



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

(21) BR 102017014251-5 A2



(22) Data do Depósito: 29/06/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 15/01/2019

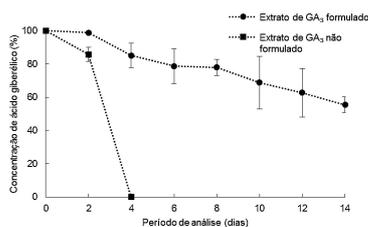
(54) Título: PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO

(51) Int. Cl.: C12P 27/00; C05F 11/10; C12R 1/04.

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

(72) Inventor(es): CARLOS RICARDO SOCCOL; MARCELA CANDIDO CAMARA; LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE; JULIANA DE OLIVEIRA; CRISTINE RODRIGUES.

(57) Resumo: PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO A presente invenção propõe a produção do hormônio vegetal, ácido giberélico (GA3), via fermentação submersa com sólidos em suspensão. Os sólidos utilizados como base para o meio de produção foram a casca de soja (CS) e a polpa cítrica (PC), ambos oriundos de resíduos agroindustriais. A invenção relata também a formulação líquida do extrato fermentado clarificado contendo o GA3, assim como a formulação sólida do extrato por meio da secagem em spray dryer. Ambas formulações se deram através do extrato clarificado obtido após a fermentação sem prévia extração e purificação do GA3, com o objetivo de obter um produto estável para ser aplicado em diferentes cultivares.



PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO

Campo da Invenção

[001]. A presente invenção está inserida no campo da biotecnologia agroalimentar por tratar-se de um processo para produção e formulação do hormônio vegetal conhecido como ácido giberélico (GA_3), através do reaproveitamento de resíduos agroindustriais.

[002]. O processo de produção do GA_3 ocorre por meio da fermentação semi-sólida ou fermentação submersa com sólidos em suspensão, utilizando a cepa *Gibberella fujikuroi*. Os sólidos utilizados na fermentação são provenientes de subprodutos agroindustriais, mais especificamente, subprodutos da indústria de processamento da soja (casca de soja) e de frutas cítricas (polpa cítrica).

[003]. Esta invenção descreve também, o processo de formulação líquida e/ou sólida do extrato fermentado contendo GA_3 , com o intuito de obter um produto estável e seguro para ser aplicado em diferentes cultivares.

Fundamentos da Invenção e Estado da Técnica

[004]. Esta invenção refere-se a um método de produção de ácido giberélico (GA_3) a partir de microrganismos do gênero *Gibberella* sp., utilizando a casca de soja ou uma mistura de polpa cítrica (PC) e casca de soja (CS) como substrato para meio de produção e fonte de nutrientes, via fermentação semi-sólida ou fermentação submersa com sólidos em suspensão, com o objetivo de reduzir os custos de produção do GA_3 e a diminuição do impacto ambiental por meio do reaproveitamento dos subprodutos agroindustriais. Refere-se também à elaboração de um produto formulado líquido ou sólido, contendo GA_3 , com o objetivo de reduzir a degradação da molécula.

[005]. A Tabela 1 apresenta um levantamento de dados feito com base em seis termos relacionados a esta invenção em diferentes bases de patentes disponíveis.

Tabela 1 Busca de patentes relacionadas ao escopo da invenção em diferentes bases de dados

Termos relacionados à invenção	Bases públicas						
	INPI*	USPTO	Espacenet	CIPO	FPO	WIPO	Google patentes
<i>Gibberellic acid production semisolid fermentation</i>	0	0	0	0	42	0	114
<i>Gibberellic acid production agroindustrial residues</i>	1	0	0	0	5	4	14
<i>Gibberellic acid production citric pulp</i>	1	0	0	0	757	598	595
<i>Gibberellic acid production soybean husk</i>	0	0	0	0	1843	0	763
<i>Gibberellic acid liquid formulation</i>	0	98	0	0	6241	5156	11175
<i>Gibberellic acid solid formulation</i>	0	39	0	0	5939	4888	9469

*Os termos foram traduzidos para a pesquisa no banco de dados do INPI.

[006]. Dentre as patentes encontradas, várias descrevem um meio de produção quimicamente definido para fermentação submersa (FSm), como exemplo, as patentes US2842051A, US2906670, US2906671, US2865812, US2977285 e US3021261.

