



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

(21) BR 102020001563-0 A2



(22) Data do Depósito: 24/01/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 03/08/2021

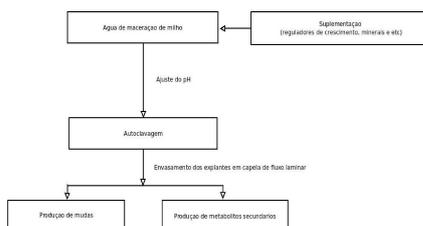
(54) Título: MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

(51) Int. Cl.: A01G 24/22; C12N 5/04; A01H 4/00.

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

(72) Inventor(es): CARLOS RICARDO SOCCOL; ANDRÉ LUIZ GOLLO; ANDRÉ LUÍS LOPES DA SILVA; SUSAN GRACE KARP.

(57) **Resumo:** MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS. A presente invenção apresenta a composição de um meio para o cultivo de tecidos vegetais. A água de maceração de milho é usada para compor a base do meio de cultura, o qual é suplementado ainda com sacarose, fosfato de potássio e com os reguladores de crescimento vegetal 6-benzilaminopurina e ácido-naftaleno acético. Opcionalmente esse meio pode ser suplementado ainda com os sais cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco e molibdato de sódio, além do ácido bórico. O pH pode ser ajustado de 5,5 a 6,0 e o meio pode ser usado na forma líquida, solidificada com ágar ou também com goma gelana. A grande vantagem desse meio de cultura é a sua eficiência em estimular a produção de metabólitos secundários aliada ao seu baixo custo. Pode ser usado para micropropagação, embriogênese somática e produção de metabólitos secundários, enfim para qualquer aplicação envolvendo a cultura de tecidos vegetais.



MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS

Campo da Invenção

[001]. A invenção aqui descrita estabelece um meio de cultura para o cultivo e produção de mudas clonais *in vitro* e bioativos de plantas. Em específico, esta invenção propõe o uso de água de maceração de milho para disponibilizar macro e micronutrientes, além de moléculas orgânicas aos tecidos vegetais cultivados. Através desse novo meio de cultura é possível alcançar uma redução em até 93 % da suplementação mineral necessária em meios convencionais. Além disso, é facilitada a disponibilização da matéria prima ao mercado produtivo, reduzindo a zero a necessidade de nutrições nitrogenadas inorgânicas, as quais possuem rigorosos controles de compra.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[002]. A cultura de tecidos constitui uma forma de disponibilizar explantes competentes (partes vegetais) livres de contaminação, através do uso da propagação *in vitro* (micropropagação), transformação genética e conservação *in vitro* (Machado et al., Journal Biotchnology Biodiversity, v. 2, p. 28-31). É a única técnica que permite a produção de um largo número de plantas clonadas em um curto período, e com uma elevada qualidade fitossanitária.

[003]. Para a realização dessa metodologia é necessária a utilização de meios de cultura como forma de nutrição aos tecidos vegetais. Essas fontes de nutrientes são compostas por substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo carboidratos, vitaminas, macro e micronutrientes (Edwin et al., Springer Nature, 3ª ed., v. 1, p. 65-113, 2008). Os meios podem também ser suplementados com outras substâncias, como reguladores de crescimento e misturas complexas de acordo com o objetivo.

[004]. Atualmente há vários meios de cultura disponíveis para a propagação de tecidos vegetais. Em sua grande maioria, são de composição sintética e contêm reagentes de grau analítico. Além desses, raramente usados, estão alguns meios de cultura elaborados a partir de constituintes orgânicos, tais como água de coco e banana, porém com uso restrito a espécies de orquídeas (Utami e Hariyanto, *Scientifica*, v. 2019, ID 8105138, 2019, <https://doi.org/10.1155/2019/8105138>). Neste documento, foi citada a possibilidade de utilização de suco de maçã, suco de tomate, triptona, peptona, água de coco, homogenato de banana, homogenato de batata, extrato de milho, extrato de levedura e extrato de caseína para promover o crescimento e desenvolvimento de tecidos vegetais, porém nenhuma informação técnica foi fornecida exceto para água de coco e homogenato de banana. Recentemente, meios de cultura à base de resíduos industriais têm sido propostos, como os meios à base de vinhaça.

