



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 007927 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Resumo: A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de ácido indol-3-acético (AIA) através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus flavipes*, obtendo um preparado em estado sólido (PES) e um extrato fonte de biomoléculas proveniente desta interação, utilizados como fonte de AIA para auxiliar o crescimento de plantas ou atuar como herbicida, em substituição ao 2,4-D e outros herbicidas auxínicos.

Figura a publicar: 1

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Sérgio Victor Mastrococco

Numero OAB: 296946SP

Numero API: 1705

CPF/CNPJ: 02990560823

Endereço: Rua Amaral Gama, 333 - Conjunto 164 - Santana

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 02018-001

Telefone: (11) 2639-7200

Fax: (11) 2973-5032

Email: sergio@mastrococco.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: LUCIANA FRANCISCO FLEURI

CPF: 29564664888

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rodovia João Hipólito Martins Km 16,5; Residencial Hípica, nº 77;
Distrito Industrial

Cidade: BOTUCATU

Estado: SP

CEP: 18606-840

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 2

Nome: DÉBORA ZANONI DO PRADO

CPF: 38315605879

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Avenida Professor Raphael Laurindo, 484, apto 2, Jardim Paraiso

Cidade: BOTUCATU

Estado: SP

CEP: 18610-302

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70217

Fax: (11) 562 70103

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU INPI.pdf
Procuração	procuracao FUNDUNESP para o INPI.pdf
Documento de Cessão	17AUIIN051_termo de cessão.pdf
DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO	17AUIIN051_declaração negativa.pdf
Relatório Descritivo	relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	reivindicacao.pdf
Desenho	desenhos.pdf
Resumo	resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético


- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

001-9

RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento Pagável em qualquer Banco					Vencimento Contra-apresentação	
Cedente INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					Agência/Código Cedente 2234-9/333.028-1	
Data do Documento 22/09/2016	Nº. documento 1607580122	Espécie do Recibo RC	Acerto N	Data Process. 22/09/2016	Nosso Número 00.000.2.2.16.0758012.2	
Uso Banco	Carteira 18/027	Espécie RS	Quantidade	Valor	(=) Valor Documento RS 70,00	
Número: NN Complementar: Peticionamento Eletrônico					(-) Desconto/Abatimento	
Natureza: 20 - Modelo de					(-) Outras deduções	
Cod Serviço					(+) Mora/Multa	
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT					(+) Outros Acréscimos	
OAB: 235031SP Procurador: Leopoldo Campos Zanetti					(-) Valor Cobrado RS 70,00	
Sacado UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010						
Sacador/Avalista Corte na linha pontilhada						

Autenticação mecânica - Controle Cedente

001-9

00199.53637 10000.022169 07580.122211 8 00000000007000

Local de Pagamento Pagável em qualquer Banco					Vencimento Contra-apresentação	
Cedente INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial					Agência/Código Cedente 2234-9/333.028-1	
Data do Documento 22/09/2016	Nº. documento 1607580122	Espécie do Recibo RC	Acerto N	Data Process. 22/09/2016	Nosso Número 00.000.2.2.16.0758012.2	
Uso Banco	Carteira 18/027	Espécie RS	Quantidade	Valor	(=) Valor Documento RS 70,00	
Instruções: 1. Valores expressos em reais. 2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'. 3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'. 4. Vencimento contra apresentação.					(-) Desconto/Abatimento	
OAB: 235031SP Procurador: Leopoldo Campos Zanetti					(-) Outras deduções	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança					(+) Mora/Multa	
Sacado UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010					(+) Outros Acréscimos	
Sacador/Avalista Corte na linha pontilhada					(-) Valor Cobrado RS 70,00	
					Autenticação mecânica - Ficha de Compensação	
Corte na linha pontilhada						

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento. - PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

FUNDAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP FUNDUNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002911-5**DETALHE DO COMPROMISSO**

Convênio: 0033-0239-004900019792 **Conta de Débito:** 0239-000130027340
Tipo do Documento: CNPJ **CPF/CNPJ do Fornecedor:**
Nome do Fornecedor: 000009853INPI - INST. NACIONAL
No. compromisso banco: 1023666000200013 **No. compromisso cliente:** 758012/DS1 1011
Tipo de Pagamento: BLQ Outros
Código de Barras: 00199536371000002216907580122211800000000007000
Valor Nominal: 70,00
Desc./Abat.: 0,00 **Juros:** 0,00
Data de Vencimento: 10/10/2016
Data de Pagamento: 10/10/2016
Situação: Efetivado **No. Protocolo:** PGTFORNB10102016900115624
No. Lista de Débito:
Autenticação:

