



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

(11) PI 0705245-6 B1



(22) Data do Depósito: 09/07/2007

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: PROCESSO DE CULTIVO DE PLANTAS SOB CONDIÇÕES DE HIPERGRAVIDADE

(51) Int.Cl.: A01C 1/00; A01C 14/00.

(73) Titular(es): UNIÃO BRASILEIRA DE EDUCAÇÃO E ASSISTÊNCIA - MANTENEDORA DA PUC RS.

(72) Inventor(es): THAIS RUSSOMANO; FELIPE PREHN FALCÃO; LEANDRO VIEIRA ASTARITA; CLARICE AZEVEDO MACHADO; PRISCILLA COLLIN; AMANDA ASSUNÇÃO VIEIRA; MARLISE ARAÚJO DOS SANTOS.

(57) Resumo: Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade. A presente invenção proporciona um processo de germinação e/ou modulação do desenvolvimento de plantas utilizando o conceito inventivo de a elas impor uma condição de hipergravidade, como forma de aumentar a eficiência e rapidez do desenvolvimento e/ou da germinação de plantas.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade

Campo da Invenção

5 A presente invenção é relacionada à aplicação de condições que simulam a hipergravidade na modulação do desenvolvimento de plantas. Mais especificamente, a presente invenção proporciona equipamento e processo capazes de induzir os efeitos causados pelo excesso da gravidade, sendo aplicado na modulação da germinação e/ou do desenvolvimento pós-
10 germinativo de plantas de diferentes espécies, como por exemplo, a espécie *Eruca sativa* Mill. O processo da invenção proporciona diversas vantagens como, por exemplo, aumento da taxa de germinação, acelerado e eficiente desenvolvimento, elevada taxa de crescimento (volume e massa) e de produção de metabólitos secundários quando comparados com os processos
15 de cultivo em ambiente com gravidade normal.

Antecedentes da Invenção

Estudos biológicos em ambiente espacial cada vez mais têm recebido bastante atenção de pesquisadores. São conhecidos relatos científicos de que
20 alterações na gravidade, assim como alterações na ação do campo magnético da Terra, podem interferir no desenvolvimento de organismos vivos. A hipergravidade representa uma dessas alterações e pode ser definida como sendo um efeito de aumento de peso que se verifica num curto espaço de tempo como, por exemplo, o que ocorre durante o lançamento e reentrada na
25 atmosfera.

Em Terra, a gravidade está presente durante a evolução das plantas, sendo que elas a utilizam para regulação do seu crescimento e desenvolvimento (Soga, 2004). Atualmente, duas hipóteses buscam explicar o mecanismo de percepção da gravidade nas plantas. A hipótese “starch-
30 statolith” afirma que densos corpos de amido chamados amiloplastos, encontrados nas células da raiz, agem como um sensor de gravidade das plantas (Kiss et al, 1996; Kiss et al., 1998; Fitzelle, 2001; Aubay-Centis, 2003; Kiss et al., 1999). Já a hipótese “protoplast pressure”, através de observações

de plantas alteradas geneticamente contendo poucos amiloplastos, defende que a percepção da gravidade é causada pelo peso de todo o conteúdo das células da raiz (Caspar, 1989; Guisinger, 1999; MacCleery and Kiss, 1999; Soga et al., 2004; Soga et al., 2005). Contudo, até hoje, a maioria dos dados a respeito da influência da gravidade na fisiologia e morfologia da planta tem sido obtida com plantas submetidas a mudanças na orientação do vetor gravitacional (Aubay-Centis, 2003). Para esta finalidade, as experiências no espaço fornecem condições de microgravidade, enquanto aquelas que usam técnicas de centrifugação fornecem condições de hipergravidade (Soga, 1999).

Os experimentos em hipergravidade podem revelar os mecanismos envolvidos em animais ou plantas, nos tecidos ou células em resposta a mudanças gravitacionais (van Loon et al., 1993). Da mesma forma, é possível criar em Terra, através do uso de centrífugas humanas, ambiente de hipergravidade similar àqueles comumente encontrados em missões no espaço ou durante uma manobra íngreme de um avião de alta performance. Nas plantas, a hipergravidade produzida pela centrifugação é usada para analisar as respostas de sementes da planta ao estímulo da gravidade (Hoson, 2002), apesar de esta técnica ser comumente empregada na separação de componentes celulares, mas somente como um estímulo primário (Russomano et al., 2007).