[005]. Os meios sintéticos à base de reagentes químicos de grau analítico apresentam excelente qualidade, porém custo elevado. Somado a tal fato, um dos maiores problemas decorrentes do uso de um desses meios, como o MS proposto por Murashige e Skoog (1962), o mais popular entre todos, é a utilização do nitrato de potássio e do nitrato de amônio, reagentes controlados pelo exército.

[006]. Os meios de cultura orgânicos contendo banana e água de coco representam um empecilho para serem usados em grande escala. E os meios de cultura à base de vinhaça dependem da existência de um fornecedor próximo, devido à sua baixa viabilidade de transporte.

[007]. A água de maceração do milho, também chamada de milhocina, é um subproduto da indústria de processamento do milho por via úmida, resultante da maceração a quente do grão de milho com água e ácido

sulfúrico para a extração do amido. Sua composição é rica em carboidratos solúveis – sendo glicose e frutose presentes em maiores concentrações, havendo também galactose, arabinose e xilose, entre outros di- e trissacarídeos. Também estão presentes ácidos graxos, como linoleico, sais minerais, como também alguns dos principais aminoácidos necessários para o desenvolvimento de organismos biológicos, como glicina, alanina, arginina entre outros (Corn Products Brasil, 1998). Sua composição geral apresenta em média 11% de açúcares redutores, determinados como glicose, 5,1% de ácido láctico, 0,1% de nitrogênio volátil e 0,1% de ácido láctico (Pereira, B., Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, p 18, 2014). Sendo que sua composição, em base seca, apresenta 40,8% de proteína, 16% de ácido láctico, 12,8% de açúcares redutores e 30,4% de outros compostos (Akhtar, M. et al., Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry, John Wiley and Sons, p 30-339, 1998). Este líquido residual, obtido na concentração de 40-45°Brix, é um subproduto rico em nutrientes e empregado usualmente na fabricação de rações para nutrição animal.

[008]. O surgimento de biofábricas está em constante expansão, principalmente no Brasil, onde o objetivo principal é a produção de mudas de plantas, bem como de compostos bioativos de interesse comercial, tais como os compostos fenólicos largamente utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e muitas outras (Costa et al., Rev. Ceres, v. 63, p 277-281, 2016).

[009]. O desenvolvimento de novos métodos mais baratos para cultura *in vitro* de plantas faz-se necessário, a fim de viabilizar as biofábricas e demais segmentos envolvidos. Algumas estratégias já vêm sendo projetadas e consolidadas, como a utilização de biorreatores para culturas *in vitro*, reduzindo o custo através do uso de meios de cultura líquidos e eliminando a necessidade da utilização de ágar (Soccol et al., 2009, Patente Número PI

0901454-0); a produção de reguladores de crescimento vegetal por vias alternativas, a partir da fermentação de resíduos agroindustriais por microorganismos selecionados (Lopes da Silva et al., Pakistan Journal of Botany, v.45, p. 2057-2064, 2013); e também os processos de esterilização dos meios de cultura por compostos químicos de baixo custo (Brondani et al., Scientia Forestalis, v. 41, p. 257-264, 2013).

[010]. Outro processo de viabilização dos custos de produção é a utilização de resíduos industriais como fonte de nutrientes. São matérias primas mais baratas, que a partir do desenvolvimento de formulações específicas, suprem a exigência nutricional das plantas (Gollo et al., Pakistan Journal of Botany, v. 48, p. 295-303, 2016).

Descrição da Abordagem do Problema Técnico

[011]. O uso da água de maceração do milho como fonte de nutriente para o crescimento de plantas cultivadas *in vitro* é, portanto, um novo recurso à redução de custos de produção de plantas via micropropagação. Esse resíduo é rico em vários nutrientes que são requeridos para o crescimento de plantas, como vitaminas, aminoácidos, açúcares, macro e microelementos (Liggett, R. W. e Koffler, Bacteriology Reviews, v.12, p. 297-311, 1948; H. Maddipati et al., Bioresource Technology, v. 102, p. 6494-6501, 2011). A presente invenção propõe, portanto, um processo para produção e utilização de meio cultura para micropropagação vegetal *in vitro* à base de água de maceração do milho. Esta invenção contribui para a viabilização dos processos de cultivo vegetal por incorporação de matéria prima menos onerosa e de mais fácil acesso.

