



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1107211-3

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: PI 1107211-3

(22) Data do Depósito: 26/12/2011

(43) Data da Publicação do Pedido: 10/11/2015

(51) Classificação Internacional: A01N 65/03; A01P 21/00

(54) Título: USO DO EXTRATO E SUSPENSÕES DE MICROALGA SCENEDESMUS SP

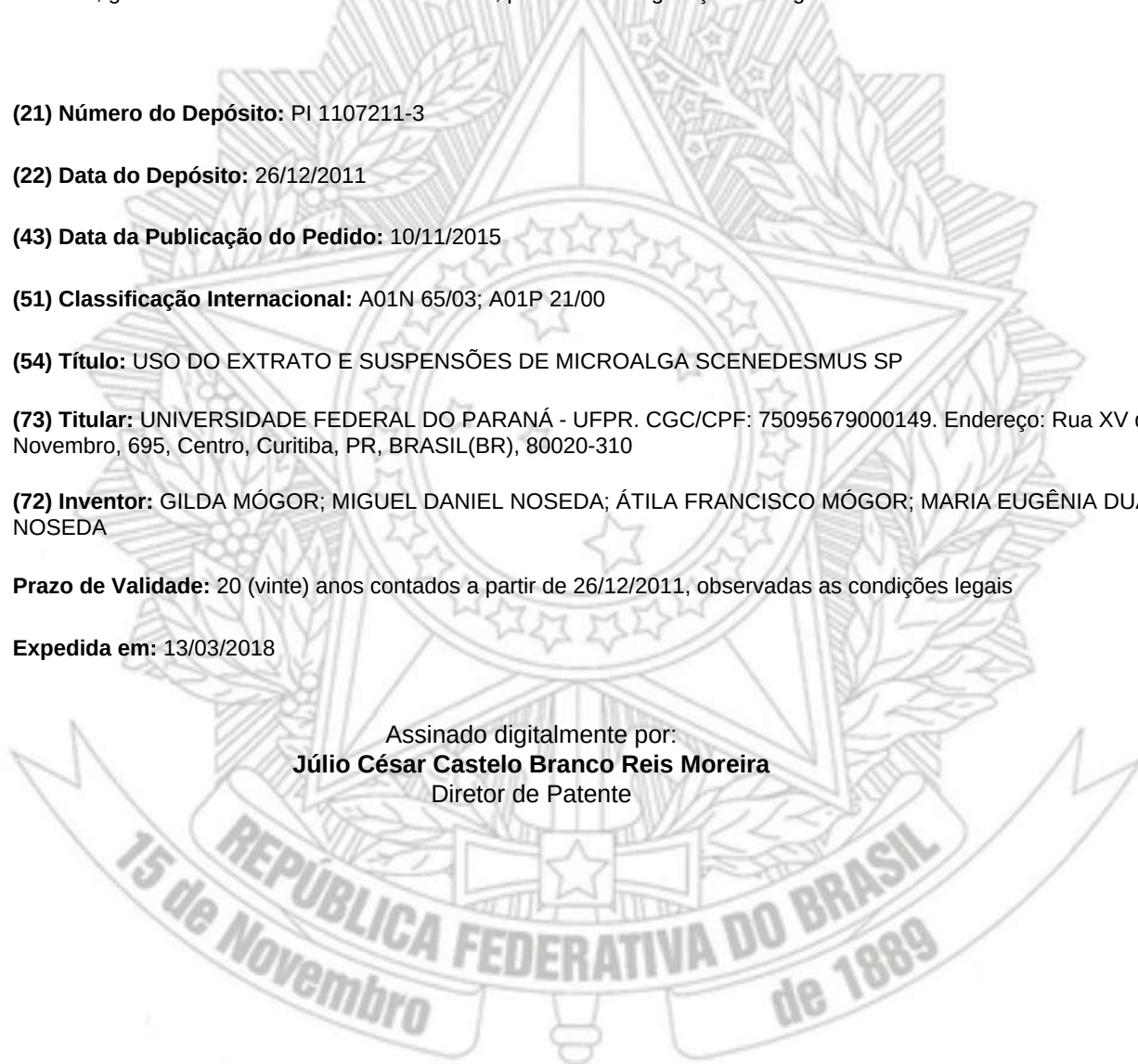
(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 695, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310

(72) Inventor: GILDA MÓGOR; MIGUEL DANIEL NOSEDA; ÁTILA FRANCISCO MÓGOR; MARIA EUGÊNIA DUARTE NOSEDA

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 26/12/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 13/03/2018

Assinado digitalmente por:
Júlio César Castelo Branco Reis Moreira
Diretor de Patente



USO DO EXTRATO E SUSPENSÕES DE MICROALGA *SCENEDESMUS* SP.

Campo da Invenção

[1] A presente invenção propõe a utilização de extratos e suspensões da microalga de água doce *Scenedesmus* sp. em sementes.

[2] Utilizando técnicas de bioensaios com sementes, verificou-se o potencial bioestimulante vegetal quando da aplicação de extratos e suspensões de microalgas, devido a promoção do aumento de volume e área de hipocótilos de plântulas.

Histórico da Invenção

[3] Um dos maiores desafios da humanidade está em conciliar o desenvolvimento tecnológico com a necessidade da conservação ambiental. Nesse contexto, a agricultura, em função da alta demanda de insumos sintéticos, está, muitas vezes, no centro desse dilema. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias alternativas, com foco na sustentabilidade dos sistemas agrícolas e coerentes com as questões ambientais, torna-se relevante para a pesquisa científica.

[4] Devido ao elevado grau de conhecimento científico e tecnológico alcançado em diversos cultivos, a obtenção de maiores índices de produtividade tem se tornado cada vez mais difícil. Aumentar a produtividade torna-se estratégico para o setor agrícola e meio ambiente, pois reduz a pressão de expansão das fronteiras de produção sobre áreas de vegetação natural.

