



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

Número do Processo: BR 10 2022 014386 2

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 4

**Nome ou Razão Social:** RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física

**CPF/CNPJ:** 80197094449

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** RUA MONÇÕES, S/N EDF MONT BLANC APT 1406

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65075-092

**País:** Brasil

**Telefone:** 9892135500

**Fax:**

**Email:** ritamend30@gmail.com

**Depositante 2 de 4**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE CEUMA – UNICEUMA

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 23689763000359

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Associação com intuito não econômico

**Endereço:** Rua Josué Montello, nº 01, Bairro Renascença II

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65075-120

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** ritamend30@gmail.com

**Depositante 3 de 4**

**Nome ou Razão Social:** ERIMA JSSIELLY MENDONÇA CASTRO

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física

**CPF/CNPJ:** 05423786398

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua do Campo, N 01B, vila 25 de maio, Recanto dos Vinhais,

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65070-212

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** erima.castro@hotmail.com

**Nome ou Razão Social:** EDELVIO DE BARROS GOMES

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Física

**CPF/CNPJ:** 59113863487

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Rua Solto Dalva 2-134 Barbalho

**Cidade:** Salvador

**Estado:** BA

**CEP:** 40301-065

**País:** BRASIL

**Telefone:** (79) 991 278212

**Fax:**

**Email:** edelviogomes@gmail.com

#### Dados do Pedido

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO A PERTIR DO CULTIVO DE *Serratia marcescens* EM MEIO DE BAIXO CUSTO

**Resumo:** A presente invenção refere-se ao processo de produção de compostos produzidos pela bactéria *Serratia marcescens*, isolada de sedimento de manguezal, para ser utilizado como controlador biológicos de pragas de lavouras. O processo foi realizado com a utilização de Caldo Natural Batata Dextrose, um meio de cultivo barato e eficaz, feito com aproveitamento da casca da batata que permitiu o crescimento da bactéria e secreção do composto no meio possibilitando a extração e utilização frente aos patógenos agrícolas. O processo foi escalonado e observou-se que os microrganismos se mantiveram estável em todos os volumes úteis utilizados no processo.

**Figura a publicar:** 4

## Dados do Inventor (72)

---

### Inventor 1 de 10

**Nome:** RITA DE CÁSSIA MENDONÇA DE MIRANDA

**CPF:** 80197094449

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** RUA MONÇÕES, S/N EDF MONT BLANC APT 1406

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65075-092

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 992 135500

**Fax:**

**Email:** ritamend30@gmail.com

### Inventor 2 de 10

**Nome:** ERIMA JSSIELLY MENDONÇA CASTRO

**CPF:** 05423786398

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua do Campo, N 01B, vila 25 de maio, Recanto dos Vinhais,

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65070-212

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** erima.castro@hotmail.com

### Inventor 3 de 10

**Nome:** ERIKA ALVES DA FONSECA AMORIM

**CPF:** 04762994464

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Av. monção s/n. Ed Bahrein, apt 1102. Renascenca

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65075-092

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** erikaramalho@yahoo.com.br

**Inventor 4 de 10**

**Nome:** FELÍCIA MARIA MELO ARAGÃO

**CPF:** 00092051367

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Engenheiro, arquiteto e afins

**Endereço:** Av Avenida José Sarney, 9, Vila Nova

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65063-689

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** felicitaaragao@gmail.com

**Inventor 5 de 10**

**Nome:** LÉO RUBEN LOPES DIAS

**CPF:** 03150056373

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua Barão de Itapary, 10

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65067-021

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** leorubendias@gmail.com

**Inventor 6 de 10**

**Nome:** WALLISON DE SOUSA CÂMARA

**CPF:** 61329310314

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Engenheiro, arquiteto e afins

**Endereço:** Rua 10, Quadra 37, N° 05, Conjunto São Raimundo

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65057-744

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** wallisonsouzacamara@gmail.com

**Inventor 7 de 10**

**Nome:** CARLOS DRIELSON DA SILVA PEREIRA

**CPF:** 61235501361

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Doutorando

**Endereço:** Rua do Campo, N 01B, vila 25 de maio, Recanto dos Vinhais,

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65070-212

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** drielsonn.sousa@gmail.com