Forças gravitacionais maiores que +1G têm sido úteis para estudos do papel da gravidade no crescimento de plantas (Kasahara et al., 1995). Experimentos realizados por Hoson (2002) demonstraram que a hipergravidade produzida pela centrifugação aumentou a rigidez da parede celular devido à resistência da força gravitacional (Soga et al., 1999; Soga, 2004; Hoson et al., 2002). Da mesma forma, foi observada a inibição do crescimento de alongação em epicótilos da mostarda (Waltron and Brett, 1990), hipocótilos do radite e pepino (Kasahara et al., 1990), hipocótilos do agrião (Hoson et al., 1996), epicótilos do feijão azuki (Soga et al., 1999), coleóptilo e mesocótilos de milho (Soga et al., 2003) e inflorescência de hastes de *A.thaliana* (Tamaoki et al., 2006) em resposta a hipergravidade. Estes resultados sugerem que a inibição do crescimento é devido à diminuição da extensibilidade mecânica da parede

celular (Soga et al., 1999; Hoson et al., 2002; Soga et al., 2003; Soga et al., 2004).

Entretanto, experimentos em nível morfológico conduzidos pelos presentes inventores mostraram que sementes de rúcula germinam mais rápido quando expostas à hipergravidade. Tais resultados são surpreendentes à luz da arte anterior e constituem o ponto de partida para o desenvolvimento da presente invenção.

As literaturas científicas e patentárias contemplam divulgações apenas parcialmente relacionadas referentes ao assunto da presente invenção, porém sem antecipar, ou sequer sugerir, ainda que indiretamente, qualquer dos objetos da presente invenção.

O artigo intitulado “Simulated microgravity and hypergravity attenuate heart tissue development in explant culture” relata o estudo sobre a influência da hipergravidade sobre a morfogênese de tecido cardíaco.

A patente norte-americana US 6,008,009, de titularidade de Universities Research Association e intitulada “Centrifuge-operated specimen staining method and apparatus”, descreve um método e instrumento para coloração pré-seletivo, onde reagentes líquidos coloridos são aplicados e removidos da câmara de coloração.

O pedido internacional de patente WO 0030718, depositado por Arthur Kreitenberg e intitulado “Exercise apparatus involving centrifugal forces”, descreve instrumentos de exercício envolvendo forças centrífugas, onde a aceleração centrífuga e aceleração gravitacional da Terra são somadas.

O documento europeu EP1030554, de titularidade de Oceaneering International, Inc. e intitulado “Method and apparatus for cytoplasmic loading using an impact-mediated procedure”, descreve um método e instrumento para a introdução de macromoléculas no citoplasma de células vivas. Isso ocorre através de um procedimento mediado por impacto, que comprime as células com número pré-determinado de partículas sólidas em um sopro de gás propelente. Esse procedimento pode ser alterado por condições gravitacionais e é realizado preferencialmente sob condições de hipergravidade.

A patente norte-americana US 3,882,634, da NASA, descreve um equipamento para acelerar o crescimento de plantas baseado na aplicação de

movimentos de rotação e translação sobre eixos horizontais, sendo providos meios para que nutrientes sejam administrados às referidas plantas durante os movimentos rotatórios. O movimento planetário horizontal *reduz* os efeitos da gravidade, ou seja, simula efeitos de *microgravidade*, acelerando o crescimento de plantas.

A patente norte-americana US 3,911,619, de Gravi-Mechanics Co., descreve um equipamento para proporcionar a germinação de sementes, também baseado na aplicação de movimentos de rotação sobre eixos horizontais. O movimento planetário horizontal *reduz* os efeitos da gravidade, acelerando a germinação das sementes e evitando certos problemas associados à gravidade.

A patente norte-americana US 3,973,353, de Gravi-Mechanics Co., descreve um outro variante de equipamento para acelerar o crescimento de plantas baseado na aplicação de movimentos de rotação e translação sobre eixos horizontais, sendo providos meios para que nutrientes sejam administrados às referidas plantas durante os movimentos rotatórios. O movimento planetário horizontal *reduz* os efeitos da gravidade acelerando o crescimento de plantas.

Os resultados obtidos com o sistema e o processo da presente invenção são surpreendentes à luz da literatura científica e patentária conhecida.

