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

(21) BR 102016016786-8 A2

(22) Data do Depósito: 20/07/2016

(43) Data da Publicação: 06/02/2018

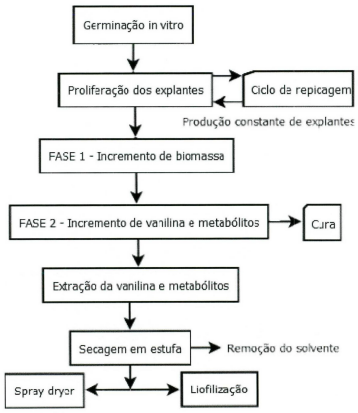
(54) Título: PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE VANILLA PLANIFOLIA CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES.

(51) Int. Cl.: A01H 4/00; A23L 27/10; C07C 27/34

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

(72) Inventor(es): CARLOS RICARDO SOCCOL; ADRIANE BIANCHI PEDRONI MEDEIROS; KHIOMARA KHÉMELI DELLANI DE LIMA; ANDRÉ LUÍS LOPES DA SILVA

(57) Resumo: A presente patente de invenção apresenta um processo biotecnológico de produção de vanilina e de outras notas aromáticas de baunilha via cultura de tecidos. Brotações múltiplas são cultivadas em um sistema de duas-fases, em que a primeira fase consiste da produção de grande quantidade de biomassa e a segunda fase consiste na suplementação de elicitores e/ou precursores para induzir maior produção de vanilina e dos demais aromas de baunilha. A extração dos metabólitos é realizada a partir dos explantes cultivados in vitro. A grande vantagem desse processo e que a vanilina é produzida juntamente com outras notas do aroma de baunilha e a produção é maior do que a obtida nas vagens da Vanilla planifolia cultivada no campo, além do processo ocorrer em condições ambientais controladas e em qualquer época do ano.



PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES

[001]. A presente invenção consiste em um processo biotecnológico para a produção de vanilina e outras notas aromáticas de baunilha via cultura de tecidos. Brotações múltiplas são cultivadas em um sistema de duas-fases, em que a primeira fase consiste da produção de grande quantidade de biomassa e a segunda fase consiste na suplementação de elicitores e/ou precursores para induzir maior produção de vanilina e dos demais aromas de baunilha. A extração dos metabólitos é realizada a partir dos explantes cultivados *in vitro*. A grande vantagem desse processo e que a vanilina é produzida juntamente com outras notas do aroma de baunilha e a produção é maior do que a obtida nas vagens da *Vanilla planifolia* cultivada no campo, além do processo ocorrer em condições ambientais controladas e em qualquer época do ano.

[002]. O aroma da baunilha é caracterizado por mais de 250 compostos aromáticos, entretanto, a vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é o composto majoritário do aroma. Tanto a vanilina quanto esses outros compostos voláteis responsáveis pelo aroma são produzidos na vagem da planta *Vanilla planifolia*. Apesar de que muitas espécies desse gênero também são produtoras de aroma; dessas espécies, as mais conhecidas são a *V. pompona*, *V. tahitiensis*, *V. java*, *V. trigonocarpa* e a *V. planifolia*. Contudo, a *V. planifolia* é a principal produtora de vanilina por apresentar melhor aroma e sabor.

[003]. A vanilina pode ser produzida também por fermentação microbiana, entretanto, normalmente precisa de um precursor, o ácido ferúlico, seguido de uma biotransformação produzida por outro organismo. Alguns fungos e bactérias são capazes de metabolizar o ácido ferúlico em vanilina ou/e ácido vanílico. Alguns exemplos são: (1) O *Aspergillus niger* que transforma o ácido ferúlico em ácido vanílico, e após são usados basidiomicetos tais como *Pycnoporus cinnabarinus* que convertem esse ácido em vanilina; (2) A *Pseudomonas putida* é capaz de converter o ácido ferúlico em ácido vanilíco; e (3) *Streptomyces setonii* transforma o ácido ferúlico em vanilina.

