meio ambiente, quanto à utilização de insumos químicos sintéticos e seus resíduos na produção agrícola, associado aos riscos para os consumidores, têm impulsionado o crescimento de uma agricultura socialmente responsável.

[005].Produtos contendo componentes ativos naturais com efeitos estimulantes, que promovam o crescimento, desenvolvimento, aumento da produtividade e qualidade, e aumento da tolerância

aos estresses abióticos (estresse hídrico e/ou salino), não sendo agroquímicos são contemplados no Decreto 4.954 de 14 de janeiro de 2004 (Brasil, 2004) da Legislação de Fertilizantes, na classe de “Biofertilizantes”, sendo, nesse texto legal, Biofertilizante definido como: “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”.

[006].Os Biofertilizantes também são definidos na Legislação da Agricultura Orgânica (IN 64 de 18/12/2008) como produtos que contém componentes ativos ou agentes biológicos, capazes de atuar direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção e que seja isento de substâncias proibidas pela regulamentação de orgânicos.

[007].Em geral, internacionalmente, produtos naturais com comprovado efeito estimulante no metabolismo vegetal são definidos como Bioestimulantes (Du Jardin. Plant Biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. Scientia Horticulturae, v.196, p.3-14, 2015).

[008].O efeito promotor do crescimento vegetal de substâncias sintéticas, como de alguns reguladores vegetais, é bem conhecido na literatura. Da mesma forma, a utilização de macroalgas marinhas como fonte natural para esse fim, também é amplamente conhecida (Stadnik, M.J. Potencial biotecnológico de algas para uso agrícola. Oficina de trabalho: Potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis. 13p. 2005; Mógor, A.F.; Ono, E.O.; Rodrigues, J.D.; Mógor, G. Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L- glutâmico e cálcio em feijoeiro. Scientia Agraria, v.9, p.431-437, 2008; Silva, C.P.; Laschi, D.; Ono, E.O.; Rodrigues, J.D.; Mógor, A.F. Aplicação foliar do extrato de alga *Ascophyllum nodosum* e do ácido glutâmico no desenvolvimento inicial de crisântemos (*Dendranthema morifolium*

(Ramat.) Kitam.) em vasos. Revista Brasileira de Horticultura Ornamental, v.16, n.2, p.179-181, 2010; Freitas, M.B.; Medugno, C.C.; Schons, R.F.; Stadnik, M.J. Eficiência de formulações de ulvana em induzir resistência em *Phaseolus vulgaris* contra *Colletotrichum lindemuthianum*. Tropical Plant Pathology, v.36, n.1, p.45-49, 2011).

[009].O efeito das macroalgas está relacionado ao conteúdo de citocininas e outros compostos bioativos presentes nos extratos (Papenfus, H.B.; Stirk, W.A.; Finnie, J. F.; Van Staden, J. Seasonal variation in the polyamines of *Ecklonia maxima*, Botanica Marina, v.55, n.5, p.539–546, 2012); sendo os extratos de alga considerados biofertilizantes (Zodape, S.T. Seaweeds as a biofertilizer. Journal of Scientific & Industrial Research, v.60, p.378–382, 2001).

Macroalgas Marinhas

[010].Nas últimas décadas têm aumentado significativamente o uso dos extratos de algas marinhas na agricultura, sendo observado que consideráveis parcelas dos 15 milhões de toneladas métricas de algas marinhas colhidas anualmente, são empregadas como bioestimulantes (Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M.; Critchley, A.T.; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithviraj, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. Journal of Plant Growth Regulation, v.28, p.386-399, 2009; Craigie, J.S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. Journal of Applied Phycology, v.23, p.371-393, 2011).

[011].Segundo Khan, W.; Wajahatullah, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M.; Critchley, A.T.; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithviraj, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. Journal of Plant Growth Regulation, v.28, p.386-399 (2009) os extratos de algas marinhas são comumente comercializados como bioestimulantes e biofertilizantes e contêm diversos reguladores de crescimento, tais como citocininas, auxinas, giberelinas, betaínas (Durand, N.; Briand, X.; Meyer, C. The effect of marine bioactive

substances (NPRO) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v.119, p.489-493, 2003); macronutrientes, como Ca, K, P, e micronutrientes como Fe, Cu, Zn, B, Mn, Co, Mo (Khan, W.; Wajahatullah, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M.; Critchley, A.T.; Craigie, J.S.; Norrie, J.; Prithviraj, B. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, v.28, p.386-399, 2009), necessários para o desenvolvimento e crescimento de plantas (Dapper, T.B.; Pujarra, S.; Oliveira, A.J.; Oliveira, F.G.; Paulert, R. Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: Revisão. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v.7, n.2, p.295-313, 2014).

[012].Atualmente, a utilização de extratos de algas marinhas vem ganhando popularidade devido ao seu potencial uso na agricultura convencional e orgânica, pois ao contrário dos fertilizantes químicos, os extratos de algas são biodegradáveis, não-tóxicos, não-poluentes e não perigosos para os seres humanos e animais (Rathore, S. S.; Chaudhary, D. R.; Boricha, G. N.; Ghosh, A.; Bhatt, B. P.; Zodape, S.T. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, v.75, p.351-355, 2009).

Descrição da abordagem do problema técnico

[013].Yakhin, O.I.; Lubyantsev, A.A.; Yakhin, I.A.; Brown, P.H. Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective. *Frontiers in Plant Science*, v.7, n.2049 (2017), relataram que a regulação do crescimento das plantas e o desenvolvimento e abreviação dos efeitos negativos dos estresses ambientais durante a ontogênese (sequência dos estádios fenológicos) são fatores importantes que determinam a produtividade das plantas cultivadas. Embora se reconheça que os estresses biótico e abiótico impedem que todos os sistemas de culturas alcancem seu potencial de produção, a compreensão atual dos mecanismos envolvidos e as estratégias para mitigar esses efeitos são limitadas. O

estresse abiótico nas plantas pode ser prevenido pela otimização do fornecimento de água e nutrientes, e através dos reguladores de crescimento de plantas (PGRs-auxinas, citocininas, giberelinas, strigolactones e brassinoesteróides).

[014].Além desses tradicionais, os biofertilizantes/bioestimulantes estão sendo cada vez mais integrados nos sistemas de produção com o objetivo de modificar os processos fisiológicos em plantas para aumentar a produtividade.

[015].Os produtos relatados como sendo bioestimulantes vegetais baseados em materiais naturais têm recebido considerável atenção tanto pela comunidade científica quanto pelas empresas comerciais, especialmente nas últimas duas décadas (Crouch, I.J.; Van Staden, J. Commercial seaweed products as biostimulants in horticulture. *Journal of Home and Consumer Horticulture*, v.1, p.19–76, 1993; Herve, J.J. Biostimulants, a new concept for the future, prospects offered by the chemistry of synthesis and biotechnology. *Comptes Rendus Académie Agriculture France*, v.80, p.91-102, 1994; Zhang, X.; Schmidt, R. Biostimulating turfgrasses. *Grounds Maintenance*, v.34, p.14–15, 1999; Maini, P. The experience of the first biostimulant based on aminoacids and peptides: a short retrospective review on the laboratory researches and the practical results. *Fertilitas Agrorum*, v.1, p.29–43, 2006; Khan, W.; Rayirath, U.P.; Subramanian, S.; Jithesh, M.N.; Rayorath, P.; Hodges, D.M. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulators*, v.28, p.386–399, 2009; Apone, F.; Tito, A.; Carola, A.; Arciello, S.; Tortora, A.; Filippini, L. A mixture of peptides and sugars derived from plant cell walls increases plant defense responses to stress and attenuates ageing-associated molecular changes in cultured skin cells. *Journal of Biotechnology*, v.145, p.367–376, 2010; Craigie, J.S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, v.23, p.371–393, 2011; Sharma, H.S.S.; Fleming, C.; Selby, C.; Rao, J.R.; Martin, T. Plant biostimulants: are view on the processing of macroalgae and use of extracts for crop

management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, v.26, p.465–490, 2014; Brown, P.; Saa, S. Biostimulants in agriculture. *Frontiers Plant Science*, v.6, p.671, 2015; Du Jardin, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v.196, p.3–14, 2015).