[007]. Porém, tomando como base a utilização de resíduos agroindustriais como meio de produção de GA₃, a patente que mais se relaciona a este trabalho descreve o meio de produção a base de polpa cítrica e seu extrato como suporte e/ou substrato para a produção de GA₃ via fermentação no estado sólido (FES), FSm e FSm com sólidos em suspensão, nessas condições foi obtido 7,6 g/Kg de GA₃, 300 mg/L de GA₃ e 244 mg/L de GA₃, respectivamente (RODRIGUES et al. PROCESSO PARA PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO GIBERÉLICO: SEU USO E APLICAÇÃO. BR102012008883-5A2, 2012). A patente PI 0000525-8A2 descreve como meio de produção a FES utilizando como substrato/suporte 30% de bagaço de mandioca e 70% de casca de café, obtendo 422 mg/Kg de GA₃. Já a patente US7846699B2 descreve um meio a base de torta de mamona para FES e um meio quimicamente definido para FSm, com essas condições foi obtido 225

g/Kg de GA₃ e 15 g/L de GA₃, respectivamente. Contudo, nenhuma descreve a produção via fermentação submersa com sólidos em suspensão utilizando a casca de soja como substrato, assim como a sua mistura com polpa cítrica.

[008]. Quanto às patentes relacionados à formulação de produtos à base de GA₃, as que mais se relacionam com a presente invenção estão descritas na Tabela 2. No entanto, nenhuma descreve a formulação a partir de um extrato fermentado clarificado, sem prévia extração e purificação do GA₃, deste modo ressalta-se o caráter inovador desta patente.

Tabela 2 Formulações patenteadas contendo GA₃

Formulação	Estratégia	Número da patente
Pó	Extração e concentração do extrato bruto para obter cristais de GA ₃	US 2842051
Pó	Mistura de sais de GA ₃ com surfactante e fosfato diamônio	US 3004845
Granular	Extrusão de uma mistura de sais de GA ₃ com surfactante e fosfato diamônio	US 3031290
Pó	Mistura de GA ₃ em pó com sais anidros	US 3038794
Pó/ líquida/ pasta/ spray	Transformação do GA ₃ em éster e a partir disto adiciona-se os adjuvantes para cada tipo	US 3038794
Líquida	Mistura de GA ₃ com solvente orgânico, triglicerídeos, ésteres de ácidos graxos e um hormônio de crescimento de plantas adicional	WO/2000/002454A1
Granular	Mistura de GA ₃ em pó com um veículo, um dissacarídeo e um surfactante	US 6984609
Líquida	Mistura do GA ₃ em pó em um <i>blend</i> de solventes	US 0172890
Líquida	Mistura do GA ₃ em pó com antioxidantes, surfactantes, solvente e um protetor UV	US 8454982
Líquida	Mistura do GA ₃ , GA ₄ ou GA ₇ purificado com polietileno glicol e surfactante não iônico ou aniônico	US 20150173365
Líquida	Mistura de giberelinas em pó com adjuvantes	US 20160360748

[009]. O GA₃ foi descoberto na década de 1930 quando fazendeiros japoneses passaram a investigar a doença que acometia as plantações de arroz. Esta doença foi denominada de “doença da planta boba”, pois provocava crescimento excessivo, amarelecimento e redução da produtividade, devido a liberação do GA₃ pelo fungo que infectava as culturas (TAIZ, L., ZEIGER, E. FISILOGIA VEGETAL, ARTMED: PORTO ALEGRE, 4ª ED., 2009).

[010]. Este fungo ficou conhecido como *Gibberella fujikuroi* e é, atualmente, o mais utilizado na produção industrial de GA₃, devido a sua maior capacidade de produção quando comparado a outras espécies, como por exemplo, bactérias e microalgas. (RIOS-IRIBE, E. Y., FLORES-COTERA, L. B., CHÁVIRA, M. M. G., GONZÁLEZ-ALATORRE, G., ESCAMILLA-SILVA, E. M. INDUCTIVE EFFECT PRODUCED BY A MIXTURE OF CARBON SOURCE IN THE PRODUCTION OF *Gibberella fujikuroi*. WORLD J. OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY, V. 27, P.1499-505, 2011). A fermentação submersa (FSm) é a técnica mais utilizada para a produção de GA₃, porém outras técnicas de produção como a fermentação no estado sólido (FES) e a fermentação semi-sólida (FSS) ou fermentação submersa com sólidos em suspensão tem sido continuamente estudadas, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 Estudos da produção de GA₃ através de diferentes métodos de fermentação e substratos