[004]. Outra forma de se obter a vanilina é a partir da síntese química. Existem diversos procedimentos para a obtenção da vanilina por síntese química, a qual é uma técnica barata.

[005]. A *V. planifolia* cultivada no campo (técnica tradicional) usada para a obtenção da vanilina natural, é bastante lenta e trabalhosa (primeira floração só ocorrerá após 2 a 3 anos). Além disso, o cultivo no campo oferece muitos riscos, considerando que essas plantas são muito sensíveis a doenças, as principais são causadas por *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora meadii*, *Calospora vanillae*, *Sclerotium*, *Anthracnose* (*Colletotrichum vanillae*) e *Puccinia sinamononea*, que afetam de maneira considerável a sua produtividade.

[006]. A vanilina obtida por fermentação e por síntese química é desprovida das demais notas aromáticas da baunilha, tornando esse aroma de menor custo do que o extrato obtido da vagem da planta, como consequência resulta num produto de baixo valor agregado.

[007]. A presente invenção possui o objetivo de obter vanilina em grande quantidade, juntamente com algumas notas adicionais do aroma da baunilha, isso independente da época do ano ou das condições climática, além disso, a produção ocorre em ambiente axênico.

[008]. Esse objetivo é atingido usando a cultura de tecidos vegetais (ambiente axênico), no entanto, para isso, explantes de *Vanilla planifolia* são cultivados em duas-fases de culturas, sendo que na primeira o cultivo é realizado usando meios de cultura com condições que favoreçam um grande incremento na biomassa e a segunda fase se faz uso de precursores e/ou elicitores para maximizar a indução da vanilina e das notas aromáticas da baunilha.

[009]. O processo detalhado consiste da germinação das sementes de *V. planifolia in vitro*, onde as vagens ainda verdes serão imersas em etanol 95% e flambadas por duas vezes, e rapidamente o fogo deverá ser apagado para não danificar as sementes dentro da vagem. Cada flambagem é realizada segurando a vagem em lugares diferentes com a pinça. Após esse processo de desinfestação superficial da vagem, esta é cortada de forma a permitir uma raspagem das sementes para os frascos contendo meio de cultura. Esse meio de cultura poderá ser o meio de Knudson, meio de Vicent e Went ou meio de Murashige e Skoog, o importante é que seja suplementado com sacarose (15-25 $g.L^{-1}$) e solidificado, podendo ser usado agar (4 a 8 g.L-1) ou phytagel (1,8 a 3,2 g.L-1).

[010]. As sementes inoculadas *in vitro* deverão permanecer por um período de cerca de 100 a 200 dias em uma sala de crescimento, com temperatura de 25°C ± 2°C e 16 horas de fotoperíodo, sob uma

intensidade luminosa de 20-60 $\mu M.m^{-2}.s^{-1}$ obtida com lâmpadas fluorescentes brancas.

[011]. As sementes germinadas serão transferidas para um meio de multiplicação (i.e. para a proliferação dos explantes). Para essa fase o meio de cultura mais indicado é o meio de Murashige e Skoog, contendo de 40-60 $mg.L^{-1}$ de cisteína, 2-5 $g.L^{-1}$ de carvão ativado, 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (2-3 $mg.L^{-1}$) e ácido naftalenoacético (0,05-0,15 $mg.L^{-1}$). O pH pode variar de 5,4 até 6,0. Nessa fase de proliferação dos explantes, os meios de cultura podem ser sólidos (i.e. usando cultivo convencional em frascos) ou líquidos, no caso do cultivo em biorreatores de imersão temporária. Biorreatores de imersão temporária devem ser usados para evitar a hiperhidricidade.