[5] Desta forma, a introdução e adoção de novas tecnologias mostram-se como uma ferramenta de grande importância. Técnicas alternativas como o uso de produtos bioestimulantes vegetais tem apresentado resultados

favoráveis no aumento da produtividade e melhoria da qualidade em diversos cultivos, tais como citros, feijão, milho, soja e algodão (Castro, P.R.C.; Vieira, E.L. *Ação de bioestimulantes na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja*. Revista Brasileira de Sementes, v.23, n.2, p.222-28, 2001).

[6] Os bioestimulantes vegetais podem conter mistura de reguladores vegetais e outras substâncias naturais ou sintéticas associadas, que em função da sua composição, concentração e proporção, atuam no crescimento e desenvolvimento vegetal, favorecendo o incremento da produtividade (Castro, P. R. C. *Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical*. Piracicaba: Potafós. 2006. 46p.).

[7] A mistura de dois ou mais reguladores vegetais ou de reguladores vegetais com outras substâncias naturais ou sintéticas (aminoácidos, nutrientes, vitaminas), é designada de bioestimulante. Os reguladores vegetais possuem ação similar a dos hormônios vegetais, atuando sobre diferentes estruturas celulares. Assim, provocam mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo vegetal. Sua atuação ocorre em diversos processos, incluindo a germinação, desenvolvimento radicular, floração, frutificação e senescência (Castro, P.R.C.; Vieira, E.L. *Ação de bioestimulantes na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja*. Revista Brasileira de Sementes, v.23, n.2, p.222-28, 2001).

[8] Em função da composição, concentração e proporção de suas substâncias, os bioestimulantes atuam no crescimento e desenvolvimento vegetal, favorecendo o incremento da

produtividade (Castro, P. R. C. *Agroquímicos de controle hormonal na agricultura tropical*. Piracicaba: Potafós. 2006. 46p.).

[9] Esses compostos são descritos como produtos não nutricionais, que permitem a redução no uso de fertilizantes e aumento na produção e na resistência ao estresse causado por condições adversas de temperatura e déficit hídrico (Russo, R.O.; Berlyn, G.P. *The use of organic biostimulants to help low input sustainable agriculture*. Agronomy for Sustainable Development, Versailles, v.1, n.2, p.19-42, 1990). Compostos que apresentam ação bioestimulante tem sido objeto de estudo de diversos autores (Zhang, X.; Ervin, E H.; Schmidt, R. E. *Physiological effect of liquid applications of a seaweed extract and humic acid on creeping bentgrass*. Journal of American Society for Horticultural Science, v.128, p.492-496, 1999; Zhang, X.; Schmidt, R. E.; Ervin, E. H.; Doak, S. *Creeping bentgrass physiological responses to natural plant growth regulators and iron under two regimes*. HortScience, v.37, p.898-902, 2002; Payan, J. P. M.; Stall, W. *Effects of aminolevuluric acid and acetyl thioproline on weed free and weed infested St. Augustine Turfgrass*. Proceedings Florida State Horticultural Society, v.117, p.282-85, 2004).

[10] Diversas substâncias naturais, tais como extratos vegetais, aminoácidos, vitaminas e substâncias húmicas, apresentam efeito promotor do crescimento das plantas (Zhang X.; Ervin, E.H. *Cytokinin containig seaweed and Humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinin and drought resistance*. Crop. Sci. v. 44 p.1-10, 2004). Entre as substâncias naturais destaca-se, na literatura

científica, o uso de extratos de algas (Masny, A.; Basak, A.; Zurawicz, E. *Effects of foliar application of KELPAK SL and GOEMAR BM 86 preparations on yield and fruit quality in two strawberry cultivars*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, v.12, p.23-27, 2004), como o da macroalga marrom *Ascophyllum nodosum* (Verkleij, N.F.; *Seaweed extracts in agriculture and horticulture: A review*. Biological Agriculture and Horticulture, v. 8, p. 309-24, 1992).

[11] Neste sentido, Sanderson, K.J; Jameson, P.E.; Zabkiewicz, J.A. *Auxin in a seaweed extract: identification and quantification of Indol-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Plant Physiology, v.129, p.363-67 (1987); Reiber, J.M.; Neuman, D.S. *Hybrid weakness in Phaseolus vulgaris disruption of development and hormonal allocation*. Plant Growth Regulators, v.24, p.101-6 (1999); Zhang, X.; Schmidt, R.E. *Hormone containing products impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought*. Crop. Sci. v.40, p.1344-9 (2000), descreveram o extrato da alga *A. nodosum* como sendo uma fonte natural de citocininas, classe de hormônios vegetais que promovem a divisão celular.

[12] As citocininas participam do processo de resposta ao estresse oxidativo, pois apresentam propriedades que retardam a senescência relacionadas com seu efeito antioxidante (Musgrave, M.E. *Cytokinins and oxidative processes*. p 167-178. In: MOK, D.W.S and MOK, M.C. (ed) *Cytokinins, chemistry, activity and functions*. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. 1994).

[13] A citocinina de maior ocorrência natural é a zeatina e seus derivados: zeatina ribosídio, zeatina