[016]. Além das macroalgas, aminoácidos obtidos por processos fermentativos tem sido relatados como biofertilizantes/bioestimulantes. Gemin, L.G.; Mógor, A.F.; Mógor, G.; Röder, C.; Szilagyi-Zecchin, V.J. Cambios em el crecimiento y concentración de aminoácidos em las plántulas de col china usando caldo bacteriano fermentado. *Idesia (Árica)*, v.36, p.7-13 (2018) identificaram o efeito promotor do crescimento de plantas de couve-chinesa pelo uso de um fermentado bacteriano do melaço da cana contendo aminoácidos; Röder, C.; Mógor, A.F.; Szilagyi-Zecchin, V.J; Gemin, L.G.; Mógor, G. Potato yield and metabolic changes by use of biofertilizer containing L-glutamic acid. *Comunicata Scientiae*, v.9, p.211-218 (2018) relataram o efeito biofertilizante de um fermentado bacteriano contendo o aminoácido ácido L-glutâmico no aumento da produtividade de batata; Gemin, L.G.; Datsch, R.; Mógor, A.F., Mógor, G. Biofertilizer effect of yeast fermented broth on organic tomato seedlings. *Revista de Ciências Agrárias (Lisboa)*, v.41, p.424-431 (2018), relataram o efeito biofertilizante de um fermentado de levedura contendo aminoácidos em promover o crescimento e desenvolvimento de mudas de tomate. Welinski, O.D.J.; Bettoni, M.M.; Mógor, A.F.; Cuquel, F.L. Fresh-cut zucchini shelf-life after applying glutamic acid biofertilizer. *Idesia (Arica)*, v.1, p.1-5 (2017) relataram a maior conservação pós-colheita de abobrinha italiana em função de aplicações do aminoácido ácido L-glutâmico obtido de processo fermentativo.

[017]. Entretanto, no Brasil esses produtos são geralmente registrados e comercializados como sendo fertilizantes organominerais, sem referência aos seus efeitos estimulantes no metabolismo vegetal, a não ser o dos nutrientes neles contidos (Mógor, A.F. Biofertilizantes e

Bioestimulantes: No que diferem? “Esclarecimento importante para o setor produtivo”. Anuário Brasileiro de Tecnologia em Nutrição Vegetal, p.31, 2018).

[018]. Sendo assim, o viés sustentável e de inovação proposto pela utilização de microalgas dulcícolas proteicas para obtenção de aminoácidos livres por hidrólise enzimática, em detrimento das macroalgas coletadas dos mares e também em detrimento de aminoácidos obtidos por processos de fermentação, é inédito. Nesse contexto, cabe ressaltar a importância da elucidação dos mecanismos envolvidos para a produção de um produto biofertilizante, ou seja, elucidação dos parâmetros bioquímicos, ou parte deles, viabilizando o uso em diferentes cultivos, promovendo a organicidade dos sistemas agrícolas.

[019]. Comparativamente às macroalgas, as microalgas têm um ciclo de vida rápido, necessitam menor consumo de água e menor área para cultivo. Além disso, o CO₂ utilizado em sua produção pode ser proveniente de processo poluidor, mitigando seus danos ao ambiente, como seus efeitos no aumento da temperatura global.

[020]. A solução proposta é a de um produto biofertilizante (bioestimulante) à base de microalgas dulcícolas, cuja biomassa será submetida ao processo de hidrólise enzimática, que promoverá o incremento do efeito estimulante vegetal desejado. Ademais, enquadra-se à legislação vigente e ao entendimento internacional, sendo um produto que contém componentes ativos ou agentes biológicos capazes de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, melhorando o desempenho do sistema de produção.

Microalgas

[021]. As microalgas incluem microorganismos unicelulares que realizam fotossíntese e dentro dessa definição genérica podem ser incluídos tanto os organismos procariotos, como as cianobactérias;

quanto os eucariotos, como as algas verdes, vermelhas, diatomáceas, dinoflagelados, e outros (Derner, R.B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S.M.; Fett, R. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, p.1956-1967, 2006).

[022].Quanto à estrutura celular, os organismos procariotos possuem representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; e os eucariotos, com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xantophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta (Hoek Van Den, C.; Mann, D.G.; Jahns, H.M. London: Cambridge University Press. 1995. 623p.).

[023].Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E.; Herrero, Y.C. Microalgas: Cultivo y Aplicaciones. España, Universidad de La Coruña, Monografías 26, 210pp. (1995) citam que existem muitas diferenças morfológicas e estruturais entre os representantes de cada divisão, porém, essas diferenças são fisiologicamente similares e apresentam um metabolismo análogo àquele das plantas. São principalmente encontradas no meio marinho, em água doce e no solo, sendo consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. Richmond, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566p.)

[024].Raven, J.; Caldeira, K.; Elderfield, H.; Hoegh-Guldberg, O.; Liss, P.; Riebesell, U.; Shepherd, J.; Turley, C.; Watson, A. Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide. The Royal Society, London, Policy Report, London, UK, 233 p.(2005) relataram que as microalgas existem em um variado número de classes e são distinguidas, principalmente, pela sua pigmentação, ciclo de vida e estrutura celular. As principais linhagens de microalgas em termos de abundância são: a) Diatomáceas (Bacillariophyta), da qual existem aproximadamente 100.000 espécies, sendo considerada a espécie que

domina o fitoplâncton dos oceanos, podendo ser encontrada em ambientes de água doce. Apresenta sílica como constituinte da parede celular e a reserva de carboidratos ocorre mediante óleo ou polímeros de carboidrato, conhecido como crisolaminarina; b) Algas Verdes (Chlorophyceae) representadas por cerca de 17.000 espécies, são encontradas em sua grande maioria em meio marinho ou água doce. Sua produção energética se dá principalmente, em forma de amido; c) Algas azuis (Cyanophyta), conhecidas por desempenharem papel importante na atmosfera: a fixação de oxigênio. Compreende cerca de 2.000 espécies, podendo ser encontrados em diversos ambientes; d) Algas Douradas (Chrysophyceae) que possuem cerca de 1.000 espécies, com habitat predominantemente doce, são semelhantes às diatomáceas).

[025].O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido. Atualmente são encontradas citações relatando que podem existir entre 200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo. Tal diversidade também se reflete na composição bioquímica e, desta forma, as microalgas são fonte de uma quantidade ilimitada de produtos (Norton, T.A.; Andersen, R.A.; Melkonian, M. Algal biodiversity. *Phycologia*, v.35, n.4, p.308-326, 1996; Pulz, O.; Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.65, p.635-648, 2004).