Valor a Pagar: 70,00

Tipo de Serviço: Pagamento Fornecedor
Complemento do Tipo de Serviço:

Emitir Aviso: Não emitir

Central de Atendimento Santander Empresarial 4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)

SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322

[retornar](#)[imprimir](#)

PROCURAÇÃO

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, brasileiro, professor universitário, portador do RG nº 10.289.419-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 083.891.058-02, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; **2) SÉRGIO VICTOR MASTROROCCO**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 296.946, e **3) VITOR GARCIA KOPP**, brasileiro, engenheiro, portador do RG nº 36.688.444-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 375.214.338-07, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 30 de junho de 2018.

São Paulo, 27 de junho de 2017.


SANDRO ROBERTO VALENTINI

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **LUCIANA FRANCISCO FLEURI**, brasileira, em união estável, professora, inscrita no CPF/MF sob o nº 295.646.648-88, portadora do documento de identidade RG nº 32.643.889-0, SSP/SP, residente em Botucatu (SP), na Rodovia João Hipólito Martins Km 16,5, Residencial Hípica, nº 77, CEP 18606-840. 2. **DÉBORA ZANONI DO PRADO**, brasileira, solteira, engenheira florestal, inscrita no CPF/MF sob o nº 383.156.058-79, portadora do documento de identidade RG nº 46.033.336-7, SSP/SP, residente em Botucatu (SP), na Rua Avenida Professor Raphael Laurindo, 484, apto 2, Jardim Paraíso, CEP 18610-302.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**Produção de ácido indol-3-acético por fermentação em estado sólido**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

Botucatu, 06 de novembro de 2017.

Cedentes:



LUCIANA FRANCISCO FLEURI



DÉBORA ZANONI DO PRADO

Cessionária:



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR

Testemunhas:



1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55



2. Sabrina Paduan
CPF/MF: 389.723.218-93

17AUN051

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

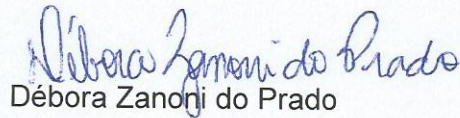
Título:	Produção de ácido indol-3-acético por fermentação em estado sólido
Titulares:	Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"
Inventores:	Luciana Francisco Fleuri e Débora Zanoni do Prado

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que, nos termos da Resolução nº 34, de 12 de fevereiro de 2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGEN, e da Resolução nº 207, de 24 de abril de 2009, do Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do patrimônio genético nacional, realizado a partir de 30 de junho de 2000.

São Paulo, 02 de fevereiro de 2018.



Luciana Francisco Fleuri



Débora Zanoni do Prado

PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

[001] CAMPO DA INVENÇÃO

[002] A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de ácido indol-3-acético (AIA) através de fermentação em estado sólido e o produto obtido. Mais especificamente compreende a obtenção de AIA mediante fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus flavipes*, obtendo um preparado em estado sólido (PES) e um extrato fonte de biomoléculas proveniente desta interação, utilizados como fonte de AIA para auxiliar o crescimento de plantas ou atuar como herbicida, em substituição ao 2,4-D e outros herbicidas auxínicos.

[003] ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] O ácido indol-3-acético é uma auxina associada a uma variedade de processos fisiológicos em plantas, tais como dominância apical, tropismos, alongamento da parte aérea, indução da divisão celular cambial e iniciação radicular.

[005] Auxinas sintéticas têm sido amplamente utilizadas no agronegócio para incrementar o enraizamento e o desenvolvimento vegetal e, em altas concentrações, são também utilizadas como herbicida (CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHNAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. New Delhi: I. K. International. p. 850-929).