ribotídio, dihidrozeatina e isopentenil adenina, sendo que os níveis endógenos de citocininas livres nos tecidos vegetais estão entre 1 e 100 ug/g da massa da matéria seca das plantas (Srivastava, L.M. Cytokinins, p. 191-204. In: SRIVASTAVA, L.M. (ed) *Plant growth and development: Hormones and environment*. Academic Press, San Diego CA., 2002). Quanto às fontes naturais de citocininas, estas foram identificadas no extrato da alga *A. nodosum* e quantificadas por diversos autores (Tay, S.A.B.; Macleod, J.K.; Palni, L.M.S.; Lethan, D.S. *Detection of cytokinins in a seaweed extract*. *Phytochemistry*, v. 24, p. 2611-6, 1985; Sanderson, K.J.; Jameson, P.E.; Zabkiewicz, J.A. *Auxin in a seaweed extract: identification and quantification of Indol-3-acetic acid by gas chromatography-mass spectrometry*. *J. Plant Physiology*, v.129, p.363-67, 1987; Zhang, X.; Schmidt, R.E. *Hormone containing products impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought*. *Crop. Sci.*, v.40, p.1344-9, 2000; Sanderson, K.J.; Jameson, P.E. *The cytokinins in a liquid seaweed extract: Could they be active ingredients?* *Acta Hort.* v.179, p.113-16, 1986), os quais identificaram o complexo de citocininas presentes no extrato dessa alga, sendo composto por zeatina, dihidrozeatina, isopenteniladenina, isopenteniladenosina, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS, *gas chromatography-mass spectrometry*). Zhang, X.; Ervin, E.H. *Cytokinin containig seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinin and drought resistance*. *Crop. Sci.* v. 44, p1-10 (2004) identificaram através do teste ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) a concentração de zeatina ribosídeo

(ZR) e de isopentil adenina (iPA) no extrato *A. nodosum*, de 66 ug.g-1 e 4 ug.g-1 respectivamente.

[14] Mógor, A.F.; Ono, E.O.; Rodriguez, J.D.; Mógor, G. *Aplicação foliar de extrato de alga, ácido L-glutâmico e cálcio em feijoeiro*. Scientia Agraria, Curitiba, v.9, n.4, p.431-437 (2008), utilizando soluções contendo extrato da alga *A. nodosum* associado à aminoácido e cálcio, aplicado ao feijoeiro, verificaram maior massa fresca dos caules, raízes e aumento da produção total de grãos em alguns tratamentos, o que pode indicar a alteração na partição dos fotoassimilados, identificando o efeito bioestimulante.

[15] Brown, M. A. *The use of marine derived products and soybean meal as fertilizers in organic vegetable production*. (Dissertação de Mestrado) North Carolina Estate University. 94p. (2004), verificou o efeito de *A. nodosum* no desenvolvimento dos cultivos de pimentão (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e alface (*Lactuca sativa* L.), confirmando o aumento no acúmulo de massa seca e precocidade das plantas.

[16] Masny, A.; Basak, A.; Zurawicz, E. *Effects of foliar application of KELPAK SL and GOEMAR BM 86 preparations on yield and fruit quality in two strawberry cultivars*. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, v.12, p.23-27 (2004), avaliando o efeito de um produto comercial a base de extrato de alga, também verificaram o aumento na produção de massa seca em plantas de morango, com aumento na produtividade, porém, com redução na conservação pós-colheita dos frutos, evidenciando a necessidade da experimentação científica na identificação da melhor forma de uso do extrato da alga nos diferentes cultivos.

[17] Além do uso agrícola, algumas espécies de macroalgas podem ser utilizadas na indústria de alimentos, para uso medicinal e produção de ficocolóides (Araújo, T. S.; Araújo, L. H. G. D.; Oliveira, D. C.; Carvalho, R. C. X.; Jimenez, G. C.; Barza, E. C. N.; Anjos, F. B. R., 2005. *Morfometry of the thorns of the sea urchins found in beaches of the south coast of Pernambuco-Brazil*. Encontro Intercontinental Sobre a Natureza - 02. Fortaleza. 1-7).

[18] Cerca de quatro milhões de toneladas de algas são colhidas anualmente em todo o mundo, o que representa um importante potencial econômico para a agricultura, indústria alimentícia e farmacêutica (Blank, H.; Wallin, G.; Wangberg, S. Ecotoxicol. Environ. In: VIDOTTI, E. C., ROLLEMBERG, M. C. E. *Algas: da economia nos ambientes aquáticos a bioremediação e à química analítica*. Química Nova, v.27, n.1, p.139-145, 2004).

[19] O extrato da macroalga *A. nodosum*, encontrada em abundância no Atlântico Norte e cultivada comercialmente no litoral da Nova Escócia, é utilizada na agricultura de diversos países, como bioestimulantes de plantas, fertilizantes e condicionadores de solo, sendo que atualmente muitos destes produtos são importados e utilizados na agricultura brasileira.

[20] As macroalgas marinhas são encontradas em uma grande diversidade de espécies no extenso litoral brasileiro. Apesar do grande potencial, este recurso natural ainda é pouco utilizado na agricultura.

[21] No Brasil, o uso do extrato de algas na agricultura é recente, regulamentado pelo Decreto Presidencial no 4.954, de 14 de janeiro de 2004, e definido no Anexo V, da Instrução

Normativa 25, de 23 de julho de 2009 (MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto no 4.954, de 14 de janeiro de 2004, Anexo V da Instrução Normativa 25, de 23 de julho de 2009. Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao>> Acesso em: 19 setembro de 2009), enquadrado como agente quelante/complexante em formulações de fertilizantes orgânicos e organominerais para aplicação foliar e fertirrigação.

[22] No sistema orgânico de produção, o extrato de algas é classificado como complemento da adubação (Instituto biodinâmico. Diretrizes. Botucatu: IBD, 2006. 54p.), pois é uma fonte natural de matéria orgânica. Entretanto, Payan, J. P. M.; Stall, W. *Effects of aminolevulinic acid and acetyl thioproline on weed free and weed infested St. Augustine Turfgrass*. Proceedings Florida State Horticultural Society, v.117, p.282-85 (2004) verificaram que o extrato de algas é também fonte natural de citocininas, hormônios vegetais que participam ativamente dos processos de divisão e diferenciação celular, retardam a senescência foliar e podem promover o desenvolvimento das gemas laterais (Taiz, L.; Zeiger, E. (ed.) *Plant Physiology*. 1998, 792 p.). Portanto, os extratos de algas podem apresentar efeito bioestimulante.