[026].Na década de 60 do século XX, iniciaram-se as pesquisas em biotecnologia de microalgas, porém concentravam-se na reciclagem de águas residuais e aplicação em programas espaciais de renovação atmosférica (Beneman, J.R. Microalgae products and production: an overview. *Journal of Industrial Microbiology*, v.31, n.5, p.247-256, 1990).

[027].O Brasil só iniciou as primeiras pesquisas sobre o cultivo de microalgas no período em que a diversificação de estudos e aplicações biotecnológicas já estavam bem avançadas internacionalmente (Lourenço, S.O. *Cultivo de Microalgas Marinhas-Princípios e Aplicações*. São Carlos: Editora RiMa. 606 p.).

[028].Diversas espécies são cultivadas comercialmente em alguns países e a biomassa produzida e seus produtos de síntese têm sido utilizados como fonte de produtos para aplicação em vários segmentos industriais.

[029].As microalgas vêm sendo utilizadas na alimentação de animais aquáticos; como fonte de proteínas na forma de suplementação alimentar; como fonte de pigmentos (ficocianinas, astaxantinas e β -caroteno); tratamento de águas residuais; como adubo orgânico e, atualmente, vêm sendo indicadas como uma possível matéria-prima para biocombustíveis, devido ao alto teor de óleo que algumas espécies apresentam e ao perfil de ácidos graxos. Devido à alta produtividade, ao rápido crescimento de várias espécies de microalgas e ao grande número de substâncias de altíssimo interesse econômico por elas produzidas, a pesquisa acerca dessas microalgas tem aumentado. Todavia, no Brasil, estudos com esses microrganismos ainda são incipientes (Ohse, S.; Derner, R.B.; Ozório, R.A.; Braga, M.V.C.; Cunha, P.; Lamarca, C.P.; Santos, M.E. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. *Ciência Rural*, v. 39, n.6, 2009).

[030].O estudo do uso de microalgas na agricultura é ainda mais recente, e de forma pioneira, um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Paraná obteve Carta Patente (PI 1107211-3. Mógor, G.; Nosedá, M.D.; Mógor A.F.; Nosedá, M.E.D. "Uso do extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp." 13/03/2018), utilizando técnicas de bioensaios com sementes verificaram o potencial bioestimulante vegetal quando da aplicação de extratos e suspensões da microalga *Scenedesmus* sp., devido a promoção do aumento de volume e área de hipocótilos de plântulas.

Microalga *Arthrospira* sp.

[031].Segundo Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. Microbiology: an introduction. 9th.ed. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco. 912p. (2007), a *Arthrospira* é um gênero de cianobactéria pluricelular e filamentosa, pertencente à ordem Oscillatoriales, classe Cyanophyceae.

[032].As cianobactérias são organismos procariontes capazes de realizar fotossíntese oxigênica por possuírem clorofila a e fotossistema II (Reviere, B. Biologia e filogenia das algas. Artmed, Porto Alegre, p.21, 2006).

[033].A taxonomia destes organismos fundamenta-se na chamada abordagem polifásica, isto é, a identificação taxonômica de acordo com características de múltiplas áreas de pesquisa, tais como morfologia, ecologia, fisiologia, ultraestrutura e biologia molecular (Komárek, J. The modern classification of Cyanoprokaryotes (cyanobacteria). Oceanological and Hydrobiological Studies, v.34, p.5-17, 2005).

[034]. Segundo Sanchez, M.; Bernal-Castilho, J.; Rozo, C.; Rodríguez, I. *Spirulina (Arthrospira)*: Na edible microorganism. A Review. Revista de la Facultad de Ciências, v.8, n.1 (2003) esta espécie foi classificada novamente, agora com o nome de *Arthrospira* sp., e aceita oficialmente em Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

[035].No gênero *Arthrospira*, também conhecido como *Spirulina*, a espécie mais importante é a *Arthrospira platensis* ou *Spirulina platensis*, seguida pela *S. fusiformes* e *S. maxima*. *Arthrospira* sp. é uma cianobactéria filamentosa que habita meios como solos, pântanos, lagos alcalinos e águas salobras, marinhas e doces (Richmond, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC, 1990). Por meio de fotossíntese, convertem os nutrientes em matéria celular e liberam oxigênio.

[036]. *Arthrospira* sp. possui um filamento helicoidal multicelular, apresentando aproximadamente 200-300 µm de comprimento e 5-10 µm de largura, tem alta tolerância para pH alcalino, fácil cultivo em

larga escala e a parede celular pode ser facilmente rompida (Chronakis, I.S.; Galatanu, A.N.; Nylander, T.; Lindman, B. The behavior of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.173, p.181-192, 2000; Rangel-Yagui, C.O.; Danesi, E.D.G.; Carvalho, J.C.M.; Sato, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresource Technology*, v.92, p.133-141, 2004).

[037].Pode-se classificar *Arthrospira* sp. como uma microalga azul-verde que possui pigmentos fotossintéticos incluindo clorofila *a*, luteína, β -caroteno, ficocianina e aloficocianina, sendo os maiores componentes bioativos nessa espécie (Chen T.; Zheng, W.; Yang, F.; Bai, Y.; Wong, Y.S. Mixotrophic culture of high selenium enriched *Spirulina platensis* on acetate and the enhanced production of photosynthetic pigments. *Enzyme and Microbial Technology*, v.39, p.103-107, 2006; Flores, E.; Herrero, A. Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria. *Nature Reviews*, p.8, n.1, p.39-49, 2010).

[038].Muitas espécies de cianobactérias podem ser estimuladas a acumular diferentes tipos de reservas que podem ser usadas como pigmentos, fonte de lipídios, vitaminas e/ou proteínas (Olvera-Ramirez, L.R.; Cedilo, M.C.; Villanueva, R.O.C.; Jeronimo, F.M.; Noyola, T.P.; Leal, E.R. Growth evolution and bioproducts characterization of *Calothrix* sp. *Bioresource Technology*, v.72, p.121-124, 2000).

[039].*Arthrospira* sp. é utilizada para fins diversificados, tais como: biopigmentos e antioxidantes, marcadores fluorescentes, enzimas, fármacos, exopolissacarídeos (usados como gelificantes, emulsificantes, floculantes e hidratantes), e diferentes nutrientes, como algumas vitaminas e proteínas, e alguns minerais, lipídios e carboidratos (Cepoi, L.; Rudi, L.; Miscu, V.; Cojocari, A.; Chiriac, T.; Sadovnic, D. Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Fascicula Biologie*, v.16, n.2, p.43-8, 2009).

[040].Algumas espécies de cianobactérias são tóxicas, como ocorre com alguns cogumelos e plantas. São espécies selvagens que crescem em lagos e vias fluviais, consumindo quaisquer nutrientes que estejam na água. No entanto, centenas de estudos científicos publicados não documentaram nenhuma toxicidade no gênero *Arthrospira* sp., sendo essa microalga classificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration), o que garante seu uso sem riscos à saúde (Andrade, M.R.; Costa, J.A.V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciência e Agrotecnologia* (Lavras), v.32, n.5, p.1551-1556, 2008).