Microrganismo	Tipo de fermentação	Meio de produção	Concentração de GA ₃	Referências
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Sólida	Casca de café	422 mg/Kg	Machado et al., 2002
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Submersa com alimentação	Glicose	1,68 g/L	Shukla, Chand and Srivastava, 2005
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Submersa	Glicose e farinha de arroz	175 mg/L	Ates, Ozenir and Gökdere, 2006
<i>Fusarium moniliforme</i>	Sólida	Polpa cítrica	5,9 g/Kg	Rodrigues et al., 2009
<i>Fusarium fujikuroi</i>	Submersa	Glicose e farinha de arroz	1,175 mg/L	Uthandi, Karthikeyan and Sabarinathan, 2010

<i>Fusarium proliferatum</i>	Sólida	Ervilha	7,8 mg/g	Satpute et al., 2010
		Sorgo	5,5 mg/g	
		Espiga de milho	6,1 mg/g	
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Submersa	Glicose e óleo de milho	380 mg/L	Rios-Iribe et al., 2011
<i>Fusarium moniliforme</i>	Submersa	Glicose	15 g/L	Rangaswamy, 2012
	Sólida	Torta da semente de mamona	225 g/Kg	
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Semi-sólida	Polpa cítrica	4,8 g/Kg	Oliveira, 2012
<i>Gibberella fujikuroi</i>	Submersa	Glicose e farinha de arroz	83,2 mg/L	Gökdere and Ates, 2013
	Submersa com células imobilizadas		158,9 mg/L	

[011]. O interesse industrial deste hormônio é devido à sua atividade reguladora no desenvolvimento e crescimento das espécies vegetais, atuando na quebra de dormência de sementes, partenocarpia, alongamento caulinar, aumento dos frutos, tolerância a estresse abiótico, florescimento de espécies ornamentais, entre outros aspectos (CAMARA, M. C., RODRIGUES, C., SILVA, A. L. L., VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R. GIBBERELLINS AND GIBBERELIC ACID: BIOSYNTHESIS, REGULATION AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS. ED. JACKSON HARDY, NOVA SCIENCE PUBLISHERS, NEW YORK, 1ª ED., 2015).

[012]. Porém, o empecilho da aplicação em larga escala do GA₃ está associado à baixa produtividade e aos altos custos de produção, tornando-o uma molécula de alto valor agregado.

[013]. A produção anual de GA₃ gira em torno de 100 toneladas e seu valor comercial é de cerca de US\$ 100 milhões (SHUKLA, R., SRIVASTAVA, A. K., CHAND, S. BIOPROCESS STRATEGIES AND RECOVERY PROCESSES IN GIBBERELIC ACID FERMENTATION. BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, V.3, 2003; ALBERMANN, S., LINNEMANNSTÖNS, P., TUDZYNSKI, B. STRATEGIES FOR STRAIN IMPROVEMENT IN *Fusarium fujikuroi*: OVEREXPRESSION AND LOCALIZATION OF KEY ENZYMES OF THE ISOPRENOID PATHWAY AND THEIR IMPACT ON GIBBERELLIN BIOSYNTHESIS. APPLIED

MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, V. 97, 2013). Atualmente, são encontrados no mercado produtos à base de GA₃, GA₄ e GA₇, conforme Tabela 4.