[23] Estudos com algas marinhas estão gerando conhecimento científico útil em diversas áreas de pesquisa no Brasil, tais como, na farmacologia, identificando compostos com atividade antiviral e anticancerígena (Talarico, L.B.; Pujol, C.A.; Faria, P.C.S.; Zibetti, R.G.M.; Nosedá, M.D.; Damonte, E.B.; Duarte, M.E.R. *Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the*

red seaweeds *Gymnogongrus griffithsia* and *Cryptonemia crenulata*. International Journal of Biological Macromolecules, v.34, p.63-71, 2004; Talarico, L.B.; Pujol, C.A.; Zibetti, R.G.M.; Faria, P.C.S.; Nosedá, M.D.; Duarte, M.E.R.; Damonte, E.B. *The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell*. Antiviral Research, v.66, p.103-110, 2005; Frugulhetti, I.C.P.P.; Amorim, L.M.F.; Teixeira, V.L.; Pereira, R.C. *Estudos da atividade antiviral e anticâncer de substâncias isoladas de algas marinhas*. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis. 2005; Romanos, M.T.V. *Potencial antiviral de macroalgas marinhas*. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis. p.15, 2005; Faria-Tischer, P.C.S.; Talarico, L.B.; Guimarães, S. M. P. B.; Nosedá, M.D.; Damonte, E.B.; Duarte, M.E.R. *Chemical structure of carrageenans with antiviral activity against herpes simplex virus and dengue virus*. Carbohydrate Polymers, v.65, p.49-57, 2006; Talarico, L.B.; Nosedá, M.D.; Duarte, M.E.R.; Damonte, E.B. *An algal derived hybrid DL-galactan is an efficient preventing agent for in vitro dengue virus infection*. Planta Medica, v.73, p.1464-1468, 2007; Cassolato, J.E.F.; Nosedá, M.D.; Pujol, C.A.; Pellizzari, F.M.; Damonte, E.B.; Duarte, M.E.R. *Chemical structure and antiviral activity of the sulfated heterorhamman isolated from the green seaweed Gayralia oxysperma*. Carbohydrate Research, v.343, p.3085-3095, 2008); na área ambiental, para o monitoramento e previsão de impactos ambientais (Pupo, D. *Monitoramento e previsão de impactos ambientais decorrentes da maricultura*. Oficina de

trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis, p.3, 2005); na área sócio-econômica, implantando a produção de algas para gerar renda adicional em atividades maricultoras (Reis, R.P. *Estudos sobre maricultura, produção de carragena e crescimento de algas de interesse comercial no estado do Rio de Janeiro, Brasil*. Oficina e trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas. Angra dos Reis. p.24, 2005); na agricultura, utilizando extratos de macroalgas para a proteção de plantas contra patógenos (Stadnik, M.J. *Potencial biotecnológico de algas para uso agrícola. Oficina de trabalho potencial biotecnológico das macroalgas marinhas*. Angra dos Reis. p.13, 2005; Rathore, S.S.; Chaudhary, D.R.; Boricha, G.N.; Ghosh, A.; Bhatt, B.P.; Zodape, S.T.; Patolia, J.S. *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, n. 2, p. 351-355, 2009; Paulert, R.; Talamini, V.; Cassolato, J.E.F., Duarte, M.E.R., Nosedá, M.D.; Smania, A.; Stadnik, M.J. *Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed Ulva fasciata on anthracnose severity and growth of common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Journal of Plant Diseases and Protection, in press, 2009).

Microalgas

[24] Recentemente o potencial biotecnológico das microalgas tem despertado muito interesse, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos (Suarez, E.R., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Ewart, H.S., Barrow, C.J., Lumsden, M.D., Grindley, T.B. *Isolation, characterization, and structural*

determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. Carbohydrate Research, v.340, p.1489 - 1498, 2005; Suarez, E.R., Syvitski, R., Kralovec, J.A., Nosedá, M.D., Barrow, C.J., Ewart, H.S., Lumsden, M.D., Grindley, T.B. Immunostimulatory polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A new galactofuranan. Measurement of molecular weight and molecular weight dispersion by DOSY NMR. Biomacromolecules, v.7, p.2368-76, 2006; Suarez, E.R.; Bugden, S.; Kai, F.; Kralovec, J.; Nosedá, M.; Barrow, C.; Grindley, T. First isolation and structural determination of cyclic α -(1 $\rightarrow$ 2)-glucans from an algae, *Chlorella pyrenoidosa*. Carbohydrate Research, v.343, p.2623-33, 2008).

[25] Conforme descrito por Hoek, C. Van Den; Mann, D.G.; Jahns, H.M. *Algae: an introduction to phycology*. London: Cambridge: Academic Press, 623p. (1995), sob a denominação microalgas, estão incluídos organismos com dois tipos de estrutura celular, a procariótica, com representantes nas Divisões Cyanophyta (cianobactérias) e Prochlorophyta; e estrutura celular eucariótica, com representantes nas Divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae, etc.), Cryptophyta e Dinophyta.

[26] Quanto ao cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese, trata-se de uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países, principalmente na indústria de alimentos (Pulz, O.; Gross, W. *Valuable products from biotechnology of microalgae*. Applied Microbiology Biotechnology, v.65, p.635-648, 2004).

[27] Apesar de ser uma atividade consolidada em outros países, a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por empresas (localizadas no litoral de Santa Catarina e de praticamente todos os Estados da Região Nordeste) que produzem a biomassa e a empregam principalmente na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos (Derner, R.B.; Ohse, S.; VilIela, M.; Carvalho, S.M.; Fett, R. *Microalgas, produtos e aplicações*. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, 2006). Ainda, segundo Muller-Feuga, A. *Microalgae for aquaculture*. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p. 352-364 (2004) a aplicação mais comum das microalgas tem sido na aquicultura, sendo um grande número de espécies utilizadas para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico.

[28] De acordo com Derner, R.B.; Ohse, S.; VilIela, M.; Carvalho, S.M.; Fett, R. *Microalgas, produtos e aplicações*. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6 (2006), até a data citada não havia informações da produção em grande escala para a obtenção de biomassa ou para a extração de compostos bioativos visando a outras aplicações. Porém, pesquisas recentes estão desenvolvendo tecnologias de cultivo de microalgas em larga escala para produção comercial de biodiesel.