**Inventor 8 de 10**

**Nome:** FABIO ANTONIO MORAIS SILVA

**CPF:** 22605835391

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Biólogo, biomédico e afins

**Endereço:** Rua Nordeste, Bairro Planalto Turu III

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65066-425

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** fabioamoraess@yahoo.com.br

**Inventor 9 de 10**

**Nome:** MARIA RAIMUNDA CHAGAS SILVA

**CPF:** 35457031349

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Rua 27 Qdra.39. Casa 30 Conjunto Maiobão

**Cidade:** Paço do Lumiar

**Estado:** MA

**CEP:** 65130-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 988 312627

**Fax:**

**Email:** marirah@gmail.com

**Inventor 10 de 10**

**Nome:** PAULO CESAR MENDES VILLIS

**CPF:** 67204406087

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Física:** Pesquisador

**Endereço:** Avenida Neiva Moreira Qd. 2, Grand Park Águas, Ondas, Apto. 603,  
Calhau

**Cidade:** São Luis

**Estado:** MA

**CEP:** 65071-383

**País:** BRASIL

**Telefone:** (98) 921 35500

**Fax:**

**Email:** paulo.villis@ceuma.br

#### Documentos anexados

---

<b>Tipo Anexo</b>	<b>Nome</b>
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio descritivo.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	comprovante pagamento.pdf
Desenho	Desenho.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.

# 1/1

## REINVIDICAÇÕES

**1 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”** caracterizado por compreender a utilização microrganismo como o produtor de compostos fruto de metabolismo secundários para ser utilizado em áreas agrícolas.

**2 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”**, método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** ser utilizado preferencialmente em áreas agrícolas que estejam contaminadas por fungos fitopatógenos.

**3 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”**, método de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** selecionar microrganismos que se mantém estáveis durante o escalonamento do processo produzindo e secretando o composto independente do volume útil utilizado.

**4 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”**, método de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado por** selecionar microrganismos que produz compostos bioativos.

**5 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”**, método de acordo com a reivindicação 1,2,3,4 **caracterizado por** selecionar microrganismos que produz compostos bioativos em todos os volumes testados aumentando o rendimento e a atividade frente aos patógenos testados.

**6 “Processo de produção de compostos para controla biológico a partir de cultivo de *Serratia marcescens* em meio de baixo custo”**, método de acordo com a reivindicação 1,2,3,4,5 **caracterizado por** propor um processo utilizando microrganismo que produz composto controlador biológico em meio de cultivo barato.

**“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO A PARTIR DO CULTIVO DE *Serratia marcescens* EM MEIO DE BAIXO CUSTO”**

A presente invenção refere-se ao processo de produção de compostos produzidos pela bactéria *Serratia marcescens*, isolada de sedimento de manguezal, para ser utilizado como controlador biológicos de pragas de lavouras. O processo foi realizado com a utilização de Caldo Natural Batata Dextrose, um meio de cultivo barato e eficaz, feito com aproveitamento da casca da batata que permitiu o crescimento da bactéria e secreção do composto no meio possibilitando a extração e utilização frente aos patógenos agrícolas. O processo foi escalonado e observou-se que os microrganismos se mantiveram estável em todos os volumes úteis utilizados no processo.

## **“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COMPOSTO PARA CONTROLE BIOLÓGICO A PERTIR DO CULTIVO DE *Serratia marcescens* EM MEIO DE BAIXO CUSTO”**

[01] A presente invenção consiste em um processo de obtenção do escalonamento do cultivo de *Serratia marcescens* em meio caldo natural de batata com aproveitamento de sua casca. A *Serratia marcescens* é uma bactéria gram negativa de formato bacilar pertencente a família Enterobacteriaceae. Foi obtida a partir do isolamento microbiano de sedimento de manguezal realizado no Mangue Seco, Raposa-MA.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[02] A bactéria obtida do isolamento microbiano é comumente cultivada em meio clássico para crescimento universal, Mueller Hinton (MH) e meio diferencial macConkey. No entanto, o meio natural feito com a batata proporcionou um aumento desejável no crescimento das colônias, pois é rico em açúcares, o que pode favorecer o crescimento de diversos grupos microbianos (PEREIRA; FORTES, 2003; DOS SANTOS, 2012).