Tabela 4 Produtos contendo GA₃ atualmente comercializados

Tipo do hormônio	Tipo da formulação	Nome comercial	Produtores
GA ₃	Líquido	PastureGibb®	Orion Crop Protection
		GibGro® 4LS	NuFarm Américas
		Progibb® 4% / Rizup® 4SL / Release LC	Valent BioSciences Corporation
	Pó solúvel/ pó molhável	GibGro®	NuFarm Americas
		Gibb-gro®	Fertco
		Progibb® 2x/ Release®/ Berelex® 2x	Valent BioSciences Corporation
	Tablet	Progibb® tablet/ Berelex® tablet	Valent BioSciences Corporation
	Grânulos solúveis	Express®	Ravensdown
		Progibb® SG / Progibb® 40 SG / Activol® 40SG/ Berelex® 40SG / Ryzup® 40SG/ Ryzup® SmartGrass 40WSG	Valent BioSciences Corporation
		Gibb-star®	Sum Farm Nova Zelândia Limited
Pó solúvel/ pó molhável		Promalin®	Valent BioSciences Corporation
Grânulos solúveis	Provide® / Regulex®		

[014]. As formulações líquidas geralmente são compostas de soluções alcoólicas como diluente, enquanto que formulações sólidas envolvem veículos capazes de encapsular o ingrediente de interesse evitando que se degrade. Aditivos e/ou adjuvantes também são comumente utilizados a fim de conferir outras propriedades ao formulado, como por exemplo, proteção contra raios UV, contra umidade, contra aglomeração do pó, agentes para facilitar a diluição, a dispersão, a absorção na planta, entre outras funções (US 6984609, US 0172890, US 8454982, US 20150173365, US 20160360748).

[015]. As agências brasileiras que regulamentam produtos relacionados com a agricultura são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Esses órgãos são responsáveis pelas normas de formulação e comercialização desses produtos, assim como sua fiscalização.

[016]. O Brasil, por ter sua economia baseada na agricultura, destaca-se como um grande potencial para a aplicação do GA₃ em diferentes lavouras. No entanto, como visto na Tabela 4, os maiores produtores de GA₃ são grandes empresas internacionais, provenientes de países com tecnologia consolidada. Portanto, o desenvolvimento de tecnologias nacionais de baixo custo para a produção do GA₃ é desejado e certamente viabilizará sua aplicação em larga escala.

Descrição da abordagem do problema técnico

[017]. Em busca pela otimização da produção de GA₃ e redução de custos, a substituição de meios de fermentação quimicamente definidos por subprodutos agroindustriais se tornou foco de estudos, principalmente quando se trata de FES, no entanto, ainda há poucos relatos da utilização de resíduos aplicados à FSm e a fermentação submersa com sólidos em suspensão.

[018]. O Brasil é um dos líderes mundiais na produção e exportação de produtos agrícolas. É o principal produtor/exportador de café, açúcar, etanol, e suco de laranja. Estima-se que a área cultivável brasileira seja de 58,17 milhões de hectare, sendo que a soja é responsável por 57% de toda a área cultivável (CONAB – ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS – SAFRA 2015/16, V. 9, 2016).

[019]. Esta invenção propõe, portanto, o aproveitamento da casca de soja (CS) subproduto do processamento do grão de soja, como meio de produção de GA₃, via fermentação submersa com sólidos em suspensão. A produção de soja gira em torno de 95 milhões de toneladas por ano e para cada tonelada de soja, são gerados mais de 3% de casca de soja (CONAB – ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS – SAFRA 2015/16, V. 9, 2016; MONTIBELLER, VALESCA WEINGARTNER ET AL.

“CHARACTERIZATION OF HEMICELLULOLYTIC ENZYMES PRODUCED BY *Aspergillus Niger* NRRL 328 UNDER SOLID STATE FERMENTATION ON SOYBEAN HUSKS.” *BIORESOURCES* 9.4, 7128–7140, 2014).

[020]. A invenção propõe também, o aproveitamento da polpa cítrica (PC) em mistura com a CS, para compor o meio de fermentação para a produção de GA₃. A PC é obtida a partir do processamento da laranja, em que o bagaço, cascas e sementes são peletizados formando a PC. Estima-se que o Brasil produz cerca de 18 milhões de toneladas de laranja por ano, sendo que 50% do fruto consiste em bagaço (MAPA - MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. “CITRUS.” N.p., Web. 27 Oct. 2015).