[29] Além das substâncias conhecidas, a quantidade de compostos de interesse comercial que podem ser obtidos das microalgas parece ser imprevisível. Pesquisas se fazem necessárias para a identificação dos produtos que podem ser

extraídos das microalgas, de sua possível atividade biológica e do desenvolvimento de mercados específicos para estes, como por exemplo na agricultura, onde a biomassa pode ser empregada como biofertilizante (Derner, R.B.; Ohse, S.; Villela, M.; Carvalho, S.M.; Fett, R. *Microalgas, produtos e aplicações*. Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, 2006)

[30] Através de bioensaios com sementes é possível verificar o potencial bioestimulante vegetal (do extrato e suspensões de microalgas), a fim de torná-los comercialmente viáveis, a exemplo do que vem sendo explorado atualmente em relação aos bioestimulantes vegetais à base de macroalgas.

Estado da Arte

[31] Levando em conta o conhecimento científico acumulado quanto aos efeitos dos extratos de macroalgas nas plantas cultivadas e das diversas formas de utilização biotecnológicas das microalgas, o efeito bioestimulante vegetal destas deve ser avaliado como potencial fonte para o desenvolvimento de tecnologias ecologicamente corretas, e que colaborem para o aumento da produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola.

[32] No Brasil são comercializados, na agricultura, produtos com efeito "promotor do crescimento vegetal", porém tais produtos são sintéticos, não naturais, e enquadrados na lei dos agrotóxicos. Entretanto, produtos naturais, como os obtidos a partir de extratos ou suspensões da microalga *Scenedesmus* sp. nunca foram utilizados.

[33] Este trabalho propõe uma técnica de utilização de extratos e suspensões da microalga *Scenedesmus* sp. em sementes. Através de bioensaios realizados com sementes foi identificado o efeito promotor de crescimento vegetal, ou

seja, o efeito bioestimulante desses extratos ou suspensões da microalga.

[34] Ao crescente interesse no potencial biotecnológico das microalgas e suas diversas aplicações, soma-se a importância da microalga *Scenedesmus* sp. como matéria-prima na produção de bioestimulantes vegetais.

Cultivo de microalgas e separação da biomassa

[35] No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população de microalgas é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos (Raven, J.A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M.A.: BOROWITZKA, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356).

[36] Os fatores biológicos estão relacionados às próprias taxas metabólicas da espécie cultivada. Em relação aos fatores físico-químicos, implicam em estudos sobre iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (Yongmanitchai, W.; Ward, O.P. *Growth of and omega-3 fatty acid production by Phaeodactylum tricornutum under different culture conditions*. Applied Environmental Microbiology. v.57, p.419-425, 1991).

[37] As microalgas podem ser cultivadas em diversos sistemas de produção (Borowitzka, M.A. *Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters*. Journal of Biotechnology, v.70, p.313-21, 1999), desde o cultivo em tanques, construídos em concreto, fibra de vidro, policarbonato, sendo as culturas constantemente agitadas, até equipamentos mais sofisticados, como os fotobiorreatores, nos quais as condições de cultivo, como quantidade dos nutrientes, temperatura, iluminação, pH,

entre outros, são controladas.

[38] Para a extração das substâncias de interesse, é necessário primeiramente separar a biomassa do meio de cultura. O processo de separação envolve uma ou mais etapas sólido:líquida, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. A seguir, a biomassa é desidratada. Para tanto, podem ser empregadas diversas técnicas, como a secagem ao sol, o "spray-drying" e a liofilização. Para a extração dos compostos, as células microalgais são rompidas, empregando métodos de homogeneização, ultrassom, choque osmótico, solventes, enzimas, etc. As substâncias de interesse são então recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação, como ultra filtração, cromatografia ou fracionamento (Molina Grima, E.; Fernández, G.A., Medina, R. *Downstream processing of cellmass and products*. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.215-251).

Condições de Cultivo

[39] As cepas de *Scenedesmus* sp. são mantidas em sala climatizada a 18-20 °C com iluminação constante. Seguindo procedimento habitual de esterilização do laboratório, as células são repicadas em meio estéril, sendo transferidas de tubos de ensaio para erlenmeyers de 250 mL de capacidade.

[40] Posteriormente, os cultivos feitos nos erlenmeyers de 250 mL são transferidos para erlenmeyers de 2000 mL de capacidade, onde recebem luz e aeração constante em sistema do tipo biorreatores fechados.

Meio de cultivo utilizado

[41] As células são repicadas em meios de cultura

Guillard F/2 modificado (Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações*. São Carlos, SP: Rima Editora. 606p.), seguindo o sistema de cultivo microalgal tipo "batch" (Becker, A.G. *Utilização de organismos-alimento na larvicultura do caranguejo-uçá, Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Crustacia, Brachyura, Ocypodidae)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008). Os cultivos da maioria dos laboratórios de larvicultura comumente utilizam meio de cultura estéril baseado no protocolo Guillard's F/2 (Duerr, E. O., Molnar, A., Sato, V.. *Cultured microalgae as aquaculture feeds*. Journal of Marine Biothecnology n. 7, p. 65-70. 1998).

Isolamento das microalgas

[42] As microalgas são isoladas do meio de cultivo através da centrifugação a 12.000 g por 20 minutos. O sobrenadante é então separado e a biomassa congelada e liofilizada.

Preparação de extratos através de extração sequencial de solventes em ordem de polaridade

[43] Para a extração dos compostos, as células devem ser rompidas. Para tanto, são empregados métodos de homogeneização, ultrassom, choque osmótico, solventes, enzimas, entre outros. As substâncias de interesse são então recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação, como ultrafiltração, cromatografia ou fracionamento (Molina Grima, E.; Fernández, G.A., Medina, R. *Downstream processing of cellmass and products*. In: RICHMOND, A. (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell

Science, 2004. p.215-251).