[012]. Essa fase da multiplicação dos explantes é usada como fonte de novos materiais que serão subcultivados para gerar sempre matéria prima nova. Dessa forma, um lote (aproximadamente 50%) é utilizado para gerar novos explantes e outro lote (aproximadamente 50%) é usado para acumular biomassa, fazendo uso das mesmas condições. Essa fase de acumulação da biomassa (Fase 1) poderá ser realizada desde 30 dias até 120 dias, considerando que após 120 dias sem ocorrer cortes nos explantes, isso poderá resultar na regeneração desses explantes em plântulas, o que nesse caso não é desejado.

[013]. Após a obtenção do acúmulo de biomassa (Fase 1) nos explantes de *V. planifolia*, esses serão subcultivados nos mesmos meios de cultura, porém, com suplementação dos precursores ou elicitores (Fase 2), que poderão ser: (1) cisteína (10 a 80 $mg.L^{-1}$), (2) 1 até 8 $mL.L^{-1}$ de vitaminas Fuji (i.e. consistem de 2,5 $g.L^{-1}$de ácido nicotínico, 2,5 $g.L^{-}$

$^{-1}$ de cloridrato de piridoxina, 0,5 g.L^{-1} de tiamina. HCL, 50 g.L^{-1} de mio-inositol e 1 g.L^{-1} de glicina), (3) 10 até 300 mg.L^{-1} de ácido ferúlico, (4) 1 até 500 mg.L^{-1} de fenilalanima e (5) 1 a 100 mg.L^{-1} de ácido cinâmico. Esse fase poderá durar de 5 até 30 dias, podendo ser realizada em biorreatores de imersão temporária (meio líquido) ou cultivo convencional (meio sólido).

[014]. Após o cultivo da fase 2, os explantes são removidos das condições de cultivo podendo ser secos em estufa (40 a 60°) ou proceder direto para a extração da vanilina e dos compostos aromáticos. Os explantes usados para o processo de extração poderão estar frescos ou secos. A extração poderá ser realizada em soxhlet (2 a 5 g de biomassa macerada) em solvente etanol 90-99.9%, com temperatura do banho em torno de 70°C, ou por fluido supercrítico. O tempo de extração poderá ser de 6-10 horas. Após a extração, o solvente será eliminado por evaporação em estufa com circulação de ar a 40-45°C (nesse ponto o processo já pode ser interrompido com a obtenção de um extrato seco e estável). Entretanto, esse material seco poderá ainda ser liofilizado ou microencapsulado por spray dryer, para aumentar o tempo de armazenamento do produto obtido.

[015]. O processo de cura (beneficiamento e secagem da vagem) pode ser realizado a partir dos explantes coletados da segunda fase, para esse processo de cura, os mais diferentes procedimentos encontrados na literatura poderão ser utilizados.

[016]. A figura 1 apresenta o fluxograma geral do processo descrito.

REIVINDICAÇÕES

1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado por** pelo processo com as seguintes etapas:

A) Germinação *in vitro* de sementes de *Vanilla planifolia*, o pH dos meios de cultura pode variar de 5,4 até 6,0;

B) Proliferação dos explantes em meio de multiplicação, usado para sucessivas repicagens (subcultivos) como método para a produção contínua de matéria prima e como fase 1, cultivo para promover maior acúmulo de biomassa (podendo ser relizada em biorreatores ou cultivo convencional em frascos);

C) Cultivo na fase 2, que consiste em maior incremento no teor de vanilina e dos demais compostos do aroma da baunilha promovidos pela suplementação no meio de cultura dos elicitores e/ou precursores (a fase 2 também poderá ser realizada em biorreatores ou cultivo convencional);

D) Ao final da fase 2, os explantes coletados ainda frescos poderão ser submetidos a algum processo de cura (beneficiamento e secagem) ou serem submetidos à extração da vanilina e das demais notas aromáticas;

E) A extração da vanilina e das demais notas aromáticas poderá ser realizada por fluido supercrítico ou aparelho Soxhlet usando etanol como solvente e em seguida os extrativos poderão ser secos em estufa (40-45°C), durante essa secagem ocorrerá à remoção do solvente;

F) Além da secagem do extrato em estufa, ele ainda poderá ser liofilizado ou microencapsulado por spray dryer, para aumentar a estabilidade e durabilidade do produto.