Sumário da Invenção

É um dos objetos da presente invenção proporcionar um processo de desenvolvimento e cultivo de plantas, da espécie *Eruca sativa* Mill, sob condições de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$.

Em um aspecto, sendo, portanto, um dos objetos da invenção é proporcionado um equipamento e um processo para gerar os efeitos de um ambiente com hipergravidade simulada de $7G_{z+}$, aumentando a germinação e/ou o desenvolvimento pós-germinativo de plantas da espécie *Eruca sativa* Mill.

É um outro objeto da presente invenção proporcionar um processo para cultivo em larga escala de plantas da espécie *Eruca sativa* Mill, em um sistema que proporciona um ambiente de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$.

É um ainda outro objeto da presente invenção proporcionar um processo para cultivo em larga escala de plantas da espécie *Eruca sativa* Mill, que apresentem desenvolvimento acelerado no crescimento e diferenciação celular.

5 É um outro objeto da presente invenção proporcionar um processo para cultivo em larga escala de plantas da espécie *Eruca sativa* Mill, que apresentem taxa de crescimento (volume e massa) e diferenciação significativamente maiores, para um mesmo período, quando comparado a outros em ambiente com gravidade normal.

Estes e outros objetos da presente invenção ficarão mais aparentes e
10 serão mais valorizados a partir da descrição detalhada da invenção.

Breve Descrição das Figuras

A figura 1 mostra o desenvolvimento individual da planta de espécie *Eruca sativa* Mill (rúcula) submetida a dois tipos de ambiente diferentes, um
15 ambiente de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ e o outro utilizando gravidade normal (1G), usado como controle. Os testes foram feitos num período intermitente de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ e 1G por quatro dias, em métodos papel com água ou terra.

A figura 2 mostra a comparação do crescimento de rúcula no método
20 terra.

A figura 3 mostra a diferença dos crescimentos de rúcula obtidos nos experimentos papel com água-centrífuga (exemplo 1) e terra-controle (exemplo 2).

A figura 4 mostra um corte histológico de rúcula submetida a
25 hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ intermitente ($7G_{z+}$ por 9h/dia alternada por 1G, por 4 dias).

A figura 5 mostra um outro corte histológico de rúcula submetida a hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ intermitente ($7G_{z+}$ por 9h/dia alternada por 1G, por 4 dias)

30 A figura 6 mostra um corte histológico de rúcula não submetida a hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ (controle, gravidade 1G).

Descrição Detalhada da Invenção

A partir da descrição detalhada da presente invenção, os versados na arte imediatamente reconhecerão seu grande valor técnico e econômico. Para fins da presente invenção, o termo “hipergravidade” é definido como aquele
5 resultante de meios capazes de induzir os efeitos causados pelo excesso da gravidade, simulando a hipergravidade. Os exemplos preferenciais descritos a seguir visam proporcionar maneiras de reproduzir a invenção, a fim de melhor elucidá-las.

Exemplo 1 – Método Papel com Água

10 Nesta primeira concretização, foram utilizadas 10 sementes de *Eruca sativa* Mill, (variedade KAD). As sementes foram acondicionadas em papel de germinação embebido em água e posteriormente, inseridas em recipientes plásticos que foram acoplados na centrífuga e cobertos de modo a conservar as condições ideais de umidade. A temperatura do ambiente foi ajustada e
15 mantida em 22°C durante todo o experimento. A centrífuga foi ajustada para girar com uma rotação de 92 rpm, de forma a proporcionar um ambiente de 7G_{z+}. Assim, durante o repouso, o recipiente permanecia em um ângulo de 90° em relação ao braço da centrífuga. Durante a rotação da centrífuga, o recipiente permanecia em um ângulo de 0° em relação ao braço da centrífuga,
20 simulando o aumento da força gravitacional terrestre no eixo z. Um furo de 3 milímetros foi feito no lado de cada recipiente para permitir ventilação. As sementes foram submetidas a períodos intermitentes, sendo 9 h/dia em hipergravidade (7G_{z+}) e 15h/dia em gravidade terrestre (1G), durante 4 dias consecutivos. Dois recipientes plásticos similares (controle) mantiveram-se
25 abertos na mesma sala para servir como controle (1G). Ao final de cada período de hipergravidade, adicionou-se água aos recipientes num volume de 0,5 mL, mantendo as condições de umidade. A concretização foi realizada duas vezes a fim de se verificar a reprodutibilidade dos resultados, conforme descrição a seguir.