[44] A biomassa liofilizada de *Scenedesmus* sp. foi submetida à extrações sequenciais, sendo que os solventes utilizados, em ordem de polaridade crescente foram: hexano, etanol e água.

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

Patentes:

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]; LI XIANCUI [CN]

[46] A presente invenção refere-se a um processo de extração de macroalgas para obtenção do hormônio de crescimento de plantas. O sistema tecnológico inclui seis etapas, lavar algas frescas para remover as impurezas; adição de álcool absoluto antes de polpação e filtragem; extração; evaporação para remover água, álcool e pigmento; centrifugação para separar o sal e obter extrato líquido / bruto e adição de fulminato para a precipitação.

[47] A presente invenção tem como vantagem representar um processo tecnológico simples, com baixo custo de extração e utilização abrangente de recursos de algas.

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, que inclui as seguintes etapas: 1. sob a condição de pressão normal, temperatura de 10 °C e valor de pH 10, hidrolisar as algas; 2. sob a condição de pressão normal, temperatura ambiente e pH entre 1,7-3,2, fazer hidrólise ácida; 3. misturar os filtrados para obter o extrato líquido de macroalgas.

[49] Essa invenção fornece um adubo composto e sua aplicação serve para regular o crescimento de plantas.

Composite fertilizer with special regulation effect and its production process. Número de publicação: CN1453252 (A) Data de publicação: 2003-11-05 Inventores: AO ERMEI [CN]; YANG QINGLIN [CN]

[50] A presente invenção refere-se a processo de produção de fertilizantes e consiste em compostos de fertilizantes (aproximadamente 60% em peso), componente de efeitos especiais (2-10% em peso) e material suplementar (20-30% em peso). O componente de efeitos especiais inclui ginseng e ganoderma, extratos de culturas, extrato de macroalgas e extrato de limão. O material suplementar inclui nutrientes secundários e compostos de oligoelementos.

[51] O adubo composto é produzido misturando-os em proporção, seguido de vedação da embalagem.

[52] Usando o fertilizante composto pode-se reduzir a quantidade utilizada de fertilizantes químicos e fertilizantes orgânicos, aumentar o rendimento e resistência das culturas.

Purpose of sea weed as plant growth regulator. Número de publicação: CN1669441 (A) Data de publicação: 2005-09-21 Inventores: SHEN SONGDONG [CN]

[53] 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, cultivo de árvores frutíferas e plantas micropropagadas. O gênero *Gracilaria* contém uma grande quantidade de células ativadoras, auximona, auxina, oxineurina, heteroauxina e outros componentes ativos naturais.

Plant growth promoter. Número de publicação: JP4352705 (A) Data de publicação: 1992-12-07 Inventores: MOMOTANI YOSHIHIDE; UEDA JUNICHI; MIYAMOTO KENSUKE; SATO TOMOHIRO.

[54] Refere-se a um promotor de crescimento de plantas, contendo um extrato de células de *Euglena*.

[55] Células de *Euglena gracilis*, *Euglena viridis* ou *Euglena intermedia* foram mergulhadas em uma solução de etanol-água, temperatura entre 50-20 °C e lentamente agitadas. A solução mistura resultante foi então destilada sob pressão reduzida e o extrato obtido foi posteriormente utilizado como promotor de crescimento das plantas. O extrato pode ser simplesmente pulverizado no solo e especialmente utilizado como promotor de crescimento para gramíneas, como planta de arroz e também orquídeas, como a *Dendrobium*.

Method for organic hydroponic culture of plant. Número de publicação: JP5123067 (A) Data de publicação: 1993-05-21 Inventores: SEKINE ICHIGORO; SEKINE TOSHIRO.

[56] Refere-se a estirpe bacteriana foto-sintética e uma cepa de microalgas, como *Chlorella ellipsoidea*, as quais são separadamente cultivadas em resíduos orgânicos e os líquidos são posteriormente misturados.

[57] A mistura dos líquidos é submetida à aeração e

fluxo na presença de *Daphnia*, *Rotatoria* e bactérias aeróbias, como *Lactobacillus bifidus*, para formar um coloide polimolecular ativo.

[58] O líquido que contém o coloide polimolecular ativo é usado como um meio para o cultivo de plantas.

Descrição Detalhada da Invenção

[59] O objetivo deste trabalho implica no cultivo, isolamento da biomassa e preparação de suspensões da microalga de água doce *Scenedesmus* sp., bem como a preparação de diferentes extratos, seja através da extração sequencial de solventes em ordem de polaridade crescente, ou extrato obtido a partir da centrifugação da suspensão e posterior utilização destes em bioensaios com sementes.

[60] Os bioensaios buscaram estabelecer quais suspensões e/ou extratos de microalgas apresentaram efeito semelhante ou superior ao da macroalga *A. nodosum* (produto comercial), em promover o aumento de volume e área de hipocótilos de plântulas, bem como compará-los com a citocinina sintética BAP.

[61] Os bioensaios foram realizados com sementes hortícolas, e os resultados mais consistentes foram obtidos utilizando-se sementes de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.).

Preparação de suspensões de microalgas

[62] Obtidas a partir da biomassa liofilizada e ressuspendida em água destilada, em diferentes concentrações.

Preparação de extratos obtidos a partir das suspensões de microalgas

[63] Obtidos a partir da centrifugação das suspensões,

ou seja, após a biomassa ser ressuspensa em água destilada e submetida à centrifugação a 12.000 x g, por 30 min, sendo o resíduo descartado e utilizado o sobrenadante.

Preparação de extratos através da extração sequencial de solventes em ordem de polaridade

[64] A biomassa liofilizada de *Scenedesmus* sp. foi submetida a extrações sequenciais, primeiramente com solventes orgânicos (a 25°C), seguida por extrações aquosas (a 25°C). Os solventes utilizados, em ordem de polaridade crescente foram: hexano, etanol e água.