[012]. A vantagem do meio de cultura descrito na presente invenção é a sua eficiência aliada ao seu baixo custo, características resultantes de sua composição nutricional. O meio caracteriza-se por ser um estimulante à produção de metabólitos secundários. Pode ser usado para

micropropagação, embriogênese somática e produção de metabólitos secundários em biorreatores.

[013]. A água de maceração de milho possui na sua composição grande quantidade de nitrogênio orgânico na forma de aminoácidos, além de conter algumas vitaminas. Essa composição permite eliminar o uso do nitrato de amônio, do nitrato de potássio, além de outras vitaminas, reduzindo consideravelmente o custo de produção, e viabilizando a inserção do protocolo em biofábricas pela não necessidade de aquisição de matérias-primas controladas. Além disso, esse meio de cultura favorece o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas, em especial, compostos fenólicos.

Descrição Detalhada da Invenção

[014]. A presente invenção apresenta um meio de cultura para o cultivo de tecidos vegetais. A água de maceração de milho proveniente da agroindústria a 40-45°Brix, diluída em água para uma concentração final de 2,5 g.L⁻¹ a 10 g.L⁻¹ (gramas de água de maceração do milho bruta por litro de meio), é usada para compor a base do meio de cultura. Esse meio pode ser suplementado com reguladores de crescimento vegetal, sais e fonte de açúcar. Mais especificamente, o meio deve conter sacarose em concentração de 15 a 25 g.L⁻¹, 6-benzilaminopurina em concentração de 1,5 a 2,0 mg.L⁻¹, ácido α -naftaleno acético em concentração de 0,3 a 0,5 mg.L⁻¹ e KH₂PO₄ em concentração de 40 a 50 mg.L⁻¹. O pH deve ser ajustado na faixa de 5,5 a 6,0.

[015]. Opcionalmente, este meio pode conter CaCl₂ em concentração de 200 a 240 mg.L⁻¹, MgSO₄ em concentração de 40 a 60 mg.L⁻¹, MnSO₄ em concentração de 3 a 5 mg.L⁻¹, ZnSO₄ em concentração de 1 a 3 mg.L⁻¹, H₃BO₃ em concentração de 1 a 3 mg.L⁻¹ e Na₂MoO₄ em concentração de 0,05 a 0,15 mg.L⁻¹, isoladamente ou em quaisquer combinações.

[016]. Este meio de cultura pode ser utilizado na forma líquida ou em forma sólida. Neste último caso, o meio deve ser suplementado com agentes gelificantes, tais como ágar ou goma gelana, em concentração de 0,1 a 30 g.L⁻¹.

[017]. O meio de cultura da presente invenção pode ser utilizado para qualquer necessidade da cultura de tecidos vegetais, podendo ser empregado para micropropagação ou embriogênese somática. Pode ser utilizado tanto para a produção de mudas via biotecnologia vegetal, via organogênese ou embriogênese somática, direta ou indiretamente, quanto para a obtenção de metabólitos secundários, seja pelo cultivo de brotações, plantas, células, calos ou raiz de cabeleira. Além de ser mais barato e tão eficiente quanto os demais meios disponíveis, apresenta como vantagem adicional a maior promoção de acúmulo de metabólitos secundários nas estruturas vegetais.

Exemplos

[018]. A Tabela 1 apresenta o teor de nutrientes presentes no meio comercial MS (Murashige and Skoog, 1962) com relação a diferentes concentrações de água de maceração de milho.

Tabela 1 – Composição de íons do meio MS e da água de maceração do milho

Ion (mg.L ⁻¹)	MS (1962)	Água de Maceração (g/L)		
		2.5	5	10
Ca	119.8	0.28	0.57	1.14
NO₃	2440.5	1.45	2.89	5.78
NH₄	371.7	1.02	2.03	4.06
SO₄	166.2	14.51	29.02	58.04
Mg	36.5	0	0	0
Fe	5.4	ND*	ND	ND

Mn	5.5	ND	ND	ND
K	783.5	22,75	27.3	54.6
PO₄	118.7	31.61	63.23	126.46
Na	4.6	1.55	3.11	6.22
Cl	212.7	11.6	23.23	46.46
Zn	1.95	ND	ND	ND
Cu	0.0063	ND	ND	ND
Co	0.0062	ND	ND	ND
MoO₄	0.16	ND	ND	ND
B	1.08	ND	ND	ND
F	-	22.27	46.52	93.04
Br	-	3.13	6.28	12.56

*Não determinado.