30 Os resultados demonstraram que as sementes expostas a 7G_{z+} germinaram em 3 dias em comparação aos 4 dias requeridos para as sementes do tratamento controle. Ao final do processo, as plantas submetidas à hipergravidade foram removidas e o comprimento total (raíz + parte aérea) foi

avaliado com um paquímetro. Na primeira realização (n=10), o comprimento médio das plantas submetidas a 7G_{z+} foi de 3,2 cm, contra 1,9 cm das plantas do tratamento controle. Na segunda realização (n=14), o comprimento médio das plantas submetidas a 7G_{z+} foi de 2,2 cm, significativamente maior (p=0,02) ao comprimento das plantas em 1G (controle) que foi de 1,8 cm. Os resultados descritos acima suportam a aplicabilidade do processo da presente invenção na modulação da germinação e/ou do desenvolvimento de plantas. Embora as razões técnicas para tais surpreendentes resultados não sejam completamente esclarecidas, algumas linhas de argumentação técnica poderiam explicar tais resultados. Uma delas poderia estar relacionada à influência do fito-hormônio auxina, que modula o desenvolvimento de plantas. O termo “auxina” vem de um termo derivado do grego, que significa crescer, sendo a auxina, portanto, caracterizada pela sua capacidade de induzir o alongamento de células na região sub-apical de ramos. A auxina é um hormônio vegetal responsável pelo crescimento celular das plantas, o prolongamento dos caules e raízes e o desenvolvimento dos frutos. As auxinas sabidamente controlam o gravitropismo, promovem a dominância apical e retardam a abscisão. A auxina afeta também processos fisiológicos, incluindo o fototropismo, o gravitropismo, o desenvolvimento de frutos, entre outros. Entretanto, o alongamento é um dos efeitos mais importantes da ação da auxina. Uma etapa importante do alongamento é a acidificação da parede celular. Isto é gerado por um gradiente eletroquímico que conduz o bombeamento de prótons através da membrana plasmática, promovendo a acidificação da parede celular, o que leva ao aumento da atividade enzimática, que por sua vez promove a maleabilidade das estruturas das células, permitindo o alongamento celular. As forças da pressão osmótica, na entrada de água na célula, causam a sua expansão. O surpreendente e significativo desenvolvimento de *Eruca sativa* Mill depois de 4 dias exposta à condição de hipergravidade intermitente (7G_{z+} a 9h/dia) poderia, portanto, ser originado de uma modulação na quantidade de auxina. Da mesma forma que a hipergravidade pode alterar os níveis de auxina nos tecidos, pode-se inferir que ocorram alterações de componentes do metabolismo secundário, como atividades enzimáticas da via dos fenilpropanóides e terpenóides, bem como na síntese *de novo* de moléculas reguladoras do desenvolvimento.

Exemplo 2 – Método Terra

A partir dos resultados obtidos no exemplo 1, que utilizou o “método papel com água”, novos experimentos foram conduzidos. No presente exemplo, foi empregado somente o “método terra” (terra preta ou solo), para
 5 confirmar/validar o método “papel com água”, apesar das divergências obtidas com o fator água. Ao fim deste experimento, porém, foi percebido visualmente que a terra das amostras contidas na centrífuga ficou seca em sua superfície, o que possivelmente dificultou o crescimento da planta. Foi nítida a dificuldade de estabelecer qual a quantidade exata de água que deve ser usada na terra para
 10 obter a mesma umidade obtida no papel umedecido tanto a 1Gz quanto à 7G_z+. A figura 2 mostra que o crescimento nas amostras-controle ($3,76 \pm 1,21$) foi estatisticamente maior ($p = 0,00$) que o crescimento nas amostras-centrífuga ($3,15 \pm 1,00$). Entretanto, ao comparar os crescimentos do método papel com água-centrífuga dos experimentos do exemplo 1 g ($8,44 \pm 1,43$) com os
 15 crescimentos do método terra nas amostras terra-controle ($3,76 \pm 1,21$), foi observada notável diferença ($p = 0,00$), como mostra a figura 3. Portanto, o último experimento foi conduzido e dedicado à aplicação somente do método papel com água, para melhor controle dos resultados.