[03] Formulações de meio de cultivo para selecionar aqueles mais promissores no controle biológico de pragas, têm sido desenvolvidas com vistas à produção de quitinases, antibióticos e muitos outros metabólitos. Tais meios, além de atuarem na otimização da produção desses metabólitos específicos, permitem o aumento da biomassa microbiana (NASCIMENTO, 2005).

[04] Algumas patentes de métodos de obtenção de bioativos produzidos por *Serratia marcescens* têm se destacado, como por exemplo a Patente PI 6926892, depositada em 09/08/2005 pela HVM Corporation, que descreve um método para proteção de plantas contra o ataque de patógenos oomicetos, cuja tratamento deriva de composições de *Serratia marcescens*. Portanto, trata de métodos que visam a proteção de plantas de patógenos de oomicetos através do tratamento da planta com uma quantidade eficaz de patógenos de um ou mais isolados de *Serratia marcescens* que apresentam atividade antioomiceto contra patógenos de plantas de oomicetos.

## **SOLUÇÃO DO PROBLEMA**

[05] Doenças de plantas provocam grandes perdas nas lavouras que mantém aquecida a economia agrícola. O controle de fitopatologias é uma estratégia que pode ser executada por diferentes formas, dentre as quais encontra-se o controle biológico que consiste na regulação de determinada população considerada como praga por agentes biológicos de mortalidade, denominados também inimigos naturais (MEDEIROS; SILVA; PASCHOLATI, 2018). Segundo Esteves (2018), partindo da perspectiva econômica, é observável que o uso indiscriminado de agroquímicos gera altos custos, o que sucinta a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de sistemas de controle biológico em escala industrial.

[06] Em se tratando da seleção de bactérias e fungos como agentes de controle biológico, há de se considerar além da seletividade do meio de cultivo, a atividade biológica do caldo fermentado ou de metabólitos isolados frente a larvas de insetos e linhagens de fungos fitopatogênicos (SANTOS, 2018).

[07] Diante de um dos maiores desafios da agricultura que trata-se do controle satisfatório e sustentável de fitopatógenos agrícolas. Tendo em vista a necessidade de busca por compostos bioativos e microrganismos que combatam fitopatógenos e se apresentem como biocontroladores promissores, a presente patente foi desenvolvida para o escalonamento do processo de bioprodução de metabólitos de *Serratia marcescens*, promissores no controle de organismos fitopatogênicos.

### **DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

[08] Para melhor compreensão da invenção, as figuras em anexos descrevem passos do processo, onde:

[09] A **Figura 1** apresenta a localização da área de coleta e coordenadas de onde fora isolada o microrganismo *Serratia marcescens*.

[10] A **Figura 2** mostra composição do Caldo Natural Bata Dextrose, salientando o aproveitamento da casca.

[11] A **Figura 3** demonstra as etapas de escalonamento, com os respectivos volumes úteis utilizados.

[12] A **Figura 4** apresenta o crescimento aumentado da biomassa microbiana após 15 dias de incubação em estufa de  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

[13] A **Figura 5** demonstra presença de halos de inibição frente a fungos fitopatogênicos.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

#### **[14] Isolamento e identificação microbiana**

[15] O isolamento microbiano proveniente de sedimento do Mangue Seco, Raposa-Ma cuja localização está descrito na Figura 1, foi realizado segundo metodologia preconizada por Clark (1965), onde 10g de solo são incorporados a 90ml de água destilada esterilizada submetidos à agitação vigorosa por 30 minutos, seguido da diluição seriada de 1:10 até 10:1000. Então, um volume de 0,1ml das diluições 10:100 e 10:1000 foram inoculados em meios de cultura seletivos Muller Hinton Ágar (MH) por técnica de espalhamento com auxílio da alça de Drigalski, seguido de incubação das placas a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por até 05 dias. Posteriormente, foi realizada a purificação das colônias para armazenamento sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$  até completa identificação. A identificação microbiana foi realizada por técnicas clássica (coloração de gram) e molecular, a partir da extração do DNA, e amplificação da cadeia polimerase (PCR).

