



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102018075867-5 A2



(22) Data do Depósito: 13/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 23/06/2020

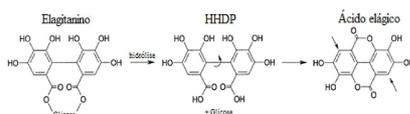
(54) Título: PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

(51) Int. Cl.: C12P 17/16; C12R 1/66.

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

(72) Inventor(es): LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE; PRISCILLA ZWIERCHECZEWSKI DE OLIVEIRA; CARLOS RICARDO SOCCOL.

(57) Resumo: Esta invenção apresenta uma técnica simples e de baixo custo para a obtenção do ácido elágico, uma molécula de grande interesse comercial e de alto valor agregado, com efeitos antioxidantes aplicados em cosméticos. Para tal, foi utilizado meio fermentativo de baixo custo, oriundo de subprodutos da cadeia produtiva do cacau, ou seja, cascas de cacau (Certificado SisGen Nº A4EC257). São propostos dois exemplos de produção do ácido elágico, ambos são realizados via fermentação submersa: o primeiro utiliza o extrato aquoso da casca de cacau como substrato, com adição de sais, para o microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 ? CCT 7717 (Certificado SisGen Nº A4D4320), o segundo relata a utilização do suco de romã adicionado ao extrato aquoso da casca de cacau, de modo a enriquecer o meio fermentativo em proporções diferentes de fonte de elagitanino, o precursor do ácido elágico. A presente invenção também descreve uma técnica de extração em fase sólida, para a clarificação das amostras e remoção de possíveis interferentes durante as análises de quantificação em cromatografia.



PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU

Campo da Invenção

[001]. Esta invenção está inserida na área da biotecnologia agro-alimentar e indústria, mais especificamente na área de produção de biomoléculas, ácidos orgânicos (ácido elágico).

[002]. O uso da casca de cacau insere-se na área de tecnologia e inovação para o aproveitamento de resíduos agroindustriais. O ácido elágico possui potencial antioxidante, logo, sua aplicação está inserida em cosméticos e em tratamentos estéticos.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[003]. Esta invenção refere-se ao desenvolvimento de processo de produção de ácido elágico a partir do microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717, com o uso da casca de cacau como base para meio de produção e fonte de nutrientes. O objetivo principal da presente invenção é a diminuição do impacto ambiental por meio do reaproveitamento de casca de cacau para a produção de biomolécula de interesse industrial de alto valor agregado, o ácido elágico e, dessa forma, reduzir o seu custo de produção.

[004]. Foi realizada uma pesquisa de anterioridade apresentada na Tabela 1, utilizando como critério de busca o conjunto de palavras-chave que relaciona a produção de ácido elágico a partir da casca de cacau, em inglês *ellagic acid production cocoa husk*.

Tabela 1 – Resultados da pesquisa nas bases de dados nacionais e internacionais de registros relacionados a presente invenção.

Palavra-chave	Base de dados						
	WIPO	INPI*	Espacenet	Google patents	USPTO	CIPO	FPO
<i>Ellagic acid production cocoa husk</i>	157	51.849	61	170	0	0	67

*Para a pesquisa no INPI, as palavras-chave foram traduzidas para a língua Portuguesa.

[005]. Na base de dados WIPO, nenhum dos 157 resultados para a produção de ácido elágico com uso de casca de cacau se relaciona à invenção proposta. Não foram encontrados registros para a base de dados dos Estados Unidos e para a base de dados canadense. Foram encontrados 61 registros de busca na base europeia de dados Espacenet, dos quais, nenhum deles correspondeu à combinação de palavras-chave, os resultados relacionam-se à aplicação do cacau como aditivo alimentar.

[006]. Foi encontrado elevado número de registros no INPI, porém, sem relação com esta invenção proposta. Na base de dados *Google Patents*, bem como na FPO – *Free Patents Online*, retornaram poucos resultados e nenhum se relaciona com esta invenção.

[007]. As publicações encontradas, em todos os casos, relacionam-se a aplicações diversas da casca de cacau, tais como desenvolvimento de moedor de cascas, produção de extrato da casca de cacau concentrado, extração de esteroides e de fibras da casca de cacau. Os demais resultados relacionam-se ao uso das amêndoas do cacau visando à produção do chocolate, e também, à aplicação da polpa do cacau em diversas bebidas. Demais resultados estão relacionados às aplicações do ácido elágico pela indústria de fármacos e cosméticos. Nenhum registro nem de patente, nem de publicação científica foi encontrado reportando o uso da casca de cacau como substrato para a produção de ácido elágico.