[019]. A Tabela 2 apresenta o aminograma da água de maceração do milho pura.

Tabela 2 – Aminograma da água de maceração do milho

Aminograma - Água de Maceração Pura	
Alanina (mg/100g)	1.075,0
Arginina (mg/100g)	725,0
Ác. Aspártico (mg/100g)	1.129,0
Glicina (mg/100g)	1.100,0
Isoleucina (mg/100g)	582,0
Leucina(mg/100g)	1.855,0
Ác. Glutâmico (mg/100g)	3.317,0
Lisina(mg/100g)	933,0
Cistina (mg/100g)	1.191,0
Metionina (mg/100g)	680,0
Fenilalanina (mg/100g)	648,0
Tirosina (mg/100g)	643,0

Treonina (mg/100g)	692,0
Triptofano (mg/100g)	13,0
Prolina (mg/100g)	2.187,0
Valina (mg/100g)	957,0
Histidina (mg/100g)	664,0
Serina (mg/100g)	968,0
TOTAL Aminoácidos (mg/100g)	19.359,0

[020]. A Tabela 3 apresenta os dados obtidos a partir de cultura *in vitro* de *Nidularium procerum* mantidas em meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962) e em diferentes concentrações de água de maceração de milho após 60 dias. Tamanho de broto principal (MS cm), número total de brotos (SN), porcentagem de brotos (SP%), número de raízes (RN), porcentagem de raízes (RP%), número de folhas (LN), massa fresca (FM mg) e porcentagem de sobrevivência (CP%) foram mensurados.

Tabela 3 – Resultados do cultivo de *Nidularium procerum* em meio MS e água de maceração do milho (AMM).

AMM (g.L ⁻¹)	MS cm	SN	SP %	RN	RP %	LN	FM mg	CP %
MS (controle)	3.3 a ¹	2.0 a	66.6 a	3.5 a	90.0 a	16.4 a	68.7 a	86.8 a
2.5	3.4 a	2.6 a	70.0 a	3.2 a	83.3 a	19.9 a	71.8 a	90.0 a
5.0	3.2 a	2.0 a	76.6 a	3.4 a	93.3 a	16.2 a	77.4 a	94.4 a
10.0	3.2 a	1.9 a	76.0 a	3.2 a	88.0 a	15.9 a	51.6 a	99.0 a
CV (%)	15.8	51.7	17.1	35.5	16.6	27.2	45.0	33.5

¹ Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste estatístico de Duncan ($p < 0,05$).

[021]. A água de maceração de milho na concentração de 5 g.L⁻¹ apresentou maiores índices de porcentagem de brotos, número de raízes, porcentagem de raízes, massa fresca e elevada taxa de sobrevivência final de plantas.

[022]. A fim de obter melhores valores nutricionais, otimizando a sobrevivência e produção de metabólitos secundários, foram delineadas diferentes formulações a partir da suplementação de nutrientes com base na água de maceração de milho (5 g.L⁻¹).

[023]. A Tabela 4 apresenta as diferentes formulações testadas na produção de metabólitos secundários e sobrevivência das plantas na produção de meios de cultura com base em 5 g.L⁻¹ de água de maceração de milho.

Tabela 4 – Diferentes formulações contendo água de maceração do milho a 5 g.L⁻¹

Suplementação Nutricional	F1	F2	F3	F4
KH ₂ PO ₄ (mg/L)	45	45	45	45
CaCl ₂ (mg/L)	-	220	220	220
MgSO ₄ (mg/L)	-	50	50	50
MnSO ₄ (mg/L)	-	-	4	4
ZnSO ₄ (mg/L)	-	-	2	2
H ₃ BO ₃ (mg/L)	-	-	-	2
Na ₂ MoO ₄ (mg/L)	-	-	-	0,1
Ágar (g/L)	5	5	5	5
Sacarose (g/L)	20	20	20	20
6-benzilaminopurina (BAP) (mg/L)	1,82	1,82	1,82	1,82
Ácido α-naftaleno Acético (ANA) (mg/L)	0,38	0,38	0,38	0,38

[024]. Os resultados demonstraram que, em termos de produção de compostos fenólicos totais, todas as formulações (F1 – F4) foram superiores ao controle, e que as formulações F2, F3 e F4 foram estatisticamente iguais e superiores a F1, o que constitui efeito surpreendente. Com relação ao percentual de sobrevivência, as porcentagens foram: Controle MS - 79%, F1 - 86,2%, F2 – 88%, F3 – 81% e F4 – 84 %, porém não houve diferença estatística entre os tratamentos através do teste de Dunnet ($p < 0,05$).