[041].Dentre as inúmeras aplicações das microalgas, a sua utilização para a produção de biofertilizantes foi objeto de estudos recentes (Hussain, A.; Hasnain, S. Phytostimulation and biofertilization in wheat by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.38, p.85–92, 2011; Yee, N.N.; Aye, S.M.; Htun, T.T. Effect of *Spirulina* on germination, growth, yield and nutritional value of wheat. *Universities Research Journal* , v.5, n.1, p.37-57, 2012), porém tais estudos não relataram a utilização de hidrólise enzimática da biomassa, nem tampouco visando a obtenção de aminoácidos livres para uso agrícola.

[042].A pesquisa de novos processos e matérias-primas, por meio da utilização de microrganismos ou enzimas para a produção de novos produtos biofertilizantes (bioestimulantes) que apresentem efeito estimulante vegetal, pode tornar a agricultura mais sustentável, reduzindo o impacto causado pelo uso excessivo de substâncias sintéticas.

[043].Os produtos utilizados atualmente, tanto na agricultura convencional quanto na agricultura orgânica, são importados e derivados de extratos de macroalgas, que são produzidos principalmente a partir de espécies que habitam em águas marinhas e que geralmente são coletadas no ambiente natural, porém a utilização

de hidrolisados da microalga *Arthrospira* sp. como biofertilizante representa uma alternativa inovadora.

[044].Simon-Bervitch, B.; Bar-Zvi, D.; Arad, S. Cell-wall formation during the cell cycle of *Porphyridium* sp. (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, v.35, p.78-83 (1999) destacaram a facilidade do cultivo dessa microalga, equacionando dessa forma questões relacionadas à coleta e transporte, estimulando a formação de uma nova cadeia produtiva.

[045].Tanto para a agricultura orgânica, como para a agricultura convencional, a utilização de microalgas dentro do gênero *Arthrospira* sp., onde são encontrados diversos compostos de interesse, como aminoácidos, polissacarídeos, fitohormônios, oligoelementos e antioxidantes, que se convertem em complementos biológicos por excelência, representam uma alternativa promissora.

[046].O efeito promotor do crescimento vegetal atribuído às espécies de microalgas sugere por meio de bioensaios, ou relacionam-se por meios analíticos, a presença de hormônios vegetais nos extratos (Strik,W.A.; Ördög, V.; Van Staden, J. Identification of the cytokinin isopentenyladenine in a strain of *Arthronema africanum* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*. v.35, p.89–92, 1999; Stirk, W.A.; Ördög, V.; Van Staden, J.; Jäger, K. Cytokinin- and auxin-like activity in Cyanophyta and microalga. *Journal of Applied Phycology*. v.14, p.215–221, 2002). Por outro lado, estudos recentes das sinalizações celulares em plantas, utilizando *Arabidopsis thaliana* como modelo, destacam o papel de peptídeos e L-aminoácidos, que podem atuar como transmissores primários na ontogênese, regulando o desenvolvimento e crescimento das plantas (Butenko et al., 2009).

[047].As microalgas dos gêneros *Arthrospira* sp. têm sido estudadas pelo seu potencial nutricional, por apresentarem principalmente elevada qualidade e quantidade de proteínas, contendo aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos graxos polinsaturados (Machado, A.R.; Graça, C.S.; Assis, L.M.; Souza-Soares, L.A. Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoides*, Revista de Ciências Agrárias, v.40, n.1, 2017)

[048]. *Arthrospira* sp., por ser reconhecida fonte proteica, cuja hidrólise enzimática da biomassa pode resultar em L-aminoácidos e di, tri ou polipeptídeos (Brown, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. v.145, n.1, p. 79-99, 1991; Morris, H.J.; Carrillo, O.V.; Almarales, A.; Bermúdez, M.E.A.; Borges, L.; Quintana, M.M.; Fontaine, R.; Llauro, G.; Hernández, M. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* 87/1 with potentialities in immunonutrition. Biotecnología Aplicada, v.26, n.2, p.162-165, 2009; Garcia, J.M.R.; Fernandez, F.G.A.; Sevilla, J.M.F. Development of a process for the production of L-amino-acids concentrates from microalgae by enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology. v.112, p.164-170, 2012) apresenta potencial efeito no metabolismo vegetal, como biofertilizante (bioestimulante) e sua possível bioatividade está relacionada ao seu conteúdo de aminoácidos, como parte majoritária do complexo de moléculas bioativas promotoras do crescimento vegetal, como observado nos extratos de macroalgas marinhas (Papenfus, H.B.; Stirk, W.A.; Finnie, J. F.; Van Staden, J. Seasonal variation in the polyamines of *Ecklonia maxima*. Botanica Marina. v.55, n.5, p.539–546, 2012).

[049].O uso agrícola do gênero *Arthrospira* sp. como biofertilizante (bioestimulante), através da formulação de um hidrolisado proteico, que promoverá a quebra das moléculas proteicas em L-aminoácidos, e a conseqüente promoção da bioatividade, ou seja, efeito estimulante

vegetal, atuará diretamente ou indiretamente, quando aplicadas às plantas cultivadas, elevando a sua produtividade.

[050].A comprovação do efeito biofertilizante (bioestimulante) de hidrolisados de *Arthrospira* sp., foi determinado por meio do crescimento de mudas de alface (*Lactuca sativa*) e também produção de alface no campo, determinando as alterações biométricas relacionadas à promoção do crescimento, como será apresentado posteriormente.

[051].Abaixo apresentamos a descrição de alguns exemplos de patentes, porém não coincidem com nossa proposta e, portanto não afetam a originalidade da criação:

Patentes

[052]. 1- Extracting process for seaweed plant growth hormone. Número de publicação: CN1351830 (A). Data de publicação: 2002-06-05. Inventores: HAN LIJUN [CN]; FAN XIAO [CN]; LIXIANCUI [CN]. A presente invenção refere-se a um processo de extração de macroalgas para obtenção do hormônio de crescimento de plantas.

[053]. 2- Method for producing extracted liquor of seaweed for promoting growth of plant, obtained seaweed extracted liquor and compound fertilizer thereof. Número de publicação: CN1269339 (A). Data de publicação: 2000-10-11. Inventores: TONGGUANG FANG [US]; QIUREN WU [US]; GENSHEN LI [US] [48]. Refere-se a um método de produção de extrato líquido de macroalgas. Essa invenção fornece um adubo composto e sua aplicação serve para regular o crescimento de plantas.

[054]. 3- Purpose of seaweed as plant growth regulator. Número de publicação: CN1669441 (A). Data de publicação: 2005-09-21. Inventores: SHEN SONGDONG [CN]. Petição 870180001350, de

08/01/2018, p. 23/3819/28. Refere-se ao uso de macroalgas em pó do gênero *Gracilaria*, plantas daninhas e extrato vegetal contendo regulador do crescimento de plantas, que pode ser usado no cultivo em viveiros.

[055]. 4- Plant growth promoter. Número de publicação: JP4352705 (A). Data de publicação: 1992-12-07. Inventores: MOMOTANI YOSHIHIDE; UEDA JUNICHI; MIYAMOTO KENSUKE; SATO TOMOHIRO. Refere-se a um promotor de crescimento de plantas, contendo um extrato de células de *Euglena*. (*Euglena gracilis*, *Euglena viridis*). O extrato pode ser pulverizado no solo e utilizado como promotor de crescimento para gramíneas, como planta de arroz e também orquídeas, como a *Dendrobium*.