[021]. Devido às suas qualidades nutricionais, a CS e a PC são fornecidas como suplemento alimentar para gados, no entanto, grandes quantidades ainda são descartados (ALEMDAR, A., SAIN, M. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NANOFIBERS FROM AGRICULTURAL RESIDUES – WHEAT STRAW AND SOY HULLS. *BIORSOURCE TECHNOLOGY*, V. 99, 2008; RODRIGUES, C., et al. IMPROVEMENT ON CITRIC ACID PRODUCTION IN SOLID-STATE FERMENTATION BY *Aspergillus niger* LPB BC MUTANT USING CITRIC PULP. *APPL. BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*, V. 158, 2009). A composição da CS e da PC está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5 Composição centesimal da casca de soja e da polpa cítrica

Composição	Casca de soja	Polpa cítrica
Proteínas (%)	13 - 14	7.0
Carboidratos (%)	75	80
Fibra detergente neutro (%)	68	20
Fibra detergente ácido (%)	52	20
Cinzas (%)	4 - 6	7.89
pH	5 – 5.5	5.76
Umidade (%)	5 - 6	11.42

*Adaptado de Miron et al. (2001), Zambom et al. (2001) e Rodrigues (2010)

[022]. Estes subprodutos agroindustriais são de baixo custo, sendo assim uma alternativa para redução dos custos de produção e consequentemente, diminuição do impacto ambiental por meio do reaproveitamento destes resíduos. Além do mais, eles são ricos em nutrientes, favorecendo o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

[023]. A formulação do extrato fermentado contendo GA₃ faz-se necessário a fim de reduzir a degradação da molécula por hidrólise, quando em soluções aquosas, tornando-a estável e consequentemente, proporcionando um produto com maior tempo de prateleira.

[024]. Nota-se que grande parte das patentes que envolve formulação de hormônios de crescimento de plantas, em especial o GA₃, parte de um ingrediente ativo em pó e purificado, o que em sua maioria é responsável pelo alto custo do produto. Portanto, nesta invenção propõe-se a formulação líquida e sólida do extrato fermentado clarificado contendo GA₃, obtido a partir da fermentação com sólidos em suspensão, sem a necessidade de extração prévia do GA₃.

Descrição Detalhada da Invenção

[025]. A presente invenção apresenta como inovação a produção de GA₃ por fermentação submersa com sólidos em suspensão, tendo como substrato a casca de soja ou uma mistura composta por polpa cítrica e casca de soja, previamente secos e com granulometria menor que 5 mm, utilizando o microrganismo *Gibberella fujikuroi*.

[026]. Esta invenção apresenta como inovação a formulação líquida a partir do extrato clarificado contendo GA₃, sem prévia purificação, através da concentração e adição de diluentes e adjuvantes.

[027]. Esta invenção apresenta como inovação a formulação sólida, por meio da secagem do extrato clarificado, contendo GA₃, sem prévia purificação, com a adição de aditivos e adjuvantes em *spray dryer*.

Inóculo

[028]. O extrato aquoso de CS e da mistura de PC e CS é preparado tomando-se de 5% a 15% (m/v) do substrato em água, sendo que deste valor, toma-se 100% de CS ou uma mistura de 30% a 70% (m/m) de PC com 70% a 30% (m/m) de CS. A suspensão é mantida sub fervura em banho-maria por 30 minutos com posterior resfriamento e filtragem. A cepa *G. fujikuroi* é inoculada no extrato e mantida entre 28°C a 30°C por 4 dias a 120 rpm. Ao extrato podem ser adicionadas fontes complementares de carbono, nitrogênio e/ou nutrientes para incrementar o crescimento da biomassa.

Produção de GA₃ via fermentação com sólidos em suspensão em frascos Erlenmeyer

[029]. O meio de fermentação é preparado tomando-se de 2,5% a 10% (m/v) dos substratos em 50 mL de água, para frascos erlenmeyer de 250 mL, sendo que desta porcentagem, toma-se 100% de CS ou uma mistura de 30% a 70% (m/m) de PC com 70% a 30% (m/m) de CS. O meio é inoculado com uma taxa de 5% a 15% (v/v) e mantido entre 28°C a 30°C por 5 dias a 120 rpm. Nessas condições obtêm-se uma concentração de 451,42 mg/L (9,02 g/Kg) de GA₃, e uma produtividade de 3,76 mg/L.h.