2 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser a vanilina e as demais notas do aroma de baunilha produzido em um sistema de duas fases, em que a primeira fase consiste da produção de grande quantidade de biomassa e a segunda fase consiste na suplementação de elicitores e/ou precursores para induzir maior produção de vanilina e dos demais aromas de baunilha.

3 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado por** ser o cultivo da fase 1, realizada de 30 até 120 dias, e cultivado em meio Murashige e Skoog, contendo de 40-60 $mg.L^{-1}$ de cisteína, 2-5 $g.L^{-1}$ de carvão ativado, 30 $g.L^{-1}$ de sacarose e os reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (2-3 $mg.L^{-1}$) e ácido naftalenoacético (0,05-0,15 $mg.L^{-1}$).

4 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado por** ser o cultivo da fase 2, subcultivados de 5 a 30 dias nos mesmo meio de cultura da fase 1, porém, com suplementação dos precursores ou elicitores da fase 2, que poderão ser: (1) cisteína (10 a 80 $mg.L^{-1}$), (2) 1 até 8 $mL.L^{-1}$ de vitaminas Fuji (i.e. consistem de 2,5 $g.L^{-1}$

de ácido nicotínico, 2,5 $g.L^{-1}$ de cloridrato de piridoxina, 0,5 $g.L^{-1}$ de tiamina. HCL, 50 $g.L^{-1}$ de mio-inositol e 1 $g.L^{-1}$ de glicina), (3) 10 até 300 $mg.L^{-1}$ de ácido ferúlico, (4) 1 até 500 $mg.L^{-1}$ de fenilalanima e (5) 1 a 100 $mg.L^{-1}$ de ácido cinâmico.