[008]. O cacau (*Theobroma cacao* L.) é o fruto da árvore cacaueteira de origem da América Central e do Sul. O seu desenvolvimento necessita de solos profundos com uma regularidade de chuva ao longo do ano, com preferência para que as temperaturas variem entre 18 e 32 °C. Famoso desde a época do descobrimento do continente, considerado um fruto dos deuses, suas amêndoas são retiradas para a produção do chocolate (OETTERER, M. et al. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. São Paulo: Ed. Manole. 2006). Tal prática gera um grande volume de cascas sem destino apropriado e, por apresentar nutrientes favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, as cascas rapidamente sofrem processo de decomposição. Além do ponto de vista ambiental, a utilização dos resíduos/subprodutos agroindustriais em processos fermentativos apresenta potencial econômico. A exploração desses resíduos visa uma maior produtividade e menor custo da biomolécula de interesse, pois são materiais de disponibilidade ao longo do ano e em grandes volumes. Isso traz como possibilidade o emprego desses resíduos como substrato/suporte em processos de fermentação submersa para a produção de biomoléculas de interesse comercial, a exemplo de ácidos orgânicos como o ácido elágico.

[009]. Os ácidos orgânicos são característicos pela sua estrutura molecular, que permite uma ampla aplicação industrial bem como suas fontes naturais são abundantes. O ácido elágico possui uma estrutura complexa que é formada a partir da hidrólise do seu precursor elagitanino, pertencente a uma classe de taninos hidrolisáveis (OKUDA, T. et al. *Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. Planta Medica*, v. 55, n. 02, p. 117-122, 1989). Em meio aquoso, a estrutura do elagitanino é hidrolisada, chegando-se à estrutura temporária do ácido hexahidroxidifênico (HHDP), caracterizada por apresentar uma dilactona e quatro anéis aromáticos – tais características conferem

zonas hidrofílicas e lipofílicas, respectivamente. A estrutura do ácido HHDP rapidamente sofre um rearranjo, transformando-se em ácido elágico, como pode ser visualizado na Figura 1. Na natureza, o ácido pode se apresentar sob três formas: a do seu precursor, a forma de ácido elágico livre e a forma de ácido elágico glicosídico – sendo estas últimas, as formas menos frequentes (*HÄKKINEN, S. H. et al. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. European Food Research and Technology, v. 212, n. 1, p. 75-80, 2000; ZAFRILLA, P. et al. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (Rubus idaeus) jams. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 8, p. 3651-3655, 2001; BALA, I. et al. Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006*).

[010]. Figura 1 – Formação da estrutura do ácido elágico a partir do precursor elagitanino.

Fonte: Adaptado de HÄKKINEN et al. Ellagic acid content in berries: influence of domestic processing and storage. *European Food Research and Technology*, v. 212, n. 1, p. 75-80, 2000.

[011]. O ácido elágico é encontrado em nozes e castanhas, em madeiras utilizadas para o envelhecimento de bebidas e principalmente em frutas *berries*, que podem apresentar um conteúdo de ácido de até 15 vezes o conteúdo presente em frutas de consumo diário (*TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 80, n. 7, p. 1024-1032, 2000*). Em nível comercial, a sua aplicabilidade está concentrada na indústria de cosméticos e em tratamentos estéticos (*AGUILERA-CARBÓ et al.*

Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 78, n. 2, p. 189- 199, 2008). Tal fato é decorrente de suas propriedades antioxidantes com ação em radicais livres, o que atrai a atenção para o seu uso em loções de efeito rejuvenescedores (*CRUZ-ANTONIO et al. Propriedades químicas e industriales del ácido elágico. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila. 2, n. 3, p. 1. 2010*). Com produção onerosa, sua síntese está limitada a processos químicos. Para uma síntese por meio da bioconversão, é necessária uma ação sinérgica de enzimas da classe das hidrolases, tais como celulasas, xilanases e tanino acil hidrolases, as quais atuam nas ligações ésteres, ligações C- glicosídicas e ligações carbono-carbono da estrutura do elagitanino (*HUANG, H. et al. Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns. Process Biochemistry, v. 42, n. 9, p. 1291-1295, 2007*).

[012]. Estudos sobre a obtenção do ácido elágico por síntese microbiana são pouco relatados. Até o momento se tem o conhecimento da utilização de fungos capazes de secretar as enzimas mencionadas, os quais estão listados na Tabela 2. Tal fato é interessante e motiva a presente invenção para o desenvolvimento de processo para a produção de ácido elágico utilizando uma linhagem de *Aspergillus niger* em cultivo submerso contendo extrato aquoso de casca de cacau, o qual por sua vez é um substrato pouco explorado e apresenta composição físico-química favorável ao desenvolvimento microbiano (Tabela 3).