[025]. Os meios de cultura desenvolvidos com base em água de maceração de milho apresentaram maior potencial de produção de metabólitos secundários, bem como efeitos equivalentes de sobrevivência ($p < 0,05$) quando comparados com o meio de cultura comercial padrão utilizado atualmente.

Descrição das figuras

[026]. A Figura 1 apresenta o fluxograma de obtenção e utilização do meio de cultura à base de água de maceração de milho.

[027]. A Figura 2 apresenta a concentração de compostos fenólicos totais produzidos em extratos metanólicos de folhas de *Nidularium procerum* cultivadas por 60 dias nas diferentes formulações com base em água de maceração de milho a 5 g.L⁻¹. Letras diferentes representam diferença estatística segundo teste de Dunnet ($p < 0,05$).

[028]. A Figura 3 apresenta as porcentagens de sobrevivência de *Nidularium procerum* aclimatizadas em casa de vegetação com nebulização intermitente, após 60 dias de cultivo *in vitro*. Foi comparado o meio de cultura Controle (MS) frente às diferentes formulações desenvolvidas com base na água de maceração de milho. As porcentagens de sobrevivência foram: Controle MS - 79%, F1 - 86,2%, F2 – 88%, F3 – 81% e F4 – 84 %. Não houve

diferença estatística entre os tratamentos através do teste de Dunnet ($p < 0,05$).

REIVINDICAÇÕES

1 - MEIOPARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, **caracterizado por** conter água de maceração do milho proveniente da agroindústria, originalmente a 40-45°Brix, diluída em água para uma concentração final de 2,5 g.L⁻¹ a 10 g.L⁻¹ (gramas de água de maceração do milho bruta por litro de meio).

2 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser suplementado com sacarose em concentração de 15 a 25 g.L⁻¹, 6-benzilaminopurina em concentração de 1,5 a 2,0 mg.L⁻¹, ácido α -naftaleno acético em concentração de 0,3 a 0,5 mg.L⁻¹ e KH₂PO₄ em concentração de 40 a 50 mg.L⁻¹.

3 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** ser opcionalmente suplementado com CaCl₂ em concentração de 200 a 240 mg.L⁻¹, MgSO₄ em concentração de 40 a 60 mg.L⁻¹, MnSO₄ em concentração de 3 a 5 mg.L⁻¹, ZnSO₄ em concentração de 1 a 3 mg.L⁻¹, H₃BO₃ em concentração de 1 a 3 mg.L⁻¹ e Na₂MoO₄ em concentração de 0,05 a 0,15 mg.L⁻¹, isoladamente ou em quaisquer combinações.

4 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS, de acordo com as reivindicações de 1 a 3, **caracterizado por** ser opcionalmente suplementado com agentes gelificantes, tais como ágar ou goma gelana, em concentração de 0,1 a 30 g.L⁻¹.

5 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com as reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** apresentar pH na faixa de 5,5 a 6,0.

6 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com as reivindicações de 1 a 5, **caracterizado por** ser utilizado no estado sólido ou líquido, em frascos de laboratório convencionais ou em biorreatores.

7 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com as reivindicações de 1 a 5, **caracterizado por** ser utilizado para a produção de mudas via biotecnologia vegetal, podendo ser via organogênese ou embriogênese somática, direta ou indiretamente.

8 - MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS de acordo com as reivindicações de 1 a 5, **caracterizado por** ser utilizado na produção de metabólitos secundários, seja pelo cultivo de brotações, plantas, células, calos ou raiz de cabeleira.