[006] Compostos sintéticos que atuam como fitohormônios estão entre os herbicidas de maior sucesso utilizados na agricultura, pois possuem maior estabilidade na planta do que o AIA, mobilidade sistêmica e ação seletiva (GROSSMANN, K. Auxin herbicides: Current status of

mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2010.). No entanto, a auxina sintética mais amplamente utilizada como herbicida, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), gera resíduos, contaminando o ar, água, solo e alimentos e a exposição a estes resíduos causa efeitos adversos à saúde humana (BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular Mechanisms. *Review Literature And Arts of The Americas*, v. 15, n. 3, p. 365-374, 2006), como genotoxicidade (MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; HERNÁNDEZ-CERUELOS, A; CHAMORRO, G. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 39, n. 9, p. 941-946, 2001), neurotoxicidade (TAYEB, W.; NAKBI, A.; TRABELSI, M.; ATTIA, N.; MILED, A.; HAMMAMI, M. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormone lourde”. *Journal of Hazardous Materials*, v. 180, n. 1-3, p. 225-233, 2010), hepatotoxicidade (BORTOLOZZI, A.; DUFFARD, A. M. E.; DAJAS, F.; DUFFARD, R.; SILVEIRA, R. Intracerebral administration of 2,4-diclorofenoxiacético acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. *Neuro Toxicology*, v. 22, n. 2, p. 221-) e toxicidade renal (UYANIKGIL, Y.; ATES, U.; BAKA, M.; BIÇER, S.; ÖZTAS, E.; ERGEN, G. Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 82, n. 6, p. 749-755, 2009).

[007] O estado da técnica descreve herbicidas e fertilizantes de auxina ou análogos.

[008] O documento EP2688404 descreve composições para aumentar o crescimento de plantas em uma planta de floração aplicando uma quantidade eficaz de uma composição compreendendo auxina ou um análogo.

[009] O documento US2701250 descreve um processo de produção de ácido indolacético que compreende as etapas de obter uma mistura reacional contendo um composto selecionado do grupo que consiste em alquil-dimetoxibutirato e ácido levulínico e um membro selecionado do grupo que consiste em hidrocloreto de fenil-hidrazina e fenil-hidrazina, promovendo a conversão ácido indolacético.

[010] O documento US5670454 descreve a utilização de herbicidas do tipo auxina para o controle de ervas daninhas de folhas largas e ervas daninhas em plantas de culturas transgênicas.

[011] O documento US8207091B2 descreve um método para melhorar o crescimento e a produtividade das plantas por meio da adaptação dos níveis de hormônio vegetal, apresentando uma composição que inclui citocinina (90 mg/L), giberelina (50 mg/L) e auxina (50 mg/L).

[012] Em que pese as auxinas sintéticas serem amplamente utilizadas como reguladores de crescimento vegetal, principalmente, em viveiros de plantas como indutores de enraizamento, e como composto de biorreguladores para auxiliar em todos os estágios do desenvolvimento da cultura, apresentam alto custo de produção e necessitam ser diluídas para a aplicação.

[013] Ainda, a literatura técnica descreve que herbicidas compostos por auxina ou AIA em altas concentrações promovem a desregulação do crescimento de plantas, que pode ser dividida em três fases: estimulação (crescimento anormal e ativação metabólica), inibição (atrofiação e respostas fisiológicas) e decaimento (senescência e morte

celular e do indivíduo) (GROSSMANN, K. Auxin herbicides: Current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science*, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2010).

[014] Alguns microrganismos possuem a capacidade de produzir AIA e realizar associações naturalmente com plantas, exercendo efeito simbiote ou patogênico (SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism–plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, p. 425-448, 2007), podendo beneficiar ou causar danos à planta hospedeira. Por exemplo, enquanto rizobactérias muitas vezes produzem AIA para promover o crescimento e desenvolvimento das plantas, bactérias patogênicas podem gerar a mesma molécula para aumentar a susceptibilidade de plantas hospedeiras (SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant–microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, p. 1-13, 2010; PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003).

[015] Nas últimas três décadas, a aplicação de bactérias, vírus e fungos como herbicidas tem sido pesquisada por incluírem benefícios como a redução do impacto ambiental, aumento da especificidade do alvo, custos de desenvolvimento reduzidos em comparação com herbicidas convencionais e identificação de novos mecanismos contra plantas daninhas (HARDING, D. P.; RAIZADA, M. N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, p. 1-14, 2015).