Tabela 2 – Microrganismos e fontes vegetais utilizados para a produção de ácido elágico

Microrganismo	Fonte vegetal	Produção	Referência
<i>Lentinus edodes</i>	Bagaço de mirtilo	350 µg g ⁻¹	1
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Bagaço de mirtilo	375 µg g ⁻¹	2
<i>Aspergillus niger</i> SHL6	Casca de carvalho	160 mg g ⁻¹	3
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Casca de romã	6,3 mg g ⁻¹	4
<i>Aspergillus niger</i> PSH	Casca de romã	4,6 mg g ⁻¹	4
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Casca de romã	12,39 mg g ⁻¹	5
<i>Aspergillus niger</i> PSH	Plantas creosote e tar bush	4,74 mg g ⁻¹ e 7,56 mg g ⁻¹	6

Referências: 1, Vatter, D. A.; Shetty, K. Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, v.39, n.3, p.367-379, 2003; 2, Vatter, D. A.; Shetty, K. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology*, v.16, n.3, p.189-210, 2002; 3, Huang, W.; Ni, J.; Borthwick, A. G. L. Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 3, p. 1245- 1249, 2005; 4, Robledo, A. et al. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 35, n. 6, p. 507-513, 2008; 5, Aguilera-Carbó, A. F. Producción de ácido elágico: estudios enzimáticos. 2009. 131 f. Tesis (Doctorado en Biotecnología) - Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F., 2009; 6, Ventura, J. et al. Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata*) and tar bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, v. 46, n. 2, p. 213, 2008.

Tabela 3 – Composição físico-química da casca de cacau

Parâmetro	Resultado	Referência
Estrutura lignocelulósica	Aprox. 35%	1
Estrutura péctica	Aprox. 40%	1
Proteínas totais	Até 18 g 100 g ⁻¹	2
Açúcares totais	63 g 100 g ⁻¹	3
Açúcares redutores	23 g 100 g ⁻¹	3
Minerais predominantes	2768 mg 100 g ⁻¹ potássio 3974 mg 100 g ⁻¹ zinco	4
Atividade de água	0,283	3
Cinzas	8,2%	3
Umidade	3,4%	3
pH	6,18	3

Referências: 1, Adamafo, N. A. Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. *Journal of Biological Sciences*, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013; 2, Bonvehí, J. S.; Coll, F. V. Protein quality assessment in cocoa husk. *Food Research International*, v. 32, n. 3, p. 201-208, 1999; 3, Oliveira, P. Z. Produção de ácidos orgânicos (cítrico e elágico) a partir de casca de cacau. Dissertação (Mestrado em engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017; 4, Vriesmann, L. C.; Amboni, R. D. M. C.; Petkowicz, C. L. O. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, v. 34, n. 1, p. 1173-1181, 2011.

[013]. Na presente invenção, também é aplicado o suco da romã como uma fonte suplementar de elagitanino, adicionada ao extrato aquoso da casca de cacau, bem como o uso da técnica de extração em fasesólida.

[014]. A romã é relatada pela literatura como a fruta que apresenta uma concentração de ácido elágico superior às demais tradicionais, e nos últimos anos, tem atraído o interesse de pesquisas na área da saúde por apresentar propriedades antioxidantes devido à presença de elagitaninos (*AGUILERA-CARBÓ, A. F. Producción de ácido elágico: estudios enzimáticos. Tesis (Doctorado en Biotecnología) - Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F., 2009*).

[015]. A extração em fase sólida é utilizada para a purificação e concentração de amostras em etapas pré-cromatográficas pela eficiência de recuperação de determinados compostos, reduzindo o tempo de preparo de amostras a serem analisadas. Possui um comportamento semelhante ao das colunas de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa, que consiste em uma fase ligada à base de sílica com forte propriedade hidrofóbica, utilizada para isolar compostos específicos para fins qualitativos e quantitativos (*YAN, L. et al. Method development and validation for pharmacokinetic and tissue distributions of ellagic acid using ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Molecules, v. 19, n. 11, p. 18923-18935, 2014*).