DESENHOS

Figura 1

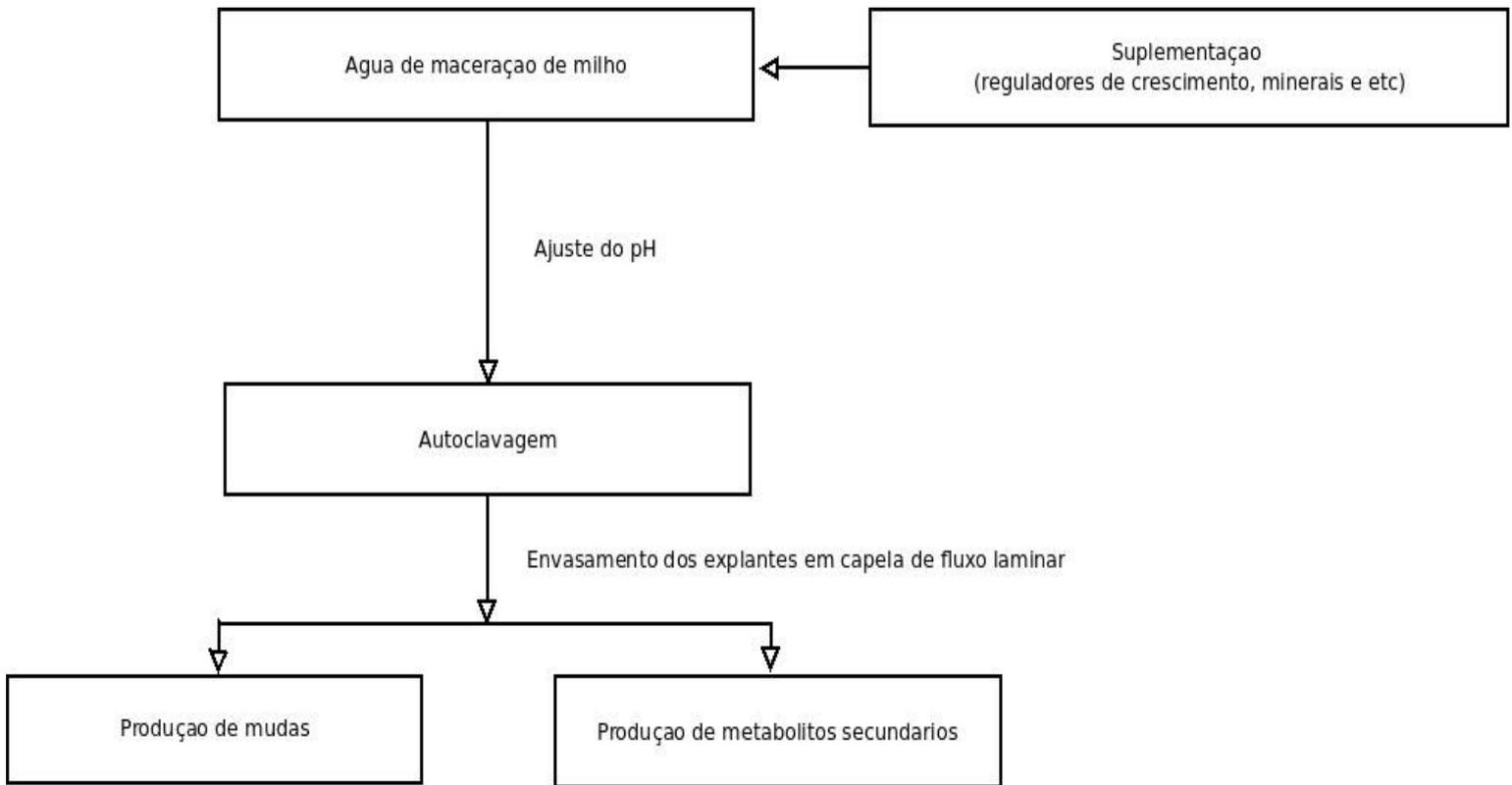


Figura 2

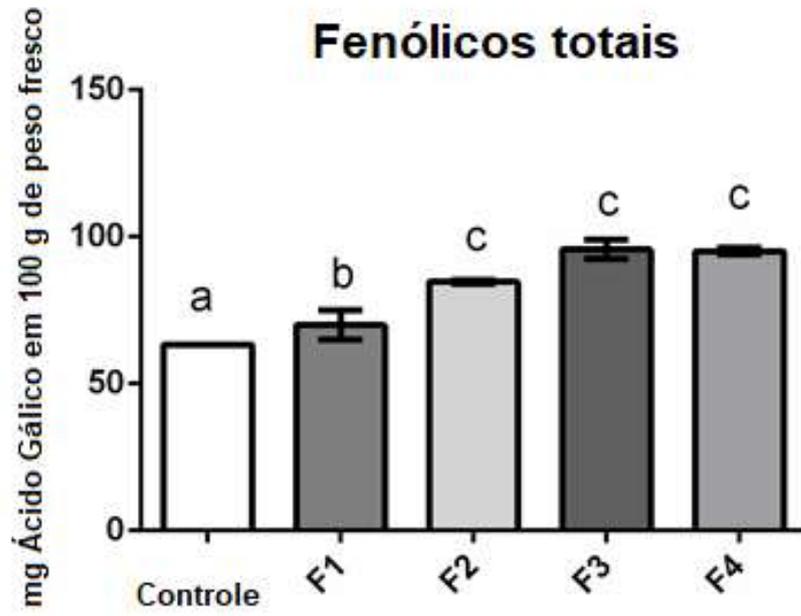
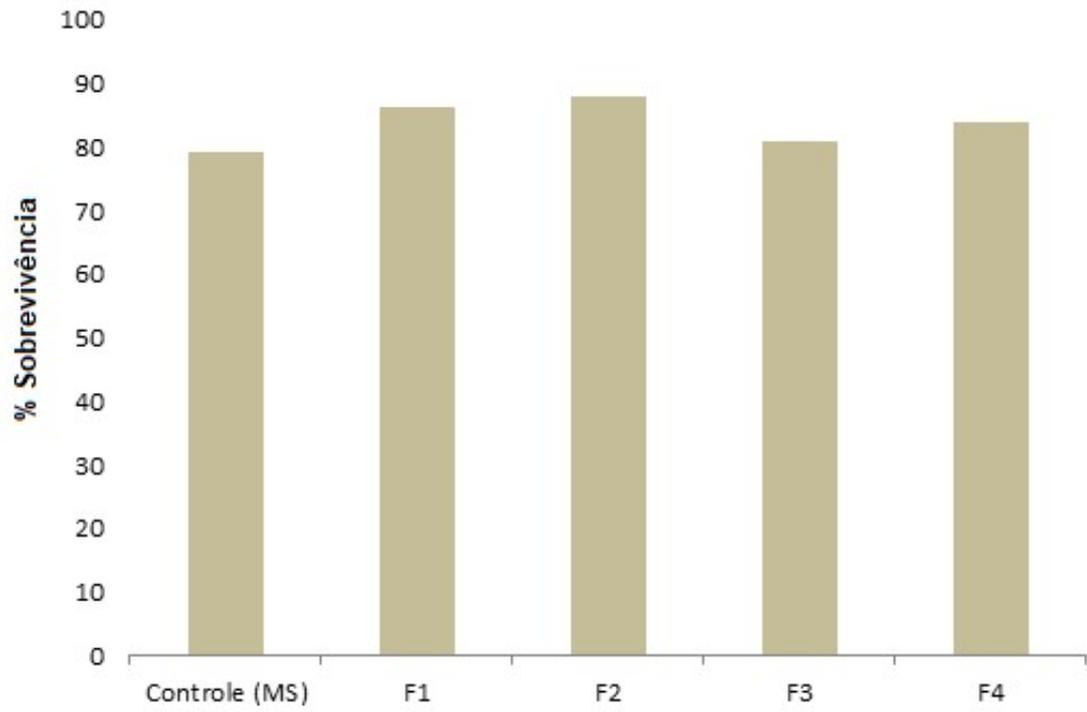


Figura 3



RESUMO**MEIO PARA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS**

A presente invenção apresenta a composição de um meio para o cultivo de tecidos vegetais. A água de maceração de milho é usada para compor a base do meio de cultura, o qual é suplementado ainda com sacarose, fosfato de potássio e com os reguladores de crescimento vegetal 6-benzilaminopurina e ácido α -naftaleno acético. Opcionalmente esse meio pode ser suplementado ainda com os sais cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês, sulfato de zinco e molibdato de sódio, além do ácido bórico. O pH pode ser ajustado de 5,5 a 6,0 e o meio pode ser usado na forma líquida, solidificada com ágar ou também com goma gelana. A grande vantagem desse meio de cultura é a sua eficiência em estimular a produção de metabólitos secundários aliada ao seu baixo custo. Pode ser usado para micropropagação, embriogênese somática e produção de metabólitos secundários, enfim para qualquer aplicação envolvendo a cultura de tecidos vegetais.