[016] Dessa forma, é objeto da presente patente de invenção a produção de ácido indol-3-acético, biomolécula com diferentes possibilidades de utilização, por fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus flavipes*, obtendo um preparado em estado sólido (PES), potencialmente útil para auxiliar o crescimento de

plantas ou para atuar como herbicida, sendo menos agressivo ao meio ambiente que as auxinas sintéticas do estado da técnica, de menor custo de obtenção e podendo ser aplicado diretamente para a finalidade indicada, sem a necessidade de diluição.

[017] Segundo Pinto (2005) a FES, também denominada de fermentação sólida ou semi-sólida, refere-se ao processo de crescimento de microrganismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre circulante, visando converter a biomassa para a produção de enzimas e outras moléculas bioativas.

[018] O PES é obtido a partir da FES e é constituído de resíduo e microrganismos, sendo que sua aplicação na agricultura apresenta vantagens como dispensar processos adicionais de purificação, reduzindo, portanto, o custo do produto final.

[019] BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[020] A figura 1 apresenta o cromatograma do ácido indol-3-acético e os fragmentos gerados.

[021] A figura 2 apresenta o enraizamento (%) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB 2), tratados com 5, 10, 15 e 20% de PES [*A. flavipes* fermentado em farelo de soja (m/m)]. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

[022] A figura 3 apresenta a representação gráfica do comprimento de raízes (cm) de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB 2), tratados com 5, 10, 15 e 20% de PES [*A. flavipes* fermentado em farelo de soja (m/m)]. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

[023] DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[024] O processo fermentativo de produção de ácido indol-3-acético, objeto da presente patente de invenção, compreende a inoculação de

10⁷/mL esporos do microrganismo *Aspergillus flavipes* em 10 gramas de farelo de soja, preferentemente com granulometria entre 0,5 e 1 mm); entre 0,5 a 1,5% de triptofano e entre 5 a 15 mL de água.

[025] Os substratos são mantidos em incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 120h a 30°C.

[026] Após o crescimento do microrganismo, é obtido o PES (preparado em estado sólido), sendo adicionados 50 mL de água destilada ao preparado para obtenção do extrato para a quantificação de auxina.

[027] A leitura em absorvância foi realizada em espectrofotômetro a 535 nm e comparados com curva padrão de ácido indol-3-acético (Sigma®). Os resultados foram expressos em µg de ácido indol-3-acético/mL de amostra, conforme Tabela 1.

[028] Tabela 1 - Planejamento experimental para a otimização da produção de auxina por fermentação em estado sólido (FES) utilizando *A. flavipes* e farelo de soja como substrato e produção de AIA (µg/mL) resultante. Em destaque (linha 7), os valores relacionados à maior produtividade de AIA.

	Granulometria (mm)	Água (mL)	Triptofano (%)	AIA (µg/mL)
1	0,5	5	0,5	317,77
2	>1,0	5	0,5	285,83
3	0,5	15	0,5	237,3
4	>1,0	15	0,5	307,84
5	0,5	5	1,5	365,52
6	>1,0	5	1,5	264,74
7	0,5	15	1,5	461,07
8	>1,0	15	1,5	384,56
9	1,0	10	1,0	113,15

10	1,0	10	1,0	180,12
11	1,0	10	1,0	150,82

[029] As amostras provenientes do ponto ótimo de produção de auxina foram submetidas à quantificação de ácido indol-3-acético por LC-MS/MS para garantir maior acurácia dos resultados.

[030] Para a realização das análises foi utilizado um sistema LC-MS/MS, composto por um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Proeminence UFLC, equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degazeificador DGU- 20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação totalmente automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Acoplado ao HPLC está o espectrômetro de massas 3200 Q TRAP (Applied Biosystems), híbrido triplo quadrupolo, onde Q1 e Q3 são utilizados como filtros de massa e Q2 é uma célula de colisão onde as moléculas intactas e fragmentos de Q1 são quebrados em fragmentos de massas menores sendo que Q3 é definido para detectar apenas uma massa especial, que é um fragmento conhecido (filho) da molécula intacta (pai) de massa conhecida filtrada por Q1.

[031] As condições cromatográficas utilizadas para quantificação dos compostos no modo de ionização negativo e positivo são apresentadas na Tabela 2.

[032] Tabela 2 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação de ácido indol-3-acético (AIA) no modo de ionização negativo.