Descrição da abordagem do problema técnico

[016]. O Brasil é o sétimo produtor mundial de cacau, destacando-se os estados do Pará e da Bahia, e o segundo produtor da América Latina (*PICOLOTTO, A. et al. Cadeia Produtiva do Cacau.*

Organização Internacional do Trabalho - OIT e Ministério Público do Trabalho - MPT. Novembro, 2018). De acordo com as informações da pesquisa referente ao mês de Outubro de 2018, realizada pelo Levantamento Sistemático da Produção Agrícola do IBGE, a produção brasileira está estimada em 252.890 toneladas de cacau (*Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - SIDRA, IBGE. Tabela 1618 - Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto das lavouras.* Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>>. Acesso em: 05 dez. 2018).

[017]. A sua importância econômica está atribuída à produção do chocolate, obtido a partir de suas amêndoas. Tal fração é extremamente valiosa para a indústria e representa apenas 20% de todo o fruto. Devido a essa subutilização das demais partes do cacau, é frequente encontrar suas cascas – que representam 80% do peso seco do fruto – expostas ao ambiente da própria plantação, suscetíveis às intempéries do tempo e aos ataques microbianos, além da contaminação do solo e da cultura cacauífera. É exatamente essa questão observada no Brasil durante a década de 90, quando as culturas foram fortemente prejudicadas devido à manifestação da praga denominada vassoura-de-bruxa, promovendo a quase extinção do cacau no país. Em relação aos resíduos do cacau, são encontrados números preocupantes, nos quais, para cada 1 tonelada de amêndoas retiradas é gerada aproximadamente 7 toneladas de casca de cacau (*FIGUEIRA, A. et al. New products from Theobroma cacao: seed pulp and pod gum. New Crops. New York: Wiley, p. 475-8, 1993; SODRÉ, G. A. et al. Extrato da casca do fruto do cacauífera como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacauífera. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 34, n. 3, p. 881-887, 2012).*

[018]. Dessa forma, a permanência das cascas na área de plantação tornou-se uma preocupação ambiental, pois, atualmente, quando não dispostas no solo, as cascas são destinadas para a combustão (DELLA, V. P. et al. *Reciclagem de resíduos agro-industriais: Cinza de casca de arroz como fonte alternativa de sílica. Cerâmica Industrial*, v. 10, n. 2, p. 22-25, 2005; SYAMSIRO, M. et al. *A preliminary study on use of cocoa pod husk as a renewable source of energy in Indonesia. Energy for Sustainable Development*, v. 16, n. 1, p. 74-77, 2012; ODDOYE, E. O. K. et al. *Cocoa and its by-products: identification and utilization. In: Chocolate in Health and Nutrition, Humana Press*, p. 23-37, 2013; BATISTA, R. R. et al. *Routes of technological exploitation of agricultural waste for power generation. Latin American Journal of Energy Research*, v. 2, n. 1, p. 15- 27, 2015). Este fato, recentemente, tem atraído o interesse de estudos sobre possíveis aplicações industriais (ODDOYE, E. O. K. et al. *Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs. Scientific Research and Essays*, v. 5, n. 10, p. 1141-1144, 2010; DINIZ, D. M. et al. *Produção de goma xantana por cepas nativas de Xanthomonas campestris a partir de casca de cacau ou soro de leite. Polímeros*, v. 22, n. 3, p. 278-281, 2012; SODRÉ, G. A. et al. *Extrato da casca do fruto do cacaueiro como fertilizante potássico no crescimento de mudas de cacaueiro. Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 34, n. 3, p. 881-887, 2012; KRISHNA, C. *A research on cocoa pod husk activated carbon for textile industrial wastewater colour removal. International Journal of Research in Engineering and Technology*, v. 3, n. 3, 2014; KARIM, A. A. et al. *Efficacy of cocoa pod extract as antiwrinkle gel on human skin surface. Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 15, n. 3, p. 283-295, 2016) e sobre sua composição (ALEMAWOR, F. et al. *Broiler performance on finisher diets containing different levels of either Pleurotus ostreatus-fermented dried*

cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes. Tropical Animal Health and Production v. 42, p. 933-939. 2010; ADAMAFIO, N. A. Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. Journal of Biological Sciences, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013; KRISHNA, J. I. G.; CHANDRASEKARAN, M. Biochemical and nutritional aspects of food processing by-products. In: Valorization of Food Processing By-Products. CRC Press, p. 167, 2013). Em relação à sua composição, as cascas possuem um conteúdo interessante de nutrientes (ADOMAKO, D. *Cocoa pod husk pectin. Phytochemistry, v. 11, n. 3, p. 1145-1148, 1972; BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Protein quality assessment in cocoa husk. Food Research International, v. 32, n. 3, p. 201-208, 1999; ADAMAFIO, N. A. Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. Journal of Biological Sciences, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013*), favorável ao desenvolvimento microbiano, principalmente para fungos filamentosos por apresentar aproximadamente 35% de conteúdo lignocelulósico (ALEMAWOR, F. et al. *Broiler performance on finisher diets containing different levels of either Pleurotus ostreatus-fermented dried cocoa pod husk or dried cocoa pod husk supplemented with enzymes. Tropical Animal Health and Production v. 42, p. 933-939. 2010; ADAMAFIO, N. A. Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: an overview. Journal of Biological Sciences, v. 13, n. 7, p. 570-576, 2013*). Com isso, o presente processo visa o aproveitamento de um resíduo ou subproduto da agroindústria que apresenta composição favorável ao uso como substrato/suporte para microrganismos na produção de biomoléculas de interesse industrial.

[019]. Esta inovação aplica-se em:

- [020]. Explorar o potencial da casca de cacau como substrato/suporte na produção de ácido elágico;
- [021]. Desenvolvimento de bioprocessos de custo reduzido.

[022]. O processo desenvolvido apresenta as seguintes vantagens em relação às técnicas já existentes:

- [023]. Diminuição de problemas ambientais na cadeia produtiva do cacau com a utilização de um resíduo/subproduto;
- [024]. Meio fermentativo de baixo custo;
- [025]. Tecnologia simples para produção de biomolécula de alto valor agregado;
- [026]. Possibilidade de parceria com as fazendas cacaeiras e empresas produtoras de chocolate, visando o aproveitamento das cascas de cacau remanescentes do processamento do fruto.

Descrição detalhada da Invenção

[027]. *Inóculo*

[028]. O microrganismo utilizado na produção de ácido elágico é o *Aspergillus niger* CCT 7717 (Certificado SisGen Nº A4D4320) armazenado sob o código LPB B6, e foi obtido pela mutação induzida por radiação UV do microrganismo *Aspergillus niger* CCT 7716, armazenado sob o código LPB BC (Certificado SisGen Nº A4D4320), isolado do bagaço da cana-de-açúcar. Ambas as linhagens encontram-se depositadas no banco de cepas do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, e estão

catalogadas pela Coleção de Culturas Tropical, da Fundação André Tosello. A cepa é previamente armazenada em tubos inclinados contendo Agar Batata Dextrose, preparado na concentração de 39 g L^{-1} . Após 7 dias de incubação (28-30 °C) os tubos são mantidos sob refrigeração.

[029]. Os inóculos são preparados por meio da produção de esporos em meio sólido contendo Agar Batata Dextrose. São utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do meio, inoculados em profundidade, permanecendo em estufa a 30 °C durante 7 dias.

[030]. A suspensão dos esporos é preparada a partir da extração dos esporos cultivados em Agar Batata Dextrose com o uso da solução extratora de Tween 80 0,01%. A suspensão é então submetida à contagem de esporos em câmara de Neubauer, para a determinação do volume de inóculo a ser adicionado aos cultivos.

[031]. *Exemplo 1 de produção de ácido elágico*

[032]. O meio de cultura para a produção de ácido elágico tem como substrato a casca de cacau (Certificado SisGen Nº A4EC257), na forma de extrato aquoso, o qual é obtido da suspensão de casca de cacau (10 g) em água deionizada (100 mL) incubado durante 15 minutos em banho-maria a 96 °C. E, ao extrato, são adicionados os sais: NaNO_3 (2 g L^{-1}), KH_2PO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), KCl ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,001 \text{ g L}^{-1}$).

[033]. O processo de produção de ácido elágico é realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de extrato da casca de cacau adicionado dos sais. O meio é inoculado com a suspensão de esporos previamente preparada, em concentração de 1×10^7 esporos mL^{-1} . Após 96 horas de cultivo em *shaker* a 30 °C com agitação de 120

rpm, o conteúdo de ácido elágico, presente no meio de produção, é separado das células e submetido à análise em cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da concentração produzida.

[034]. A quantificação do ácido elágico produzido é realizada em cromatografia líquida de alta eficiência com base no método utilizado por *Gonçalves (2016) (Gonçalves, C. G. Avaliação do impacto da fermentação, secagem e torração sobre o perfil dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de sementes de cacau (Theobroma cacao var. Forasteiro) produzidos no Estado do Pará. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará. Belém, 2016)*. O método consiste em fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) acidificados com 2,5% de ácido acético conforme o gradiente de eluição a seguir:

- [035]. 0-18 minutos a 5% do solvente B;
- [036]. 18-25 minutos a 25% do solvente B;
- [037]. 25-27 minutos a 95% do solvente B;
- [038]. 27-27,5 minutos a 95% do solvente B;
- [039]. 27,5-32 minutos a 5% do solvente B.