Produção em biorreator do tipo de coluna de bolhas

[030]. O meio de fermentação é preparado tomando-se de 2,5% a 10% (m/v) dos substratos em 1L de água, para um reator de coluna de bolhas de capacidade de 1,5 L, sendo que desta porcentagem, toma-se 100% de CS ou uma mistura de 30% a 70% (m/m) de PC com 70% a 30% (m/m) de CS. O meio é inoculado com uma taxa de 5% a 15% (v/v) de mantido entre 28°C a 30°C por 5 dias com taxa de aeração entre 1 a 5 vvm. Nessas condições obtêm-se uma concentração de 279,66 mg/L (5,59 g/Kg) de GA₃, e uma produtividade de 1,66 mg/L.h.

Clarificação do extrato fermentado

[031]. O extrato fermentado é primeiramente filtrado e então, clarificado. Toma-se, por exemplo, 30 mL da amostra, 2 mL de uma solução de acetato de zinco (30% m/v), 2 mL de uma solução de ferrocianeto de potássio (15% m/v), 10 mL de etanol e 6 mL de água. O volume dos reagentes podem ser alterados, dependendo do volume da amostra. Desta forma obtém-se a precipitação das macromoléculas.

Determinação da concentração de GA₃

[032]. Para a análise do GA₃, o extrato clarificado é submetido à acidificação com HCl (2,5 mL de extrato em balão volumétrico de 100 mL aferido com HCl 30% v/v) durante 60 min a 20 °C. A análise é realizada em espectrofotômetro a 254 nm (HOLBROOK A., EDGE W., BAILEY F. SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF GIBBERELIC ACID. *ADV CHEM SER.*1961:28, 159-167).

Formulação líquida

[033]. O extrato clarificado é submetido à concentração por rota- evaporador a 45°C até atingir redução de 20% a 80% do seu volume inicial. Adiciona-se então de 20% a 80% de um diluente, podendo ser polietileno glicol, etanol, álcool isopropílico, álcool metílico, glicerol, propanol, n-butanol, acetona, lactato de etila, n-butil lactato, propileno glicol; mais especificamente de 50 a 70% de diluentes como etanol, polietileno glicol, álcool isopropílico, glicerol; adiciona-se de 1% a 5% de adjuvante, podendo ser conservantes (ácido benzoico, ácido sórbico, ácido propiônico, sais de sódio e potássio, nitrito ou nitrato de sódio ou potássio), acidulantes (ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido tartárico), surfactantes (polissorbatos 20 e 80, ésteres de fosfato, óleos sulfato e sulfonados, sulfato e sulfonatos alquilfenóis etoxilados, ésteres de ácidos graxos, ésteres de glicose e sacarose, álcoois etoxilados, alquilfenóis etoxilados, ácidos graxos etoxilados), antioxidantes (galatos – propil, octil ou dodecil; ácido ascórbico, BHA – butil-hidroxianisol, BHT – butil-hidroxitolueno e TBHQ – t-butil-hidroquinona), preferencialmente 1% a 2,5% de surfactante do tipo polissorbatos. O estudo da estabilidade acelerada do formulado é realizado durante 14 dias a 54°C, segundo método descrito em

“CIPAC handbook MT 46” (MARTIN A., DOBRAT W. CIPAC HANDBOOK VOLUME F. IN: COLLABORATIVE INTERNATIONAL PESTICIDES ANALYTICAL COUNCIL LTD. HARPENDEN, U.K., 1994). A estabilidade a longo prazo é realizado durante 6 a 12 meses a temperatura ambiente. Nessas condições obtêm-se a redução da degradação da molécula, com atividade remanescente de GA₃ acima de 50% após 14 dias a 54°C, ao passo que, o extrato não formulado perde atividade rapidamente, conforme Figura 1. Na avaliação da estabilidade a longo prazo, a atividade de GA₃ no extrato formulado se mantém praticamente estável após 7 meses a temperatura ambiente, conforme Figura 2.

Formulação sólida

[034]. Ao extrato clarificado é adicionado 5% a 30% de agente encapsulante, podendo ser amido, maltodextrina, pectina, sacarose, glicose, gomas, soro de leite, lactose, proteína de leite, gelatina, caseinato de sódio, manitol, sorbitol, dextrose, maltose, polímeros em geral; 1% a 5% de anti-umectante, por exemplo, carbonato de cálcio, carbonato de magnésio, bicarbonato de magnésio, celulose monocristalina, celulose em pó, dióxido de silício, silicato de cálcio, silicato de magnésio, calcário em pó, talco. A solução é submetida a secagem em *spray dryer* com temperatura de entrada entre 120°C a 180°C, fluxo de entrada de amostra de 600 mL/h, fluxo de ar de 73 m³/h, 0.6 bar de pressão. A estabilidade a longo prazo é realizado durante 6 a 12 meses a temperatura ambiente. Nessas condições, a atividade de GA₃ se manteve constante após 4 meses, conforme Figura 3.