Coluna Analítica	
Fase Móvel	Fase A (FA) = 1% de ácido acético em água

	Fase B (FB) = 1% de ácido acético em metanol
Gradiente	0-2 minutos = 45% FB e 55% FA 2-3 minutos = 45 a 95% FB e 55 a 5% FA 3-8 minutos = 95% FB e 5% FA 8-9 minutos = 45 a 95% FB e 55 a 5% FA

[033] A quantificação de AIA ocorreu mediante a comparação com curva de calibração. A Figura 1 mostra o pico cromatográfico correspondente ao AIA no tempo de retenção de 2,44 minutos.

[034] Foram realizadas três repetições e o resultado obtido foi $456 \pm 125,45$ $\mu\text{g/mL}$, resultado semelhante ao obtido pelas análises colorimétricas (461,07 $\mu\text{g/mL}$), confirmando a grande produtividade do composto pelo microrganismo.

[035] TESTES

[036] O PES foi incorporado ao substrato Carolina II (turfa canadense, casca de arroz carbonizada e vermiculita) nas proporções de 5, 10, 15 e 20% (m/m), o equivalente a 40,13; 80,26; 120,39; e 180,58 mg/kg de AIA. O substrato foi umedecido com auxílio de nebulizadores. Foram plantadas estacas caulinares, de 3 a 6 cm de comprimento de *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* (clone IPB2), sendo que o material vegetal foi selecionado devido à sua importância econômica e a baixa porcentagem de enraizamento.

[037] O experimento foi realizado em uma região que apresenta o clima CWA (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente), segundo a classificação de Köppen, com precipitação média anual de 1353,7 mm, temperatura média anual de 21,7°C, com máxima de 28,1°C e mínima de 15,3°C.

[038] Após plantadas, as estacas permaneceram em casa de vegetação por 30 dias com umidade relativa do ar acima de 75%, mantida pela ação de nebulizadores. Após este período, as estacas foram transferidas para casa de sombra onde permaneceram por 10 dias. Ao final deste período, foi realizada uma avaliação destrutiva para a determinação do enraizamento.

[039] Conforme apresentado nas figuras 2 e 3, os resultados da porcentagem e comprimento de raízes foram significativos para o tratamento com 10% de PES. A porcentagem de enraizamento foi aumentada de 62,22% (controle) para 91,11%, enquanto o comprimento médio das raízes passou 6,66 cm para 10,90 cm. Foi possível notar um efeito máximo de dose em ambos os parâmetros.

[040] A maior dose se igualou estatisticamente ao controle, o que pode demonstrar o início de um efeito prejudicial do composto às plantas.

[041] Isoladamente, em meio de cultura, a produtividade de AIA pelo microrganismo *A. flavipes* foi de 67,78 µg/mL.

[042] Na interação com farelo de soja por FES, a produtividade de AIA aumentou mais de duas vezes em comparação com o microrganismo *A. flavipes* isolado, atingindo 144,50 µg/mL, sendo superior aos substratos de farelo de trigo (86,55 µg/mL) e DDGS de sorgo (36,25 µg/mL), conforme apresentado na Tabela 3.

[043] Tabela 3 - Produção de auxina (µg/mL) por fermentação em estado sólido utilizando substratos [farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT), bagaço de mandioca (BM), DDGS de sorgo (DS) e DDGS de milho (DM)] e diferentes microrganismos.

Microrganismo/Substrato	FS	FT	BM	DS	DM
<i>A. niger</i> 01	56,66	40,98	21,54	41,98	28,21

<i>A. niger</i> 40015	45,16	28,63	26,65	54,65	28,83
<i>A. flavipes</i>	144,50	86,56	**	36,25	**
<i>A. ustus</i>	**	102,19	**	70,67	**
<i>B. subtilis</i>	129,97	107,57	17,49	**	**
<i>B. subtilis</i> B	93,53	66,83	15,82	**	**
<i>B. subtilis</i> C	75,57	106,05	22,19	**	**
<i>B. subtilis</i> D	96,22	179,27	6,48	**	**
<i>B. subtilis</i> E	96,83	114,66	12,84	**	**
<i>B. subtilis</i> F	51,52	110,20	14,69	**	**
<i>B. subtilis</i> 27	92,29	131,36	17,33	**	**
<i>B. amyloliquefaciens</i>	159,07	111,82	22,76	**	**
<i>B. megaterium</i>	134,74	139,27	22,91	**	**
<i>T. koningnii</i>	88,78	91,39	33,23	117,60	74,15
<i>T. harzanium</i>	**	118,22	29,49	104,84	41,35
<i>T. atroviride</i>	121,54	81,67	10,50	33,79	38,88

[044] ** não houve crescimento microbiano

[045] Com as condições de granulometria, umidade e porcentagem de triptofano otimizadas, a produtividade de AIA por *A. flavipes* foi de 461,07 µg/mL, quase sete vezes mais do que a do microrganismo isolado, demonstrando as vantagens de sua aplicação, conforme revelado na Tabela 1.