[056]. 5- Method for organic hydroponic culture of plant. Número de publicação: JP5123067 (A). Data de publicação: 1993-05-21. Inventores: SEKINE ICHIGORO; SEKINE TOSHIRO. Refere-se à estirpe bacteriana fotossintética e uma cepa de microalga, *Chlorella ellipsoidea*, as quais são separadamente cultivadas em resíduos orgânicos e os líquidos são posteriormente misturados. O líquido que contém o coloide polimolecular ativo é usado como um meio para o cultivo de plantas.

[057]. 6- *Chlorella* cells as a method for improving plant quality. Número de publicação: US 2012/0094831 (A1). Data de publicação: 2012-04-19. Inventores: GREGORY KEITH BARTLEY JR. A invenção refere-se a um método para melhorar a qualidade das plantas pela pulverização foliar de uma composição de células de *Chlorella* sobre as plantas. A composição consiste de quantidade de biomassa obtida de células *Chlorella*.

[058]. 7- Method of producing plant biostimulant. Número de publicação: US 2012/ 0129695 (A1). Data de publicação: 2012-05-24.

Inventores: SHINYA TACHIBANA; PAUL SUMMER; JESSICA EDWING; TETSUYA MIWA KANAGAWA; DAISUKE TITAZAWA KANAGAWA. A invenção refere-se a método de produção de bioestimulante de plantas, incluindo a hidrólise de células de bactérias, obtendo um hidrolisado para formulação como bioestimulante para aplicação foliar e aditivo de solo.

[059]. 8- Uso de extratos e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp. Número de publicação: PI 1107211-3. Data de publicação: 2015-11-10. Inventores: GILDA MÓGOR; MIGUEL DANIEL NOSEDA; ÁTILA FRANCISCO MÓGOR; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA. A invenção propõe a utilização de extratos e suspensões da microalga de água doce *Scenedesmus* sp. em sementes. Utilizando técnicas de bioensaios com sementes, verificou-se o potencial bioestimulante vegetal quando da aplicação de extratos e suspensões de microalgas, devido à promoção do aumento de volume e área de hipocótilos de plântulas.

Descrição detalhada da Invenção

Cultivo de *Arthrospira* sp.

[060]. O cultivo de microalgas, para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese, é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países e a produção está a cargo de grandes empresas (Derner, R.B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006).

[061]. *Arthrospira* sp. ou *Spirulina* sp., ao contrário de outras cianobactérias, apresenta baixa susceptibilidade de contaminação de seus cultivos por outros microorganismos, devido ao alto pH em que se desenvolve, de modo que os biorreatores ou fotobiorreatores para cultivo podem ser abertos (Vonsahk, A. *Spirulina platensis*, *Arthrospira*.

Physiology, Cell-Biology and Biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997).

[062].Os cultivos fechados são comumente denominados biorreatores ou fotobiorreatores e referem-se ao menor contato com o ambiente externo que estes sistemas apresentam em relação aos tanques.

[063].Para cultivo laboratorial ou semi-industrial são utilizados fotobiorreatores (Bertoldi, F.C.; Sant'Anna, E.; Barcelos Oliveira, J.L. Revisão: Biotecnologia de microalgas. B.Ceppa, Curitiba, v.26, n.1, p.9-20, 2008).

[064].Os cultivos podem ser realizados no sistema autotrófico, heterotrófico e mixotrófico. Podem ser cultivadas autotroficamente em tanques abertos ou em fotobiorreatores, com luz solar ou artificial e adição de nutrientes (Becker, E.W. Algae mass cultivation – production and utilization. Process Biochemistry, v.16, n.5, p.10-14, 1981).

[065].Também podem ser cultivadas em sistema heterotrófico, usando compostos orgânicos como energia e fonte de carbono, ou ainda em sistema de cultivo mixotrófico. Nesse sistema usam-se simultaneamente a fonte luminosa e o substrato orgânico como fonte de energia, além de CO₂ e substrato orgânico como fontes de carbono (glicose, acetato, etc)(Chojnacka, K.; Marquez-Rocha, F.J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. Biotechnology, n.3, v.1, p.21-34, 2004).

[066].O meio de cultivo clássico utilizado para *Arthrospira* sp. foi desenvolvido por Zarrouk (Zarrouk, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. Tese de Doutorado, University Paris, 1966) e fornece, entre outros nutrientes, carbono inorgânico na forma de CO₃⁻² e HCO₃⁻³, que se convertem em CO₂ utilizado na fotossíntese.

[067].A fonte de carbono no meio padrão de crescimento é o bicarbonato de sódio, que fornece CO₂ para a fotossíntese.

Recentemente outras fontes de carbono têm sido estudadas para o cultivo de microalgas (Morais, M.G.; Costa, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology, v.129, n.3, p.439-445, 2007).

[068]. Segundo Oliveira, E.G. Secagem de *Spirulina platensis*: análise das técnicas de leito de jorro e camada delgada. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Tese. (2006), o carbono constitui um dos maiores componentes de custo para a produção de *Arthrospira* e estudos concluíram que o meio Zarrouk está exclusivamente concentrado em nutrientes, de modo que se abre uma possibilidade de redução de custos de produção de cianobactérias. Ademais, o CO₂ utilizado em sua produção pode ser proveniente de processo poluidor.

[069]. *Arthrospira* sp., cuja hidrólise enzimática e uso como biofertilizante é o objeto desta proposta de patente, foi cultivada autotroficamente, em fotobiorreatores fechados com luz artificial, em condições controladas. Para a manutenção do inóculo e cultivos foi utilizado o meio Zarrouk, cuja composição foi (g.L⁻¹): NaHCO₃ (16,8); K₂HPO₄ (0,5); NaNO₃ (2,5); K₂SO₄ (1,0); NaCl (1,0); MgSO₄.7H₂O (0,2); CaCl₂ (0,04); EDTA (0,08) e 1,0 mL.L⁻¹ das soluções A₅ e B₆. Solução A₅ (g.L⁻¹): H₃BO₃ (2,86); MnCl₂.4H₂O (1,81); ZnSO₄.7H₂O (0,222); CuCO₃.5H₂O (0,079); MnO₃ (0,015). Solução B₆ (g.L⁻¹): NH₄VO₃ (22,86); KCr(SO₄)₂.12H₂O (192); NiSO₄.6H₂O (44,8); Na₂WO₄.2H₂O (17,94); TiSO₄.H₂SO₄.8H₂O (61,1); CO(NO₃)₂.6H₂O (43,98). Os cultivos foram realizados assepticamente em frascos erlenmeyers de 2.000 mL de capacidade, com um volume inicial de 1,8 L de meio de cultivo e concentração inicial de inóculo de 0,15 g.L⁻¹ com aeração (Muliterno, A.; Mosele, P.C.; Vieira Costa, J.A.; Hemkemeier, M.; Bertolin, T.E.; Colla, L.M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. Ciência e Agrotecnologia, v.29, n.6, p.1132-1138, 2005) e iluminação realizada com a utilização de lâmpadas fluorescentes de 40W, fornecendo uma iluminância de 2500 lux, por um período de 15 dias, sendo o fotoperíodo

de 12h claro/escuro e 30°C (Costa, J.A.V.; Colla, L.M.; Duarte, P. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*. v.92, p.237-241, 2004).