Descrição das Figuras

[035]. **Figura 1** Análise da estabilidade acelerada da atividade de GA₃ após 14 dias a 54°C

[036]. **Figura 2** Estabilidade da formulação líquida do extrato contendo GA₃ a longo prazo em temperatura ambiente

[037]. **Figura 3** Estudo da estabilidade da formulação sólida contendo GA₃ a longo prazo, em temperatura ambiente

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, caracterizado pelo fato de que o processo de produção utilizar como meio de cultivo somente subprodutos agroindustriais como a casca de soja e a polpa cítrica.

2. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com a reivindicação 1, por ser um processo fermentativo com sólidos em suspensão de baixo custo.

3. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato do meio de fermentação ser composto de 2,5% a 10% de sólidos em suspensão.

4. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato dos sólidos em suspensão presentes no meio de fermentação ser 100% de casca de soja.

5. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pelo fato dos sólidos em suspensão presentes no meio de fermentação ser uma mistura de 30% a 70% de polpa cítrica com 70% a 30% de casca de soja.

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo fato do extrato fermentado da fermentação com sólidos em suspensão ser formulado e utilizado como fonte de ácido giberélico, sem a necessidade de etapas de purificação.

7. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela formulação líquida conter entre 20% a 80% de diluente, preferencialmente de 50% a 70% de etanol, polietileno glicol, álcool isopropílico ou glicerol.

8. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 3 e 4, caracterizado pela formulação líquida conter entre 1% a 5% de adjuvantes, preferencialmente 1% a 2,5% de surfactante.

9. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pela formulação sólida conter entre 5% a 30% de um agente encapsulante.

10. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 3 e 6, caracterizado pela formulação sólida conter entre 1% a 5% de anti-umectante.

11. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 3, 6 e 7, caracterizado pela secagem do extrato fermentado contendo ácido giberélico, sem prévia purificação, em *spray dryer*.

12. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pela secagem em *spray dryer* ser realizada a temperatura de entrada entre 120°C a 180°C.

13. PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO, de acordo com as reivindicações 8 e 9, caracterizado pela secagem em *spray dryer* ser realizada com fluxo de entrada de amostra de 600 mL/h, fluxo de ar de 73 m³/h e a 0.6 bar de pressão.