[040]. É utilizado um fluxo de 1 mL min⁻¹, com volume de injeção da amostra de 20 µL e a temperatura da coluna é mantida a 35 °C. A detecção é realizada em comprimento de onda de 280 nm, em equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna C18 Zorbax Eclipse XDB 4,6 x 150 mm, 5 µm.

[041]. Nas condições de processo de produção descritas, a produção de ácido elágico pelo microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 chega a uma concentração de 0,1511 mg de ácido g⁻¹ de casca de cacau.

[042]. O processo de produção de ácido elágico proposto pelo Exemplo 1 é esquematizado no Fluxograma 1.

[043]. Figura 1: Fluxograma 1 – Etapas para o processo de produção de ácido elágico: Exemplo 1

[044]. Exemplo 2 de produção de ácido elágico

[045]. O mesmo procedimento de produção do ácido elágico é realizado em fermentação submersa da mesma forma descrita anteriormente, porém neste caso, o meio de cultura pode ser preparado com a adição de diferentes proporções de suco de romã e de extrato de casca de cacau, cuja composição em elagitaninos pode ser favorável à produção de ácido elágico.

[046]. O meio de cultura tem como fonte de carbono a casca de cacau e o suco da romã. A este meio, são adicionados os sais: NaNO_3 (2 g L^{-1}), KH_2PO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), KCl ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,001 \text{ g L}^{-1}$).

[047]. A casca de cacau é utilizada na forma de extrato aquoso, o qual é obtido da suspensão de casca de cacau (10 g) em água deionizada (100 mL) incubado durante 15 minutos em banho-maria a $96 \text{ }^\circ\text{C}$. O suco da romã é obtido do processamento da polpa e sementes da fruta.

[048]. O processo de produção de ácido elágico é realizado em frascos de Erlenmeyer de 250 mL em sistema fechado, contendo 100 mL de meio de cultura adicionado dos sais, constituído de extrato de casca de cacau e suco de romã em três diferentes proporções:

[049]. a) meio de cultura consistindo da adição de 15 mL de suco de romã + 85 mL de extrato da casca de cacau (proporção 3:17);

[050]. b) meio de cultura consistindo da adição de 30 mL de suco de romã + 70 mL de extrato da casca de cacau (proporção 3:7);

[051]. c) meio de cultura consistindo da adição de 50 mL de suco de

romã + 50 mL de extrato da casca de cacau (proporção 1:1).

[052]. O meio de cultura é inoculado com a suspensão de esporos previamente preparada, em concentração de 1×10^7 esporos mL⁻¹. Após 96 horas de cultivo em *shaker* a 30 °C com agitação de 120 rpm, o conteúdo de ácido elágico é separado das células e submetido à análise em cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação da concentração de ácido elágico produzida.

[053]. Após a realização do processo de fermentação, é utilizada a técnica de extração em fase sólida, de modo a realizar uma clarificação das amostras e remoção de possíveis interferentes para as análises em cromatografia.

[054]. Utiliza-se na etapa de pré-cromatografia, a coluna Waters Sep-Pak Vac 35cc C18, 10 g, 60 mL, tamanho de partícula 55-105 µm, com base no trabalho de *Mininel, et. al. (2014) (Mininel, F. J. et al. Characterization and quantification of compounds in the hydroalcoholic extract of the leaves from Terminalia catappa Linn. (Combretaceae) and their mutagenic activity. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, ID 676902. 2014).*

[055]. O procedimento de extração consiste na utilização de 10 mL de metanol e 10 mL de água para a ativação da resina de sílica de adsorção da coluna. Após a ativação da resina, é realizada a passagem de 10 mL de amostra fermentada, cujo conteúdo em ácido elágico é retido. A eluição das moléculas de interesse da amostra que permanecem retidas na resina da coluna é realizada pela eluição com 25 ml de solvente metanol-água (1:1). Após a eluição, o solvente passa por um processo de concentração em estufa a vácuo antes da análise em cromatografia. Nestas condições é possível recuperar até 50% do conteúdo de ácidoelágico.