[070].Segundo Rocha, O.; Tavares, L.H.S. Produção de plâncton (fitoplâncton de zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Ed. Rima.148p. (2001), a curva de crescimento de microalgas é expressa como o incremento da biomassa ou do número de organismos (densidade celular) no tempo. Em um cultivo do tipo "batch" ou estacionário, a curva pode apresentar fases bem distintas. A fase inicial, conhecida como fase de indução ou fase lag, ocorre logo após o início do cultivo (repicagem) e existe ou não um pequeno incremento líquido na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo. A fase seguinte é a exponencial ou fase log, na qual a biomassa se duplica, sucessivamente, em intervalos regulares de tempo. Com a continuação do cultivo, o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo a taxa de crescimento, sendo esta fase denominada de diminuição do crescimento relativo. Isto é consequência da diminuição da concentração de nutrientes no meio, do aumento da concentração metabólitos e da redução da atividade fotossintética por incremento da densidade populacional, a qual diminui a disponibilidade de luz por unidade de célula (autossombreamento). Na fase final de cultivo, não há incremento da população e a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade celular (fase estacionária).

[071].Kim, S.G.; Choi, A.; Ahn, C.Y; Park, C.S.; Park, Y.H.; OH, H.M. Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. *Letters in Applied Microbiology*, v.40, p.190-194 (2005) obtiveram um rendimento de 1,9 g.L⁻¹ ao cultivarem a microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreatores de 5 L., enquanto para *Arthrospira* sp., cultivada durante este trabalho, a produção final média foi de 1,3 g.L⁻¹ em fotobiorreatores de 2.000 mL de capacidade.

[072].Para a extração das substâncias de interesse, é necessário

primeiramente separar a biomassa do meio de cultivo, através da centrifugação a 12.000 x g, por 20 min. a 5°C, seguido de liofilização da biomassa.

[073].A biomassa foi submetida à hidrólise enzimática pelo tempo de reação de 4 horas. O hidrolisado obtido foi utilizado em soluções aplicadas às mudas de alface e plantas de alface cultivadas no campo.

Hidrólise enzimática

[074].O desenvolvimento de hidrolisados enzimáticos a partir de fontes proteicas, como *Arthrospira* sp., representa uma alternativa para potencializar os efeitos estimulantes vegetais, devido a hidrólise da biomassa da microalga resultar em L-aminoácidos, di, tri ou polipeptídeos com potencial efeito no metabolismo vegetal e, portanto passíveis de utilização como biofertilizantes.

[075].No processo de degradação de proteínas por hidrólise enzimática, para cada ligação peptídica clivada pela enzima, libera-se um mol de grupo carboxila e um mol de grupo amino, quando a reação é completa o resultado é uma mistura de todos os aminoácidos presentes na proteína. A reação de hidrólise, por via enzimática, é a mais indicada, devido produzir peptídeos de vários tamanhos, já que as condições de temperatura e pH são mais brandas para a melhor atividade da protease (também conhecidas como peptidases, proteinases ou, ainda, enzimas proteolíticas, cuja função é de quebrar as ligações entre os aminoácidos da cadeia proteica), tornando-se uma das estratégias para melhorar as propriedades de solubilidade, dispersibilidade, formação de espuma e emulsificação (Damodaram, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. Química de Alimentos, 4ª ed. São Paulo: Artmed, 2010) enquanto as hidrólises ácida e alcalina podem destruir L-aminoácidos, produzindo D- aminoácidos e substâncias tóxicas como a

lisina-alanina, reduzindo o valor hidrolisado, pois as proporções de aminoácidos, di e tripeptídeos são importantes para a absorção (Lahl, W.J.; Braun, S.D. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technology*. v.48, n.10, p.68–71, 1994).

[076].Hidrólises enzimáticas têm sido amplamente utilizadas para melhorar ou ampliar as funcionalidades das proteínas, sendo maior a aceitabilidade da hidrólise branda, à medida que a extensiva é considerada prejudicial, posto que um alto grau de hidrólise possa levar a uma alta solubilidade, inviabilizando o produto como matéria-prima para muitos processos tecnológicos (Furtado, M.A.M.; Gomes, J.C.; Silva, C.A.S.; Ornellas, C.B.; Silvestre, M.P.C. Propriedades funcionais de hidrolisados de proteína láctea co-precipitada. *Lavras*, v.25, n.3., p.625-639, 2001).

[077].As propriedades funcionais dos hidrolisados proteicos dependem das proteínas encontradas no substrato e da enzima utilizada, pois as diferenças de tamanho e as outras propriedades físico-químicas dos polipeptídeos liberados durante a reação refletem diretamente na solubilidade (Alves, G.K. Uso de papaína e bromelina para obtenção de hidrolisados proteicos de fígado suíno. Universidade Federal de Santa Catarina. Tese. 2015).

[078].Com base nos mecanismos catalíticos, as enzimas são classificadas como serina, cisteína, aspártico ou metaloproteinases (Barrett, A.J. Introduction: the classification of proteinases. *Ciba Foundation Symposium*. v.75, p.1-13, 1980). As cisteínas (EC 3.4.22) são aquelas que contêm um resíduo de cisteína no sítio ativo. Estas proteases foram identificadas em organismos filogeneticamente diversos, tais como bactérias, microrganismos eucarióticos, plantas e animais (Rawlings, N.D.; Barrett, A.J. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymology*. v.244, p.461-486, 1994).

[079].As peptidases cisteínicas são um grupo diverso com mais de 130 enzimas conhecidas presentes em animais, plantas e microrganismos. Apresentam massa de 24 a 35 kDa, têm atividade

ótima em pH 6,0 a 7,5 e podem suportar temperaturas de até 60 a 80°C, em parte pelas três pontes dissulfeto (Parkin, K.L. Enzimas. In: Fennema, O.R.; Parkin, K.L.; Damodaran, S. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 263-342).

[080]. Nas plantas, as peptidases cisteínicas estão envolvidas em processos anabólicos e catabólicos presentes na maturação, degradação e reconstrução de proteínas em resposta à diversos estímulos externos e papel de limpeza ao destruir proteínas anômalas. Também desempenham função no processo de acúmulo de proteínas de armazenamento pela semente e na mobilização dessas (González-Rábade, N.; Badillo-Corona, J.A.; Aranda-Barradas, J.S.; Oliver-Salvador, M.C. Production of plants proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnology Advances*, México. p.983-996, 2011). Além disso, alguns estudos demonstraram relação dessas enzimas com o sistema de defesa contra pragas, insetos e larvas (Van der Hoorn, R.A.L.; Jones, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, v.7, p.400-407, 2004).

[081]. A papaína, ficina e bromelina, como constituintes do látex das suas respectivas plantas de origem, protegem as árvores do ataque de insetos herbívoros por exalar em suas folhas substâncias tóxicas. As peptidases cisteínicas possuem um grande potencial nas indústrias alimentícia, biotecnologia e farmacêutica por apresentar atividade em uma vasta gama de temperatura e pH; ocorrendo em vários tecidos das plantas, em alguns casos, em quantidade excessiva, desta forma oferece uma alternativa atraente para a sua extração e purificação (González-Rábade, N.; Badillo-Corona, J.A.; Aranda-Barradas, J.S.; Oliver-Salvador, M.C. Production of plants proteases in vivo and in vitro - A review. *Biotechnology Advances*, México, p.983-996, 2011).