Exemplo 3 – Método Papel com Água

20 Em um experimento seguinte, conduzido com o “método papel com água”, foi obtido um maior crescimento nas amostras da centrífuga ($4,00 \pm 1,01$) apresentando valores estatisticamente significativos ($p = 0,00$). No entanto, as plantas não atingiram 1 cm de diferença do controle ($3,49 \pm 1,27$). Em ambas as amostras foi observado um menor crescimento, pois a média não
 25 ultrapassou 4,5 cm; diferentemente dos experimentos anteriores (Exemplos 1 e 2), nos quais foram obtidas médias de até 8,5 cm. Os fatores que poderiam ter influenciado nos resultados foram alterações indesejadas nos parâmetros temperatura e umidade durante a condução dos experimentos.

Os compostos fenólicos totais foram quantificados neste estudo, e
 30 resultaram em maiores montantes nas plantas expostas à hipergravidade simulada de 7G_z+, porém os valores não foram estatisticamente significativos ($p = 0,06$). Assim sendo, a quantidade de fenólicos totais produzidos pela rúcula,

demonstrada na tabela 1, foi considerado igual tanto nas amostras controle quanto nas amostras da centrífuga (hipergravidade simulada de 7G_{z+}).

Tabela 1 - Valores de fenólicos totais em equivalentes de ac. gálico (mg/g)

Controle	Centrífuga
0,08538	0,08850
0,06914	0,07852
0,05898	0,08928
0,06152	0,07912
0,07970	0,07872
0,06758	0,07952
0,05172	0,07150
0,08830	0,07932

5

Por fim, no corte histológico dos cotilédones de rúcula foi percebida uma diferença na distribuição de seu óleo essencial. Nas células do cotilédone-centrífuga, o óleo ficou distribuído em toda a membrana celular e foram observadas pequenas gotas de óleo dispersas no citoplasma (Figuras 4 e 5). Já nas células do cotilédone-controle, o óleo foi localizado no centro da célula representando uma única e grande gota (Figura 6).

10

Através dos estudos preliminares desenvolvidos no Centro de Microgravidade-PUCRS, pôde-se concluir que a germinação e o crescimento de sementes da espécie *Eruca sativa* Mill são maiores quando estas são expostas à hipergravidade simulada de 7G_{z+}.

15

Os resultados apresentados sugerem que o crescimento e/ou o desenvolvimento de plantas em hipergravidade simulada de 7G_{z+} pode ser uma alternativa para minimizar um dos principais problemas enfrentados pelo agronegócio e pelas indústrias farmacêutica e cosmética, pois em um menor período de tempo com um baixo custo operacional tem-se um aumento na produção de matéria-prima vegetal, além de melhor proporcionar a obtenção de extratos vegetais quantitativamente padronizados.

20

No processo da presente invenção, o uso do método papel com água, a intensidade de hipergravidade simulada de 7G_{z+}, as condições de tempo e

umidade de exposição da planta e o esquema de intermitências são determinantes para a obtenção do crescimento/desenvolvimento vegetal aumentando e desejado.

Reivindicações

1. Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade para aumentar a germinação e/ou o desenvolvimento pós-germinativo de plantas da espécie *Eruca sativa* Mill, compreendendo submeter o material vegetal a períodos de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$, **caracterizado por** serem seguidos de períodos de gravidade terrestre (1G).

2. Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelos** períodos de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ serem de 9h por dia.

3. Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 2 **caracterizado pelos** períodos de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ seguidos de períodos de gravidade terrestre serem durante 4 dias.

4. Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3 **caracterizado pelos** períodos de hipergravidade simulada de $7G_{z+}$ serem realizados em centrífuga.

5. Processo de Cultivo de Plantas sob Condições de Hipergravidade de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 4, **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a. Ajustar e manter a temperatura ambiente a 22°C ;
- b. Inserir sementes da espécie *Eruca sativa* Mill acondicionados em papel embebido em água em recipientes plásticos e acoplados na centrífuga;
- c. Ajustar a centrífuga para girar a uma rotação de 92 rpm ($7G_{z+}$);
- d. Submeter as sementes a períodos de intermitência, sendo 9h por dia em hipergravidade simulada de $7G_{z+}$, durante quatro dias consecutivos.