[056]. A quantificação do ácido elágico produzido é realizada em

cromatografia líquida de alta eficiência com base no método utilizado por *Gonçalves (2016)* (*Gonçalves, C. G. Avaliação do impacto da fermentação, secagem e torração sobre o perfil dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de sementes de cacau (Theobroma cacao var. Forasteiro) produzidos no Estado do Pará. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Pará. Belém, 2016*). O método consiste na extração em fase móvel água (solvente A) e acetonitrila (solvente B) acidificados com 2,5% de ácido acético com o seguinte gradiente de eluição:

- [057]. 0-18 minutos a 5% do solvente B;
- [058]. 18-25 minutos a 25% do solvente B;
- [059]. 25-27 minutos a 95% do solvente B;
- [060]. 27-27,5 minutos a 95% do solvente B;
- [061]. 27,5-32 minutos a 5% do solvente B.

[062]. É utilizado um fluxo de 1 mL min^{-1} , com volume de injeção da amostra de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e a temperatura da coluna é mantida a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. A detecção é realizada em comprimento de onda de 280 nm , em equipamento Agilent 1260 Infinity, coluna C18 Zorbax Eclipse XDB $4,6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$.

[063]. As etapas para a produção e extração de ácido elágico proposto pelo Exemplo 2 são dispostas em sequência no Fluxograma 2.

[064]. Figura 3: Fluxograma 2 – Etapas para o processo de produção de ácido elágico: Exemplo 2

[065]. Nas condições de processo de produção e de extração descritas, a produção de ácido elágico pelo microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 chega a uma concentração de $2,3463 \text{ mg}$

ácido g⁻¹ de casca de cacau em meio de cultivo contendo 15 mL de suco de romã + 85 mL de extrato de casca de cacau (proporção 3:17).

[066]. Utilizando o meio de cultivo contendo 30 mL de suco de romã + 70 mL de extrato de casca de cacau (proporção 3:7), a produção de ácido elágico pelo microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 chega a uma concentração de 0,2117 mg ácido g⁻¹ de casca de cacau. E para o meio de cultivo contendo 50 mL de suco de romã + 50 mL de extrato de casca de cacau (proporção 1:1), não é detectada a produção de ácido elágico pelo microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Produção de ácido elágico em meio de cultivo contendo suco de romã e extrato de casca de cacau, após extração em fase sólida e análise em cromatografia líquida de alta eficiência

Amostra fermentada	Concentração de ácido elágico (mg g⁻¹)
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:17)	2,3463
Suco romã – extrato de casca de cacau (3:7)	0,2117
Suco romã – extrato de casca de cacau (1:1)	n.d.

n.d. não detectado.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO, UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO, caracterizado por ser realizado em fermentação submersa, utilizando como componente do meio de cultivo, um extrato aquoso de casca de cacau como substrato.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO, UTILIZANDO CASCA DE CACAU COMO SUBSTRATO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela definição de um meio submerso de produção composto por extrato aquoso da casca de cacau obtido a partir de 10 g de casca em 100 mL de água deionizada mantidos em banho-maria a 96 °C durante 15 minutos, e posterior filtração convencional, adicionado de nitrato de sódio, a uma concentração de 2 g l⁻¹, fosfato de potássio monobásico, a uma concentração de 0,5 g l⁻¹, fosfato de potássio dibásico heptahidratado, a uma concentração de 0,5 g l⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado, a uma concentração de 0,5 g l⁻¹, cloreto de potássio, a uma concentração de 0,5 g l⁻¹, e sulfato ferroso heptahidratado a uma concentração de 0,001 g l⁻¹.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por utilizar linhagem de *Aspergillus niger* LPB B6 (CCT 7717).

4. PROCESSO, de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizado pela fermentação submersa durar 96 horas, para a produção de ácido elágico.

5. PRODUTO COMPOSTO POR ÁCIDO ELÁGICO, de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado pela adição, ao extrato aquoso da casca de cacau, o qual foi adicionado de

nitrato de sódio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico heptahidratado, sulfato de magnésio heptahidratado, cloreto de potássio e sulfato ferroso heptahidratado, e ser suplementado com suco de romã – obtido a partir do processamento da polpa e sementes da romã, resultando em três diferentes proporções que consistem da adição de 15 mL de suco + 85 mL de extrato de cacau (3:17); 30 mL de suco + 70 extrato de cacau (3:7) e 50 mL suco + 50 mL extrato de cacau (1:1).