DESENHOS

FIGURA 1

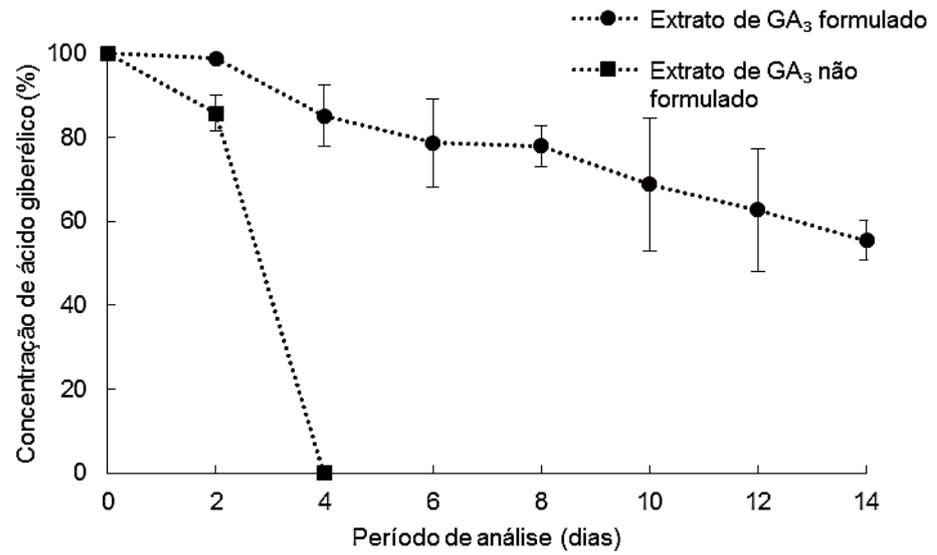


FIGURA 2

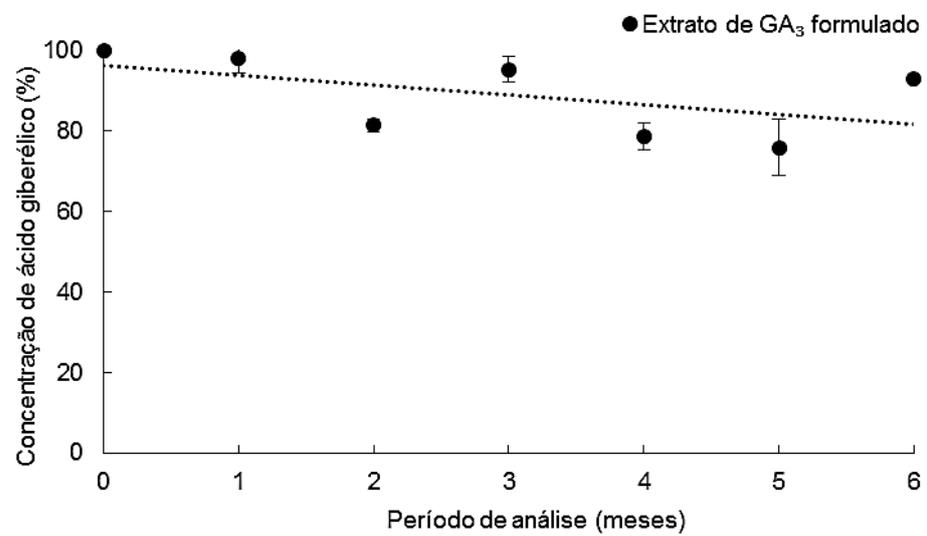
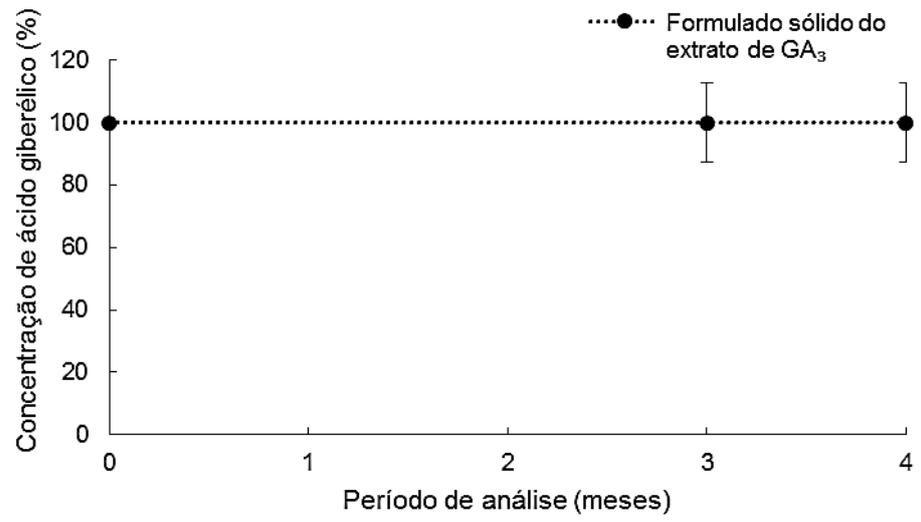


FIGURA 3

RESUMO**PROCESSO DE PRODUÇÃO E FORMULAÇÃO DE UM PRODUTO
CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO**

A presente invenção propõe a produção do hormônio vegetal, ácido giberélico (GA₃), via fermentação submersa com sólidos em suspensão. Os sólidos utilizados como base para o meio de produção foram a casca de soja (CS) e a polpa cítrica (PC), ambos oriundos de resíduos agroindustriais. A invenção relata também a formulação líquida do extrato fermentado clarificado contendo o GA₃, assim como a formulação sólida do extrato por meio da secagem em *spray dryer*. Ambas formulações se deram através do extrato clarificado obtido após a fermentação sem prévia extração e purificação do GA₃, com o objetivo de obter um produto estável para ser aplicado em diferentes cultivares.