[046] É importante ressaltar que o farelo de soja, devido ao valor nutricional, vem sendo incorporado às rações animais nos últimos anos. Tal aumento da demanda tem causado o conseqüente aumento no preço do produto. Apesar de tal aumento no preço do produto, a produção de AIA utilizando este meio de cultivo acrescido de triptofano possui custo mínimo quando comparado ao preço do AIA comercial.

[047] Assim, a presente invenção apresenta redução de custos de produção de AIA, tendo em vista o reaproveitamento de resíduos utilizados na agricultura, proporcionados pela FES e o aumento da eficiência de produção, como exemplificado pela alta produtividade por *A. flavipes*.

REIVINDICAÇÕES:

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO MEDIANTE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO caracterizado por compreender as etapas de:
 - a) inoculação de 10^7 /mL de esporos do microrganismo *Aspergillus flavipes* em 10 gramas de farelo de soja de granulometria entre 0,5 e 1 mm;
 - b) adição de 0,5 a 1,5% de triptofano e entre 5 a 15 mL de água;
 - c) manutenção dos substratos em incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 120h a 30°C.
2. PRODUTO OBTIDO através do processo reivindicado em 1, caracterizado por compreender um preparado em estado sólido (PES) de *Aspergillus flavipes* e farelo de soja mediante fermentação em estado sólido (FES).