Desenhos

Figura 1

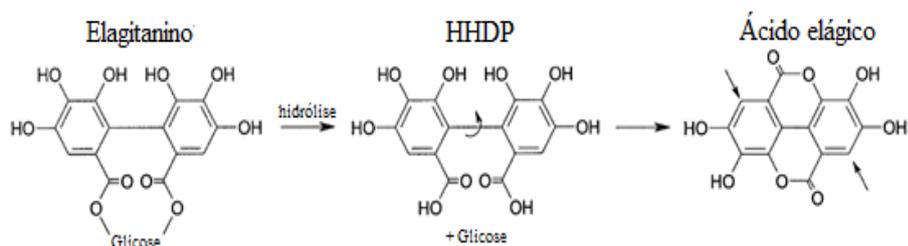


Figura 2

Preparo do inóculo	<ul style="list-style-type: none"> • Em profundidade em 50 ml de meio PDA; • Mantido em estufa a 30 °C/7 dias; • Suspensão de esporos: agitação magnética com solução de Tween 80 a 0,01%/15 min.
Obtenção do extrato aquoso de casca de cacau	<ul style="list-style-type: none"> • Suspensão de casca de cacau (10 g) em água deionizada (100 mL) incubado durante 15 minutos em banho-maria a 96 °C.
Meio de cultura	<ul style="list-style-type: none"> • 100 mL de extrato da casca de cacau; • Adição de sais.
Fermentação submersa	<ul style="list-style-type: none"> • Frascos de Erlenmeyer, sistema fechado com taxa de inoculação de 10⁷ esporos mL⁻¹; • Em shaker a 30 °C com agitação de 120 rpm/96h.
Cromatografia líquida de alta eficiência	<ul style="list-style-type: none"> • Metodologia utilizada por Gonçalves (2016).

Figura 3

Preparo do inóculo	<ul style="list-style-type: none"> • Em profundidade em 50 ml de meio PDA; • Mantido em estufa a 30 °C/7 dias; • Suspensão de esporos: agitação magnética com solução de Tween 80 a 0,01%/15 min.
Obtenção do extrato aquoso de casca de cacau	<ul style="list-style-type: none"> • Suspensão de casca de cacau (10 g) em água deionizada (100 mL) incubado durante 15 minutos em banho-maria a 96 °C.
Obtenção do suco de romã	<ul style="list-style-type: none"> • Processamento da polpa e sementes da fruta.
Meio de cultivo (100 ml)	<ul style="list-style-type: none"> • Adição de suco de romã e extrato aquoso de casca de cacau em três proporções: • 15 mL suco + 85 mL extrato (3:17); • 30 mL suco + 70 mL extrato (3:7); • 50 mL suco + 50 mL extrato (1:1).
Fermentação submersa	<ul style="list-style-type: none"> • Frascos de Erlenmeyer, sistema fechado com taxa de inoculação de 10^7 esporos ml^{-1}; • Em <i>shaker</i> a 30 °C com agitação de 120 rpm/96h.
Extração em fase sólida (coluna Waters Sep-Pak Vac 35cc C18)	<ul style="list-style-type: none"> • Ativação da resina da coluna: 10 mL de metanol e 10 mL de água; • Passagem de 10 mL de amostra fermentada (retenção do conteúdo de ácido elágico); • Eluição do conteúdo retido: passagem de 25 mL de solvente metanol-água (1:1).
Concentração do solvente	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do volume do solvente de eluição metanol-água (1:1) em estufa a vácuo.
Cromatografia líquida de alta eficiência	<ul style="list-style-type: none"> • Metodologia utilizada por Gonçalves (2016).

RESUMO***PRODUÇÃO DE ÁCIDO ELÁGICO A PARTIR DE CASCA DE CACAU***

Esta invenção apresenta uma técnica simples e de baixo custo para a obtenção do ácido elágico, uma molécula de grande interesse comercial e de alto valor agregado, com efeitos antioxidantes aplicados em cosméticos. Para tal, foi utilizado meio fermentativo de baixo custo, oriundo de subprodutos da cadeia produtiva do cacau, ou seja, cascas de cacau (**Certificado SisGen Nº A4EC257**). São propostos dois exemplos de produção do ácido elágico, ambos são realizados via fermentação submersa: o primeiro utiliza o extrato aquoso da casca de cacau como substrato, com adição de sais, para o microrganismo *Aspergillus niger* LPB B6 – CCT 7717 (Certificado SisGen Nº **A4D4320**), o segundo relata a utilização do suco de romã adicionado ao extrato aquoso da casca de cacau, de modo a enriquecer o meio fermentativo em proporções diferentes de fonte de elagitanino, o precursor do ácido elágico. A presente invenção também descreve uma técnica de extração em fase sólida, para a clarificação das amostras e remoção de possíveis interferentes durante as análises de quantificação em cromatografia.