[082]. Essas peptidases cisteínicas compreendem uma família de enzimas, consistindo de papaína (EC 3.4.22.2), enzima proteolítica extraída do látex dos frutos do mamoeiro (*Carica papaya*) e afim, tais como as proteases vegetais quimopapaína (EC 3.4.22.6) e suas múltiplas

isoformas, e a caricaína (EC 3.4.22.30) (Parkin, K.L. Enzimas. In: Fennema, O.R.; Parkin, K.L.; Damodaran, S. Química de Alimentos de Fennema. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 263-342).

[083].A papaína apresenta ainda atividade sobre ligações éster e amida e tem boa atuação na síntese de peptídeos. Apresenta baixa especificidade de substrato e hidrolisa preferencialmente ligações adjacentes aos aminoácidos fenilalanina, valina e leucina. Geralmente é comercializada na forma de extrato bruto com diferentes proteases, sendo as mais importantes a papaína e a quimopapaína (QP-A e QP-B), com características bastante semelhantes e que variam ligeiramente com a variedade plantada, o clima e o manejo, além do processo de extração/concentração utilizado. Sua atividade proteolítica encontra-se em valores de pH na faixa de 5 a 9, e especificamente para os substratos caseína e albumina, seu pH ótimo de atuação é 7. Sua temperatura de atividade ótima está na faixa de 60 a 70°C (KOBBLITZ, M.G.B. Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2008. 234p.)

Processo para obtenção do hidrolisado de *Arthrospira* sp.

[084].O processo para obtenção do hidrolisado de *Arthrospira* sp. compreende as seguintes etapas: a) Preparo da solução tampão fosfato de potássio e b) Reação de hidrólise.

a. Preparo da solução tampão fosfato de potássio

[085].Para o preparo da solução tampão fosfato de potássio foram pesados 27,2 g de KH_2PO_4 e 40,0 g de K_2HPO_2 e adicionados em 1.000 mL de água destilada, utilizando béquer de vidro e agitador magnético para completa solubilização.

b.Reação de hidrólise

[086].Foram utilizados frascos erlenmeyers (250 mL de capacidade) e adicionados em cada frasco: solução tampão fosfato de potássio (10 mL); água destilada (40 mL) e 5g de biomassa liofilizada de *Arthrospira* sp.

[087].Os erlenmeyers permaneceram sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital (shaker) até atingirem a temperatura de 48°C, seguido da adição de 0,2 g de papaína (EC 3.4.22.2)6.000 USP-U/MG (dissolvido em 1mL de água destilada).

[088].Após 4 horas foram retirados do shaker e transferidos para agitador magnético com aquecimento e a temperatura foi elevada para 90°C para inativação da enzima.

[089].Para a estabilização foi adicionado ácido cítrico, na concentração de 1g.L⁻¹. O pH da solução final foi de 6,7. A solução contendo a biomassa hidrolisada de *Arthrospira* sp. foi utilizada na determinação do seu conteúdo de aminoácidos livres.

Determinação de aminoácidos livres

[090].Os aminoácidos livres foram extraídos segundo Winters, A.L.; Lloyd, J.D.; Jones, R.; Merry, R.J. Evaluation of a rapid method for estimating free amino acids in silages. Animal Feed Science and Technology, v.99, n.1, p.177-187(2002) e a quantificação ocorreu por reação da amostra com tampão citrato 0,2 M pH 4,6 e solução de ninidrina (ninidrina 1%, ácido ascórbico 0,03% em 2-metoxietanol) (Magné, C.; Larher, F. High sugar content interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. Analytical Biochemistry, v.200, p.115–118, 1992). As leituras foram realizadas a 570 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi realizada com glutamina a 4mM com valores entre 28 e 140 µg/ mL obtendo-se a equação: $y = 0.01 x + 0.0741$, com $R^2 = 0.9908$.

Experimentos agronômicos

[091].Para identificar o efeito biofertilizante (bioestimulante) dos aminoácidos livres em suspensão obtida pela hidrólise da biomassa de *Arthrospira* sp. utilizando a peptidase papaína (EC 3.4.22.2), soluções em diferentes concentrações diluída em água foram aplicadas às folhas de mudas de alface em viveiro, e também em plantas de alface cultivadas em sistema orgânico, como segue:

Experimento com mudas de alface (*Lactuca sativa*)

[092].O experimento foi conduzido em cultivo protegido em bancada suspensa para a produção de mudas e irrigação por microaspersão temporizada.

[093].Foram utilizadas sementes da cultivar 'Vera' (Sakata seed sudamerica), com semeadura em bandejas de poliestireno expandido com 200 células, preenchidas com substrato composto de cama de aviário compostada (Provaso®) associado à casca de pinus compostada.

[094].Os tratamentos, com 5 repetições compostas por 100 células cada, foram distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado, e consistiram de aplicações foliares de soluções aquosas nas doses de 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mL.L⁻¹ da suspensão da biomassa hidrolisada, perfazendo 4 tratamentos, além de testemunha com aplicação de água. As aplicações foram realizadas utilizando pulverizador pressurizado com CO₂, com pressão constante (45 lib.pol⁻¹) e volume de calda de 100 mL por bandeja, sendo realizadas duas aplicações, aos 10 e 20 dias após a semeadura. As mudas foram coletadas aos 30 dias após a semeadura (DAS).

[095].Foram selecionadas aleatoriamente 15 (quinze) mudas de cada repetição, sendo analisadas as seguintes variáveis: massa fresca da parte aérea e das raízes, massa seca da parte aérea e das raízes, área foliar e volume radicular.

[096].Para a avaliação da massa fresca, as mudas passaram pelo processo de lavagem das raízes para a retirada do excesso de substrato. Posteriormente as plantas foram seccionadas, separando-se a parte aérea do sistema radicular. A área foliar e o volume radicular foram analisados por meio do programa computacional WinRhizo®, acoplado a um Scanner LA1600 (Régent Instruments). Para obtenção da massa seca, tanto da parte aérea como das raízes, estas foram acondicionadas em sacos de papel e levadas à estufa com temperatura de $65^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ e circulação de ar forçada, avaliadas até alcançarem peso constante, sendo a massa seca determinada em balança de precisão.

[097].Os dados foram testados quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, em seguida submetidos à ANOVA ao nível de 5% de probabilidade, e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, processados no software estatístico (Assistat 7.5).

Experimento com produção de alface em sistema orgânico

[098].A análise química do solo da área experimental na camada de 0 a 15 cm indicou os seguintes valores médios: pH (CaCl_2)= 5,75; pH SMP= 6,0; Al^{3+} = 0; $\text{H}^{+} + \text{Al}^{3+}$ = 5,50 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Ca^{2+} = 9,85 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; Mg^{2+} = 9,8 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; K^{+} = 0,54 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$; P= 42,6 $\text{mg}.\text{dm}^{-3}$; C= 32,5 $\text{g}.\text{dm}^{-3}$; V%=78,59 e CTC= 25,54 $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$.

[099].No preparo do solo, 15 dias antes do plantio das mudas de alface obtidas como descrito anteriormente, sem a aplicação de tratamentos, procedeu-se a distribuição e incorporação com rotoencanteirador, de 4 $\text{ton}.\text{ha}^{-1}$ de composto orgânico com os seguintes valores médios: N= 14,4 $\text{g}.\text{Kg}^{-1}$; P= 10,6 $\text{g}.\text{Kg}^{-1}$; K= 11,3 $\text{g}.\text{Kg}^{-1}$; Ca= 31,7 $\text{g}.\text{Kg}^{-1}$; Mg= 6,8 $\text{g}.\text{Kg}^{-1}$.