**[16] Método de Preparação do Caldo Natural Batata Dextrose**

[17] O meio de crescimento para o cultivo e escalonamento bacteriano foi preparado com os seguintes constituintes: Batata inglesa incluindo sua casca, dextrose, extrato de levedura, água destilada estéril. A batata fora cozida em volume de água destilada satisfatória para total cozimento e, posteriormente, foi adicionada mais água destilada até completar o volume desejado descrito na Figura 2. Em seguida, foram adicionados os demais componentes do meio e após diluídos e homogeneizados, o meio foi acondicionado em três erlenmeyers distintos volumetricamente, obtendo respectivamente 50ml, 100ml e 250ml. Por conseguinte, foram autoclavados para então seguirem para etapa de inóculo da suspensão de *Serratia marcescens*.

[18] **Preparação do inóculo** - Em meio Ágar Batata Dextrose (BDA) foi semeada uma suspensão de *Serratia marcescens* usando a técnica de entapetamento que consiste no espalhamento completo e uniforme na placa contendo meio de cultura, com auxílio de swab umedecido na suspensão. Posteriormente ao entapetamento, a placa de petri seguiu para incubação a  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Após crescimento, foram retirados da placa blocos circulares com aproximadamente 6 mm de diâmetro, para etapa de inoculação nos três diferentes volumes de Caldo Natural Batata Dextrose, sendo eles 50ml, 100ml, 250ml conforme Figura 3.

[19] **Etapa 1: Inóculo em 50ml de Caldo Natural Batata Dextrose** - Para essa quantidade foi utilizado erlenmeyer com capacidade volumétrica de 250ml. No entanto, é importante salientar que para garantir o *headspace* (espaço para aeração do microrganismo), o volume útil a ser usado deve ser 1/5 do seu volume total. Ou seja, 1/5 de 250ml equivale a 50 ml de volume útil para esta primeira etapa de inóculo. Logo, foram retirados 5 blocos circulares da placa com entapetamento e inoculados na vidraria contendo 50ml do caldo, incubado em seguida em estufa de  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 dias.

[20] **Etapa 2: Inóculo em 100ml de Caldo Natural Batata Dextrose** - Para essa quantidade, por suavidade, foi utilizado erlenmeyer com capacidade volumétrica de 500ml. Visando garantir o *headspace* (espaço para aeração do microrganismo), o volume útil utilizado (1/5 de 500ml) corresponde a 100ml para a segunda etapa de inoculação. Novamente foram retirados 5 blocos circulares da placa com entapetamento e inoculados na vidraria contendo 50ml do caldo, que também foi incubado em estufa de  $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 15 dias.

[21] **Etapa 3: Inóculo em 250ml de Caldo Natural Batata Dextrose -**

Por fim, para essa quantidade foi usado erlenmeyer com capacidade volumétrica de 1000ml. Garantindo o *headspace* (espaço para aeração do microrganismo), o volume útil utilizado (1/5 de 1000ml) foi de 250ml para esta última etapa de inoculação. Igualmente as etapas anteriores, também foram retirados 5 blocos circulares de aproximadamente 6 mm de diâmetro da placa contendo o entapetamento, e foram inoculados nos 250ml do caldo, que posteriormente foi acondicionado em estufa de 28°C, também por 15 dias. O aumento da biomassa nos diferentes volumes do escalonamento é observada na Figura 4.

[22] **Atividade biológica frente a patógenos agrícolas: Ensaio em meio líquido** - Preconizado por Bauer et al. (1966), o teste de difusão em ágar foi realizado para constatar a capacidade do microrganismo promissor (*Serratia marcescens*) de secretar metabólitos para o meio externo. O teste de difusão em ágar é estabelecido como padrão pelo CLSI (2011) - Clinical and Laboratory Standards Institute método cujo consiste na aplicação de 50µl do mosto fermentado (Caldo contendo a biomassa microbiana da *Serratia marcescens*) em poços de aproximadamente 6mm de diâmetro no ágar contido em placa de petri previamente semeado com os fitopatógenos, sendo posteriormente, incubadas a 30°C por até 72h. Após esse período, os halos de inibição foram observados e medidos com o auxílio de um paquímetro, como descrito na Figura 5. Esse teste foi realizado com os três valores volumétricos do escalonamento (50ml, 250ml, 500ml), em triplicata cada um.