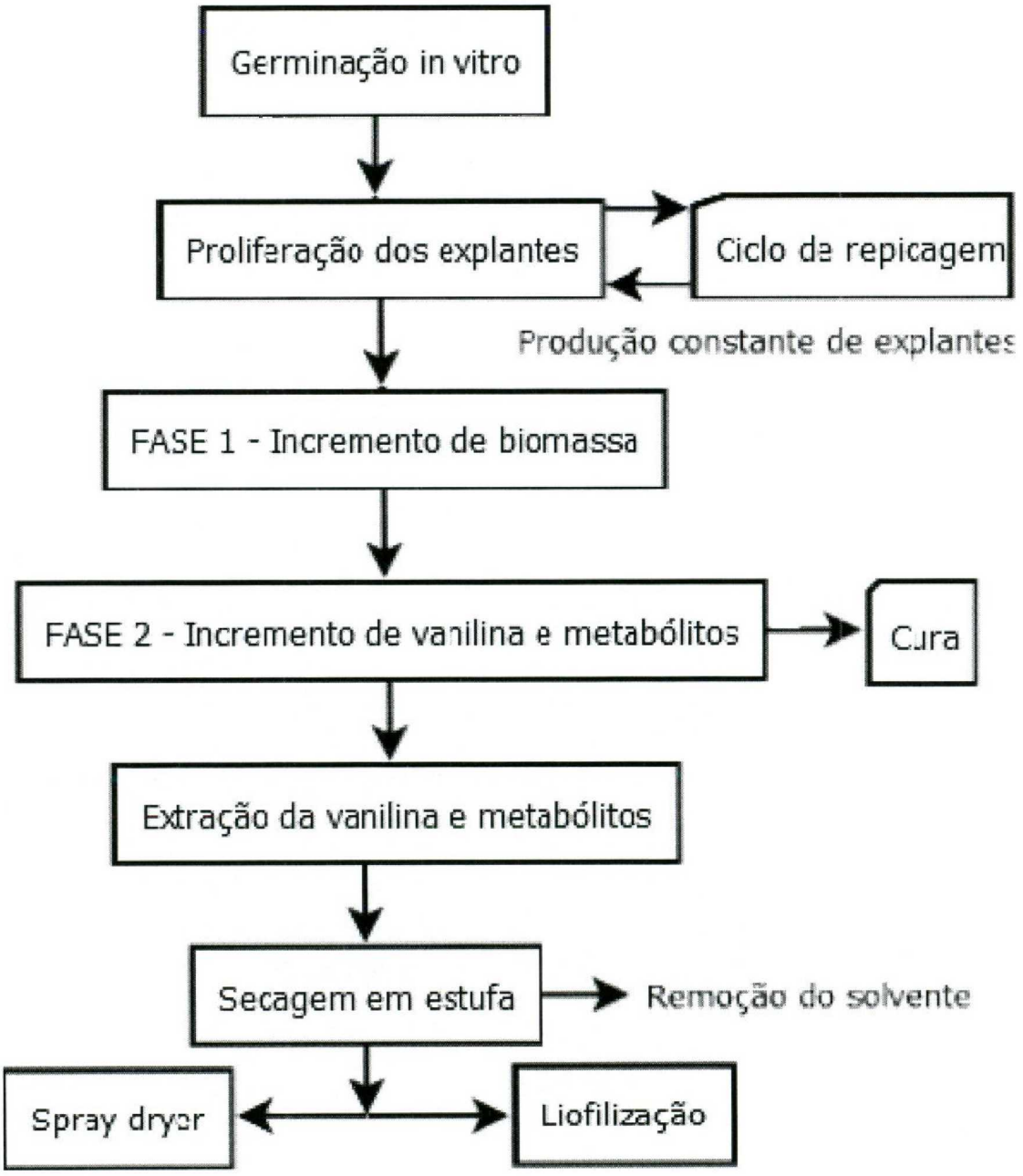
5 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado pela** coleta dos explantes cultivados *in vitro*, no final da fase 2 e submetidos a diferentes processos de beneficiamento, tais como a cura;

6 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado pela** extração da vanilina e dos demais compostos de aroma da baunilha a partir dos explantes coletados no final da fase 2, por aparelho soxhlet em solvente etanol 90-99.9%, com temperatura do banho em torno de 70°C e o tempo de extração poderá ser de 6-10 horas;

7 - PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES, **caracterizado pela** secagem dos extratos, em que o solvente será eliminado por evaporação em estufa com circulação de ar a 40-45°C (nesse ponto o processo já pode ser interrompido com a obtenção de um extrato seco e estável), porém, o material seco poderá ainda ser liofilizado ou seco por spray dryer, para aumentar o tempo de armazenamento e estabilidade do produto obtido.

DESENHO

Figura 1



RESUMO

PRODUÇÃO DE VANILINA A PARTIR DE EXPLANTES DE *VANILLA PLANIFOLIA* CULTIVADOS EM SISTEMA DE DUAS-FASES

A presente patente de invenção apresenta um processo biotecnológico de produção de vanilina e de outras notas aromáticas de baunilha via cultura de tecidos. Brotações múltiplas são cultivadas em um sistema de duas-fases, em que a primeira fase consiste da produção de grande quantidade de biomassa e a segunda fase consiste na suplementação de elicitores e/ou precursores para induzir maior produção de vanilina e dos demais aromas de baunilha. A extração dos metabólitos é realizada a partir dos explantes cultivados *in vitro*. A grande vantagem desse processo e que a vanilina é produzida juntamente com outras notas do aroma de baunilha e a produção é maior do que a obtida nas vagens da *Vanilla planifolia* cultivada no campo, além do processo ocorrer em condições ambientais controladas e em qualquer época do ano.