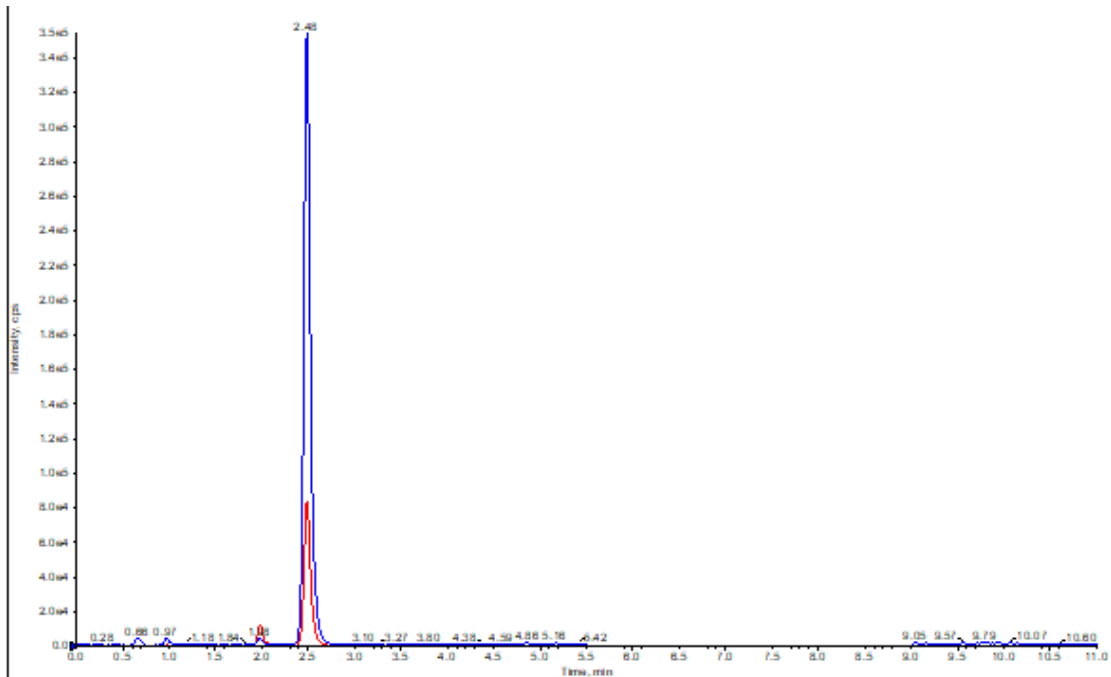


Figura 1

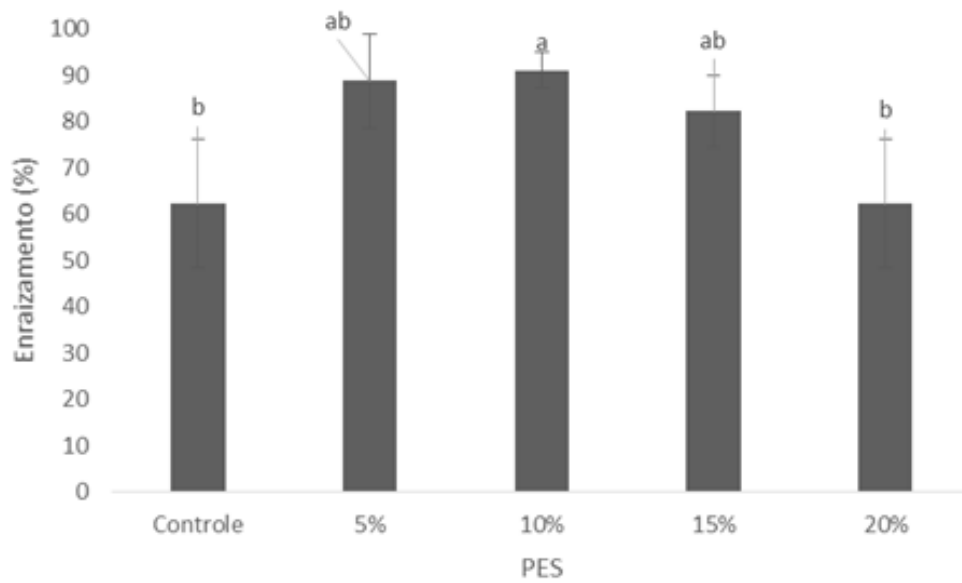
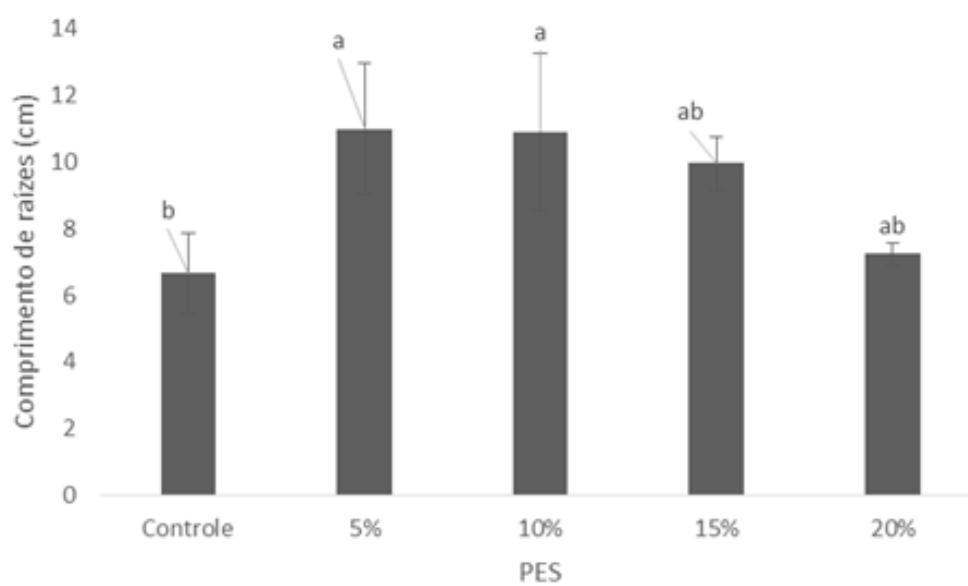


Figura 2

**Figura 3**

RESUMO

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO POR FERMENTAÇÃO
EM ESTADO SÓLIDO**

A presente patente de invenção descreve um processo de obtenção de ácido indol-3-acético (AIA) através de fermentação em estado sólido (FES), utilizando o fungo *Aspergillus flavipes*, obtendo um preparado em estado sólido (PES) e um extrato fonte de biomoléculas proveniente desta interação, utilizados como fonte de AIA para auxiliar o crescimento de plantas ou atuar como herbicida, em substituição ao 2,4-D e outros herbicidas auxínicos.