[23] Diante da descrição do processo, é importante reassaltar a ausência de registros na literatura que abrange o cultivo da bactéria gram negativa *Serratia marcescens* em Caldo Natural Batata Dextrose ainda com inclusão do aproveitamento da casca, que de maneira eficaz possibilitou condições nutritivas favoráveis ao aumento da biomassa microbiana e conseqüentemente, de metabólitos secundários dotados de potencial biocontrolador de fitopatologias, visto que, são capazes de inibir patógenos agrícolas. Portanto, com características promissoras descritas em literatura, a maximização da biomassa microbiana de *Serratia marcescens* torna propícia a otimização para obtenção de produtos biotivos que podem ser implementados no controle biológico de organismos fitopatogênicos.

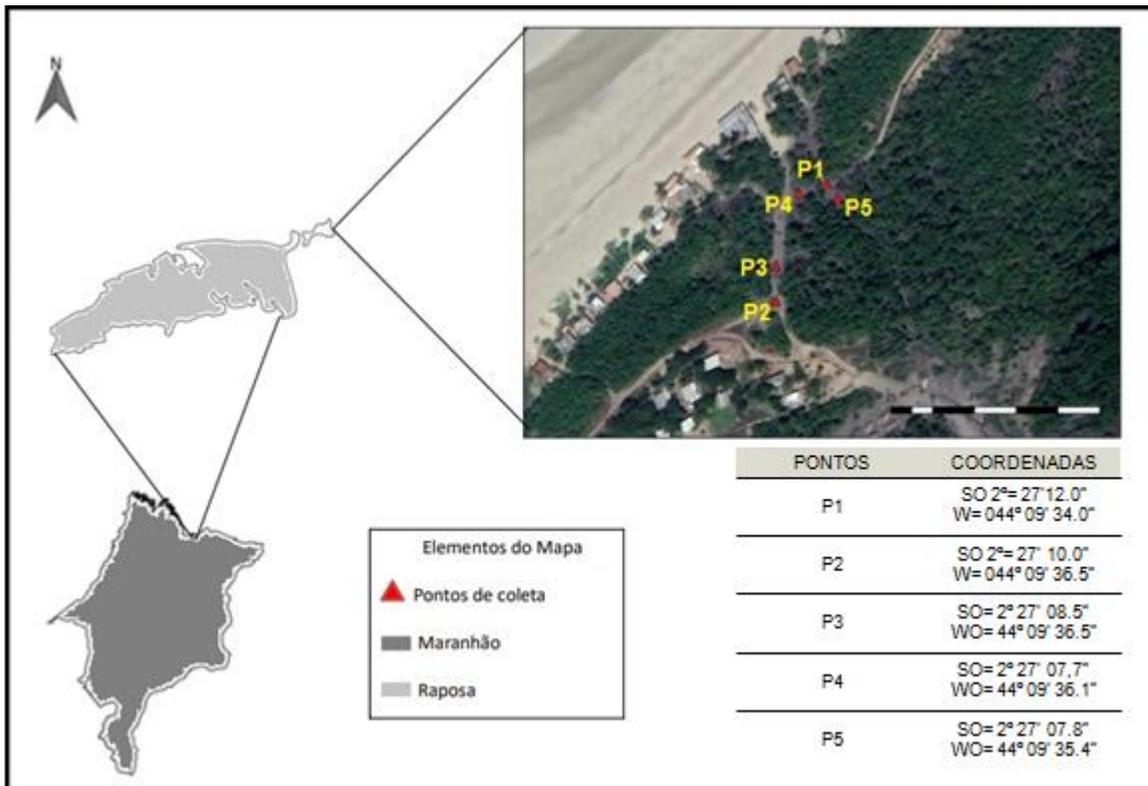


Fig. 1

CALDO NATURAL BATATA DEXTROSE COM CASCA	
Componentes	quantidade
Batata com casca	171 g
Dextrose	17,1 g
Extrato de levedura	0,6 g
Água destilada estéril	850 ml