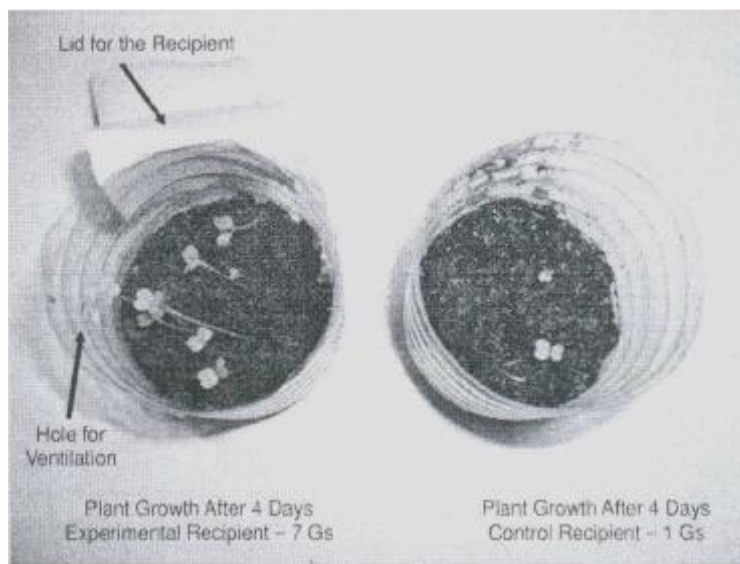
Figuras

Figura 1

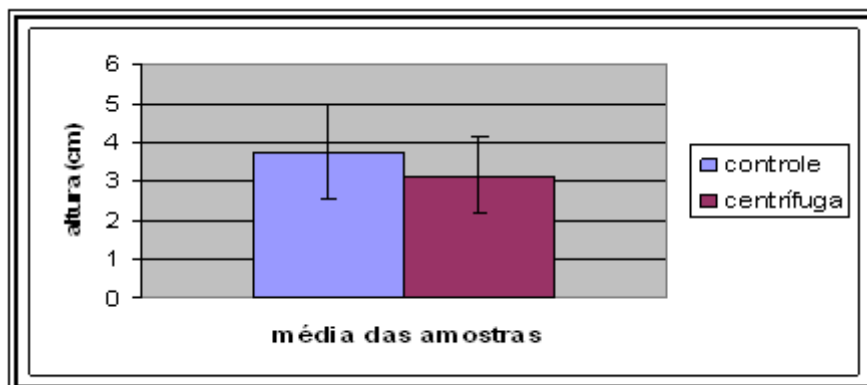


Figura 2

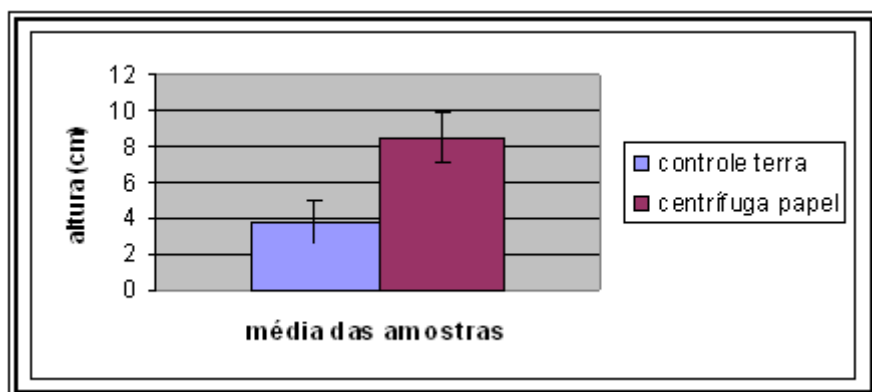


Figura 3