[65] A biomassa foi ressuspensa em hexano por 3 horas (2x), filtrada à vácuo (2x) e o volume reduzido em capela de exaustão. A biomassa recuperada após filtração (resíduo) foi ressuspensa em etanol e o procedimento foi idêntico ao realizado para o hexano, porém, o volume final foi reduzido em rota evaporador a 40°C, sob pressão reduzida. Na sequência, o resíduo das extrações anteriores foi ressuspensa em água por 3 horas (a 25°C) e após este tempo centrifugado a 12.000 x g por 20 min. O sobrenadante (extrato aquoso) foi congelado e liofilizado.

[66] Após ressolubilização em água destilada, os extratos hexânico, etanólico e aquoso (a 25°C) foram utilizados nos bioensaios com sementes.

Preparação de extratos obtidos a partir da macroalga *A. nodosum*

[67] O produto comercial obtido a partir da macroalga *A. nodosum* (*Acadian Marine Plant Extraxt Powder* - Acadian Seaplants Limited, Nova Scotia, Canada), solúvel em água, pode ser diretamente empregado no preparo do extrato.

Preparação de suspensões da citocinina sintética BAP

[68] A citocinina sintética BAP (6-benzilaminopurina), solúvel em água, pode ser empregada diretamente no preparo das suspensões.

BIOENSAIOS COM SEMENTES

[69] Nos bioensaios, metodologia adaptada de Esashi, Y.; Leopold, A.C. *Cotyledon expansion as a bioassay for cytokinins. Plant Physiol.*, v.44, p.618-620, (1969), foram utilizadas suspensões e extratos da microalga *Scenedesmus* sp.

[70] Os parâmetros utilizados nas avaliações foram o número de sementes germinadas, bem como a área (cm²) e o volume (cm³) dos hipocótilos, utilizando o integralizador Win Rhizo_ (LA 1600, Régent Instruments Inc. Canada).

Bioensaio 1

[71] Sementes de tomate da cultivar Santa Clara foram distribuídas em caixas gerbox, forradas com papel filtro. Os tratamentos consistiram na embebição do papel filtro até alcançar 2,5 vezes o seu peso, utilizando água destilada (testemunha) e suspensão obtida a partir da biomassa liofilizada e ressuspendida em água destilada (suspensão SB) da microalga *Scenedesmus* sp., nas concentrações 1 g.L⁻¹ e 5 g.L⁻¹, bem como extrato da macroalga *A. nodosum*, nas concentrações 1 g.L⁻¹ e 5 g.L⁻¹.

[72] Também foi utilizada solução contendo a citocinina sintética 6-benzilaminopurina (BAP), nas concentrações 1 mg.L⁻¹ e 5 mg.L⁻¹.

[73] O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 7 tratamentos com quatro repetições, cada repetição constitui-se de um gerbox com 20 sementes.

[74] Após permanecerem no escuro por 10 dias em câmara vertical B.O.D., com temperatura média de 22°C, procedeu-se a avaliação, identificando o número de sementes germinadas, a área (cm²) e o volume (cm³) dos hipocótilos no equipamento Win Rhizo. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Bioensaio 1

Tratamento	Área (cm²)	Volume (cm³)
Água destilada (testemunha)	9.09 bc	0.43 bc
<i>Scenedesmus</i> sp. (1 g.L-1)	12.64 ab	0.75 a
<i>Scenedesmus</i> sp. (5 g.L-1)	9.84 abc	0.54 abc
<i>A. nodosum</i> (1 g.L-1)	9.99 abc	0.56 ab
<i>A. nodosum</i> (5 g.L-1)	13.51 a	0.77 a
BAP (1 mg.L-1)	4.57 d	0.27 c
BAP (5 mg.L-1)	6.00 cd	0.39 bc
cv%	19.92	22.06

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

[75] Não se verificou diferença significativa quanto à germinação das sementes, que ocorreu em torno de 95%. Para área dos hipocótilos, apenas o extrato de *A. nodosum* (5 g.L-1) foi superior à testemunha, enquanto *Scenedesmus* sp. (1 g.L-1) e *A. nodosum* (5 g.L-1) promoveram o maior volume dos hipocótilos. A citocinina sintética limitou o crescimento dos hipocótilos.

Bioensaio 2

[76] Sementes de tomate da cultivar Santa Clara foram

distribuídas em caixas gerbox, forradas com papel filtro. Os tratamentos consistiram na embebição do papel filtro até alcançar 2,5 vezes o seu peso, utilizando água destilada (testemunha) e suspensões obtidas a partir da biomassa liofilizada e ressuspendida em água destilada (suspensão SB), da microalga *Scenedesmus* sp. nas concentrações 0,5; 1; 3 e 5 g.L⁻¹, bem como o extrato da macroalga *A. nodosum*, nas concentrações 1 g.L⁻¹ e 5 g.L⁻¹.

[77] Foi também utilizado extrato obtido a partir de extrações sequenciais com solventes em ordem de polaridade crescente (método descrito anteriormente), da microalga *Scenedesmus* SP. As extrações resultaram nos extratos hexânico (EH), etanólico (EE) e aquoso (EA), utilizados nas concentrações 1 g.L⁻¹ e 5 g.L⁻¹.

[78] O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 13 tratamentos com quatro repetições, cada repetição constitui-se de um gerbox com 20 sementes. Após permanecerem no escuro por 10 dias, em câmara vertical B.O.D., com temperatura média de 22°C, procedeu-se a avaliação, identificando o número de sementes germinadas e a área (cm²) e o volume (cm³) dos hipocótilos no equipamento Win Rhizo.