[100].As plantas foram dispostas em canteiro com 1,20 m de largura e 36 m de comprimento, em espaçamento de 0,30 x 0,30 m. Os

tratamentos consistiram de aplicações foliares das concentrações de 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mL.L⁻¹ da suspensão de biomassa hidrolisada. Os cinco tratamentos (quatro concentrações do hidrolisado e uma testemunha com aplicação de água) com quatro repetições, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado, em parcelas compostas por 24 plantas. As aplicações foram realizadas utilizando-se pulverizador pressurizado com CO₂, com pressão constante (45 lib.pol⁻¹) e volume de calda de 280 litros por hectare, com início aos sete dias após o plantio (DAT) das mudas, repetidas semanalmente em um total de seis aplicações, encerradas aos 42 DAT, uma semana antes da colheita das plantas.

[101].Foram coletadas as quatro plantas centrais de cada parcela para a determinação da massa fresca, diâmetro médio da projeção das folhas da base (régua com graduação milimétrica), e seu número de folhas.

[102].Os dados foram testados quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste de Bartlett, em seguida submetidos à ANOVA ao nível de 5% de probabilidade, e quando significativas, submetidos a análise de regressão, processados no software estatístico (Assistat 7.5).

Obtenção de aminoácidos livres por hidrólise enzimática de *Arthrospira* sp.

[103].O processo de hidrólise da biomassa de *Arthrospira* sp. utilizando a peptidase papaína (EC 3.4.22.2) como descrito anteriormente, foi eficiente em promover significativo aumento na concentração de aminoácidos livres na suspensão hidrolisada, da ordem de aproximadamente 67%.

Lista de Figuras

[104].**Figura 1.** Concentrações de aminoácidos livres em biomassa de *Arthrospira* sp. e suspensão da biomassa hidrolisada.

Utilização do hidrolisado em mudas de alface

[105].Tabela 1. Massa fresca das folhas (MFF), massa fresca das raízes (MFR), massa seca das folhas (MSF), massa seca das raízes (MSR), área foliar (AF) e volume radicular (VR) de mudas de alface submetidas à aplicações foliares de soluções contendo aminoácidos obtidos pela hidrólise enzimática de *Arthrospira* sp.

Doses	MFF (g)	MSF (g)	MFR (g)	MSR (g)	AF (cm ²)	VR (cm ³)
Test.	1,76 bc*	0,17 b	1,37 bc	0,066 bc	49,05 b	1,84 b
1 ml L	1,82 b	0,19 b	1,23 cd	0,059 cd	50,67 d	1,62 bc
2 ml L	3,48 a	0,38 a	1,77 a	0,085 a	95,85 a	2,32 a
4 ml L	3,27 a	0,33 a	1,71 ab	0,083 ab	91,16 a	2,22 a
8 ml L	1,31 c	0,11 c	0,90 d	0,043 d	37,56 c	1,20 c
CV%	9,28	10,74	12,08	12,28	7,98	12,41

*Letras iguais nas colunas indicam que não ocorreu diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

[106].Aplicações foliares da suspensão hidrolisada em mudas de alface nas doses de 2,0 e 4,0 mL.L⁻¹ em solução aquosa, promoveram aumentos na área foliar, massas frescas e secas das folhas e raízes, e também no volume de raízes, comparado à testemunha e às doses de 1,0 e 8,0 mL.L⁻¹ (Tabela 1). Os resultados indicam o efeito biofertilizante/bioestimulante da suspensão hidrolisada, ao promover o crescimento das mudas de alface, com destaque para o incremento na área foliar, aumentando de 49,05 cm² na testemunha sem aplicação, para 95,85 e 91,16 cm² nas doses de 2,0 e 4,0 mL.L⁻¹ respectivamente.

Utilização do hidrolisado na produção de alface

[107].Tabela 2. Massa fresca das folhas (MFF), número de folhas (NF) e diâmetro das cabeças (DC) de plantas de alface submetidas à aplicações foliares de soluções contendo aminoácidos obtidos pela hidrólise enzimática de *Arthrospira* sp.

Doses	MFF	NF	DC
Test.	129,9 c*	16,6 b	19,8 b
1 ml L	184,6 b	19,6 a	24,9 a
2 ml L	206,2 ab	19,6 a	24,7 a
4 ml L	201,6 ab	19,9 a	24,5 a
8 ml L	213,6 a	19,6 a	24,5 a
CV%	6,94	6,79	8,52

*Letras iguais nas colunas indicam que não ocorreu diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

[108].Aplicações foliares da suspensão hidrolisada da biomassa de *Arthrospira* sp. em plantas de alface também indicaram efeito biofertilizante/ bioestimulante, pois todas as doses testadas promoveram aumentos significativos na massa fresca das folhas, no número de folhas e no diâmetro das cabeças de alface.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de uma composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres **caracterizado por** ser obtido da hidrólise enzimática da biomassa da microalga de água doce *Arthrospira* sp. com o uso da enzima papaína, a partir das seguintes etapas:

- a. cultivo da microalga em fotobiorreator para produção de biomassa;
- b. separação da biomassa do meio de cultivo por centrifugação a 12.000 x g, por 20 min. a 5°C, seguido de liofilização da biomassa.
- c. hidrólise enzimática pelo tempo de reação de 4 horas por meio da enzima papaína para obtenção do hidrolisado.

2. Processo hidrólise enzimática, conforme reivindicação 1, **caracterizado pelo:**

- a. preparo da solução tampão fosfato de potássio: 27,2 g de KH₂PO₄ e 40,0 g de K₂HPO₂ adicionados em 1.000 mL de água destilada até completa solubilização;
- b. reação de hidrólise: utilização de solução tampão fosfato de potássio (10 mL), água destilada (40 mL) e 5 g de biomassa liofilizada de *Arthrospira* sp. (agitação em câmara incubadora com agitação orbital (shaker) até atingirem a temperatura de 48°C) e adição de 0,2 g de papaína (EC 3.4.22.2) 6.000 USP-U/MG (dissolvido em 1 mL de água destilada) por 4 horas; processo de retirada do shaker e transferência para agitador magnético com aquecimento e elevação da temperatura à 90°C para inativação da enzima; estabilização por meio de adição de ácido cítrico, na concentração de 1g.L⁻¹, sendo o pH da solução final de 6,7.

3. Composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, obtida pelo processo definido na reivindicação 1, **caracterizado por** ser composta de aminoácidos livres obtidos da hidrólise enzimática da biomassa da microalga de água doce *Arthrospira* sp. com o uso da enzima papaína.

4. Uso de uma composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, definida na reivindicação 3, **caracterizado pela** promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal.

5. Uso de uma composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** aplicação da composição em espécies vegetais via contato direto por pulverização localizada ou da parte aérea ou irrigação.

6. Uso da composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** aplicação da composição em espécies vegetais via contato direto por pulverização localizada ou da parte aérea ou irrigação, de forma isolada ou em conjunto com outros compostos ou composições com atividades análogas ou diferentes.

7. Uso de uma composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado por** aplicação da composição ser isolada ou em conjunto com outros compostos ou composições com atividades análogas ou diferentes.

8. Uso de uma composição agrícola biofertilizante contendo aminoácidos livres, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** uso em espécies vegetais selecionadas de um grupo compreendendo espécies hortícolas ou outros cultivos agrícolas em geral.

FIGURAS

Figura 1