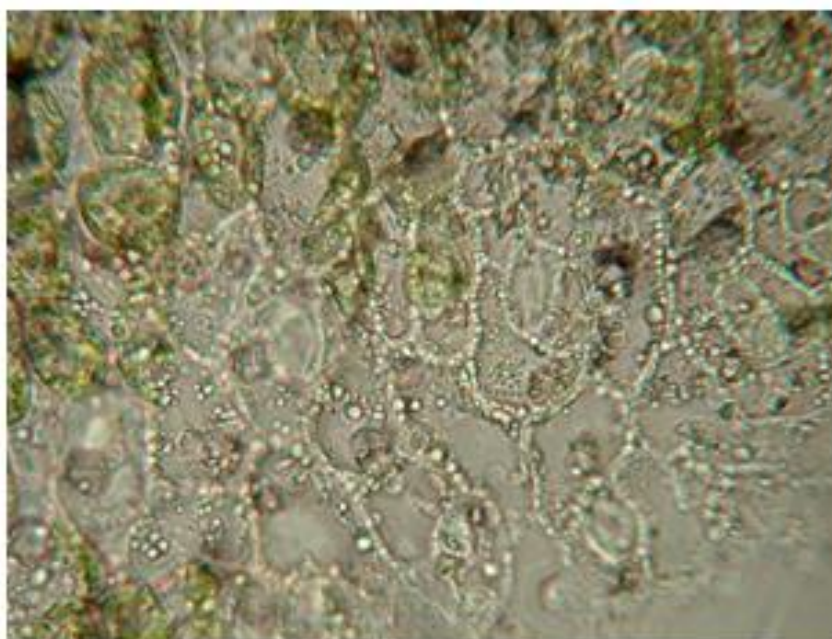


Figura 4

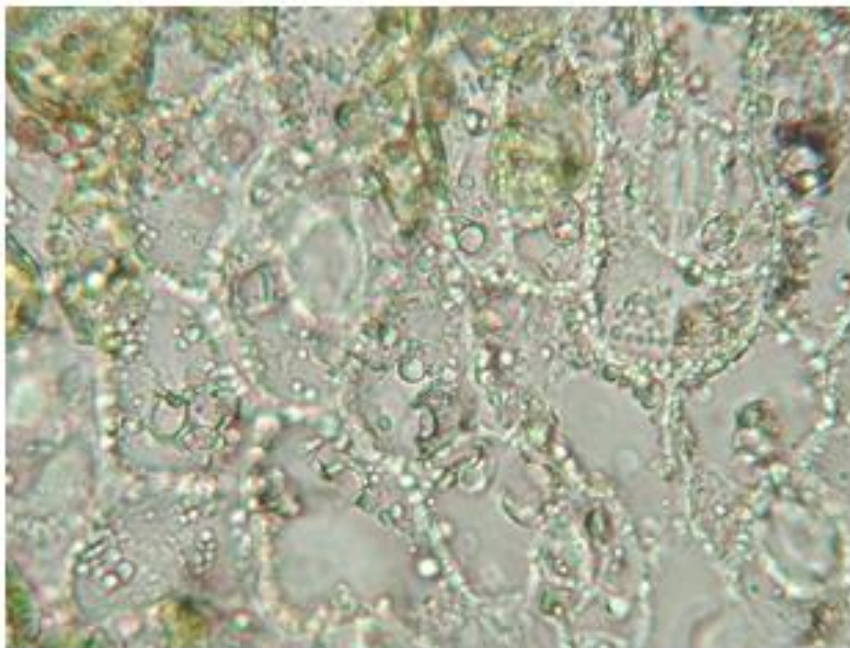


Figura 5

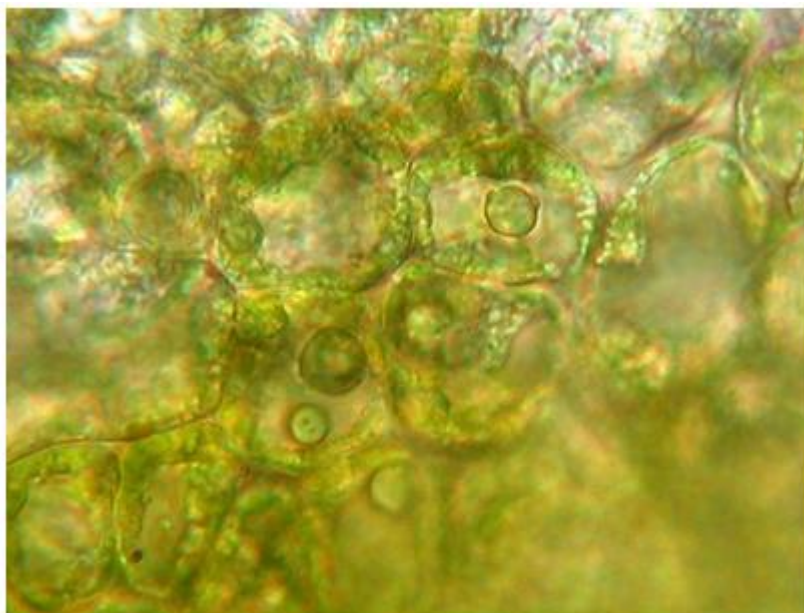


Figura 6