Fig. 2

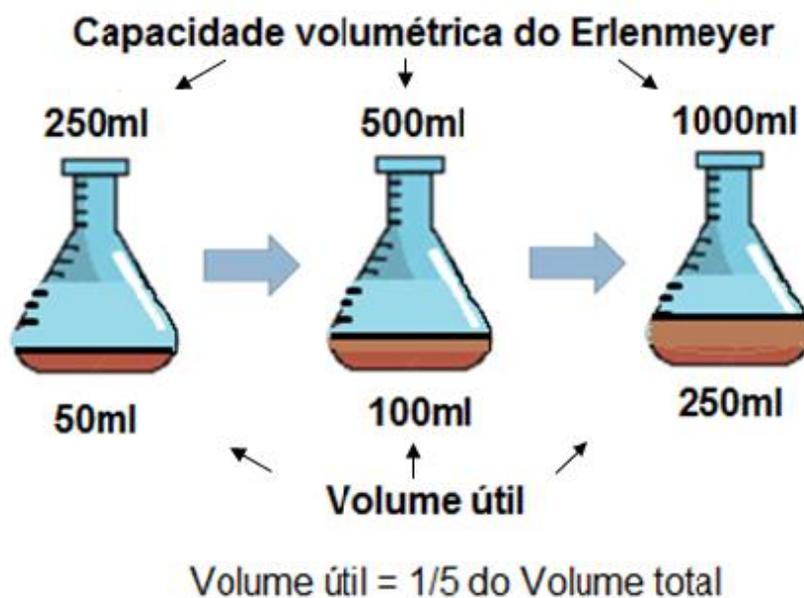


Fig. 3



Fig. 4

<u>Fitopatógenos</u>	<u>Fitopatologia</u>	<u>halo (mm)</u>
<u><i>Fusarium solani</i></u>	podridão radicular seca	15±1,0
<u><i>Fusarium oxysporum</i></u>	murcha de <u><i>fusarium</i></u>	20,6±1,1
<u><i>Macrophomina phaseolina</i></u>	podridão cinzenta da haste	20±1,0
<u><i>Rhizoctonia solani</i></u>	podridão radicular	27,6±2,5
<u><i>Sclerotium rolfsii</i></u>	murcha de esclerócio	15±1,0

Fig. 5

Data de Vencimento:

**18/08/2022**

Pagamento:

**20/07/2022**

Banco:

**Bco Do Brasil S A**

Valor nominal:

**R\$ 70,00**

Encargos:

**R\$ 0,00**

Descontos:

**R\$ 0,00**

Valor Pago:

**R\$ 70,00**

Nome do Beneficiário:

**Instituto Nacional Da Propriedade Industrial .  
Inp**

Documento do Beneficiário:

**042521088000137**

Nome do pagador final:

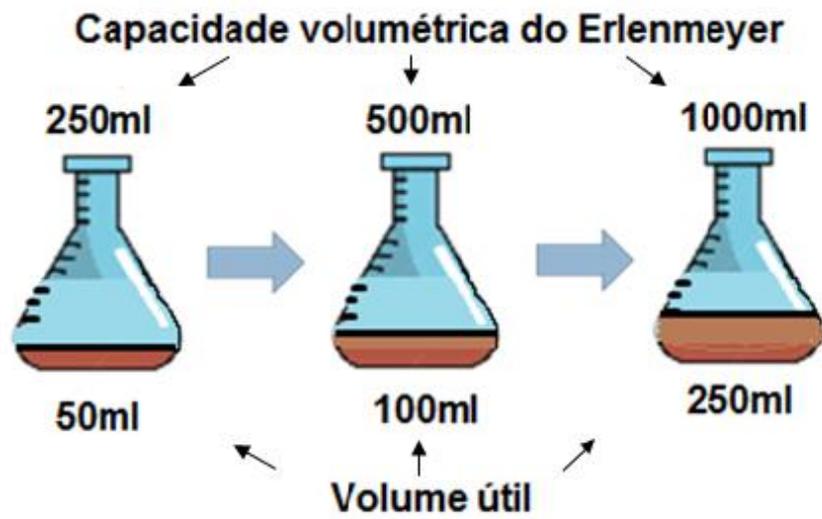
**Rita De Cassia Mendonca De Miranda**

Documento do pagador final:

**801.970.944-49**

Petição 870220064005, de 20/07/2022, pág. 21/22

Data da transação:



Volume útil =  $\frac{1}{5}$  do Volume total