Tabela 2 - Bioensaio 2

Tratamentos	Área (cm ²)	Volume (cm ³)
Água destilada (testemunha)	4,89 de	0,27 de
<i>Scenedesmus</i> sp. (0.5 g.L ⁻¹)	8.14 bc	0.41 bc
<i>Scenedesmus</i> sp. (3g.L ⁻¹)	7.91 bc	0.41 bc

<i>Scenedesmus</i> (1 g.L-1)	11.21 a	0.62 a
<i>Scenedesmus</i> (5 g.L-1)	2,93 e	0,17 e
<i>A. nodosum</i> (1 g.L-1)	10,33 ab	0,52 ab
<i>A. nodosum</i> (5 g.L-1)	8,57 abc	0,45 bc
<i>EH</i> (1 g.L-1)	6.80 cd	0.36 cd
<i>EH</i> (5 g.L-1)	4.96 de	0.27 de
<i>EA</i> (1 g.L-1)	6.77 cd	0.35 cd
<i>EA</i> (5 g.L-1)	2.52 cd	0.15 e
<i>cv%</i>	16,41	14,51

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

[79] Não ocorreu germinação nos tratamentos com extrato etanólico (EE), portanto 11 tratamentos, os demais tratamentos não interferiram na germinação, que ocorreu em torno de 95%. Quanto a área e volume dos hipocótilos, a suspensão de *Scenedesmus* sp. (1 g.L-1) e o extrato de *A. nodosum* (1 g.L-1) apresentaram os maiores valores.

Bioensaio 3

[80] Sementes de tomate da cultivar Santa Clara foram distribuídas em caixas gerbox, forradas com papel de filtro. Os tratamentos consistiram na embebição do papel filtro até alcançar 2,5 vezes o seu peso, utilizando água destilada (testemunha); suspensão e extrato da microalga *Scenedesmus* sp., ou seja, suspensão SB, obtida a partir da biomassa liofilizada e ressuspensa em água destilada; extrato ES, obtido a partir da biomassa liofilizada e ressuspensa em água destilada seguido de centrifugação, sendo descartado o resíduo e utilizado o sobrenadante como extrato; bem como o extrato da macroalga *A. nodosum*, nas concentrações 0,1 g.L-

1; 0,2 g.L⁻¹; 0,4 g.L⁻¹; 0,8 g.L⁻¹; 1,6 g.L⁻¹ e 3,2 g.L⁻¹. Também foi utilizada solução contendo a citocinina sintética 6-benzilaminopurina (BAP), nas mesmas concentrações.

[81] O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, totalizando 25 tratamentos com três repetições, cada repetição constitui-se de um gerbox com 20 sementes.

[82] Após permanecerem no escuro por 10 dias, em câmara vertical B.O.D., com temperatura média de 22°C, procedeu-se a avaliação, identificando o número de sementes germinadas e a área (cm²) e o volume (cm³) dos hipocótilos no equipamento Win Rhizo. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Bioensaio 3

Tratamentos	Área (cm²)	Volume (cm³)
Água destilada (testemunha)	7.73 cdefg	0.40 defgh
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,1 g.L ⁻¹) SB	8.26 cdef	0.44 bcdefg
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,2 g.L ⁻¹) SB	9.31 abcde	0.50 abcd
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,4 g.L ⁻¹) SB	8.89 bcdef	0.47 abcde
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,8 g.L ⁻¹) SB	8.60 bcdef	0.45 abcdef
<i>Scenedesmus</i> sp. (1,6 g.L ⁻¹) SB	10.15 abcd	0.55 abc
<i>Scenedesmus</i> sp. (3,2 g.L ⁻¹) SB	9.37 abcde	0.50 abcd
<i>A. nodosum</i> (0,1 g.L ⁻¹)	7.62 dcfg	0.38 defgh
<i>A. nodosum</i> (0,2 g.L ⁻¹)	8.43 bcdef	0.45 bcdef

<i>A. nodosum</i> (0,4 g.L-1)	9.68 abcde	0.50 abcd
<i>A. nodosum</i> (0,8 g.L-1)	8.56 bcdef	0.45 bcdef
<i>A. nodosum</i> (1,6 g.L-1)	11.60 a	0.58 ab
<i>A. nodosum</i> (3,2 g.L-1)	10.99 ab	0.60 a
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,1 g.L-1) ES	9.04 abcdef	0.47 abcde
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,2 g.L-1) ES	9.26 abcde	0.49 abcde
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,4 g.L-1) ES	9.40 abcde	0.49 abcde
<i>Scenedesmus</i> sp. (0,8 g.L-1) ES	9.40 abcde	0.50 abcde
<i>Scenedesmus</i> sp. (1,6 g.L-1) ES	10.27 abc	0.56 abc
<i>Scenedesmus</i> sp. (3,2 g.L-1) ES	8.21 cdef	0.44 bcdefg
BAP (0,1 g.L-1)	8.12 cdef	0.42 cdefg
BAP (0,2 g.L-1)	7.13 efg	0.37 defgh
BAP (0,4 g.L-1)	6.48 fg	0.35 efgh
BAP (0,8 g.L-1)	5.49 g	0.27 h
BAP (1,6 g.L-1)	5.51 g	0.30 gh
BAP (3,2 g.L-1)	5.35 g	0.31 fgh
cv%	22.16	23.11

As médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

[83] Não se verificou diferença significativa quanto à germinação das sementes, que ocorreu em torno de 95%.

[84] Quanto à área dos hipocótilos, os extratos *A. nodosum* (1,6 g.L-1 e 3,2g.L-1) apresentaram os maiores

valores, enquanto, para o volume, *A. nodosum* (1,6 g.L-1 e 3,2 g.L-1) e as suspensões (1,6 g.L-1) e extrato (1,6 g.L-1) de *Scenedesmus* sp. apresentaram os maiores valores

REIVINDICAÇÕES

1. Uso do extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp. **caracterizado** pelo fato de ser no preparo de produtos para a agricultura para estimular o crescimento vegetal.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os referidos extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp. serem aplicados nas sementes das espécies vegetais.

3. Uso, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de os referidos extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp. serem alternativamente aplicados via irrigação localizada.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, **caracterizado** pelo fato de os referidos extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus* sp. serem alternativamente aplicados via pulverização da parte aérea.