



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

Número do Processo: BR 10 2019 006621 0

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): MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS

Resumo: A presente invenção descreve um método de purificação de enzima lipase, produzida pela cepa selvagem de Burkholderia lata LBBIO-BL02. Diferentemente das invenções apresentadas, permite produzir uma lipase purificada através de um protocolo que compreende um único passo em que a lipase é deixada em contato com a DEAE-Celulose para ligação seletiva e posterior recuperação da enzima pura. A purificação em etapa única da lipase produzida pela bactéria ocorre através da adição da matriz de celulose a um extrato enzimático com tampão do sistema. O método de lavagem é seguido de centrifugação e recuperação da matriz de celulose e a enzima. Os ensaios realizados com 3 lipases microbianas distintas produzidas por Burkholderia lata LBBIO-BL02, Fusarium sp. (GFC) e Botryosphaeria ribis demonstraram rendimentos superiores a 45% e banda única em eletroforese SDS-PAGE. Desta maneira, a purificação simples apresentada neste método, com relativamente alta recuperação, é promissora para a aplicação em larga escala para purificação de lipases com custo reduzido.

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Renan Padron Almeida

Numero OAB:

Numero API:

CPF/CNPJ: 33778301896

Endereço: Rua Joaquim Antunes 819

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 05415012

Telefone: 1156270570

Fax:

Email: renan.padron@unesp.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: BRUNO HENRIQUE DE OLIVEIRA

CPF: 33410689885

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100.

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 2

Nome: VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO

CPF: 17989866803

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Cidade: Assis

Estado: SP

CEP: 19806-900

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 25 29409161812632010.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU 25 632010.pdf
Procuração	Procuração.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf
Reivindicação	Reivindicações.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.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002549-6

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio:	0033-0239-004900019792	Conta de Débito:	0239-000430023105
Tipo de Pagamento:	BLQ Outros		
Código de Barras:	00190000090294091618812632010174877520000007000		
No. compromisso banco:	1029377000300023	No. compromisso cliente:	632010/DS1 101009853
Instituição Financeira Favorecida:	001 - BANCO DO BRASIL S.A.		
Nome/Razão Social do Beneficiário Original:	INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST		
CPF/CNPJ do Beneficiário Original:	42.521.088/0001-37		
Nome/Razão Social do Pagador Original:	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE		
CPF/CNPJ do Pagador Original:	48.031.918/0001-24		
Nome/Razão Social do Pagador Efetivo:	FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENT		
CPF/CNPJ do Pagador Efetivo:	57.394.652/0001-75		
Valor Nominal:	70,00		
Desc./Abat.:	0,00	Juros:	0,00
Data de Vencimento:	28/12/2018		
Data de Pagamento:	19/12/2018		
Situação:	Efetivado		
No. Lista de Débito:		No. Protocolo:	PGTFORNB19122018900134724
Autenticação:	11CBC4E312016310E5EBBA3		

Valor a Pagar: 70,00

retornar

Central de Atendimento
Santander Empresarial

4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
0800 726 2125 (Demais Localidades)

SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322

imprimir

Termo de Posse e Compromisso do Professor Doutor Sandro Roberto Valentini como Reitor da UNESP

Quis dezasseis dias do mês de janeiro de dois mil e dezessete, às catorze horas e trinta minutos, no Teatro Santander, São Paulo, em sessão pública e solene do Conselho Universitário, o Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, por este ato, toma posse na função de Reitor da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com mandato de quatro anos, a contar de 15 de janeiro de 2017, conforme Decreto de nomeação de 28.11.2016, do excelentíssimo senhor Geraldo Alckmin, Governador do Estado de São Paulo, publicado no Diário Oficial do Estado de 29 de novembro de 2016 e retificado conforme publicação de 22 de dezembro de 2016. Na oportunidade, o empossado assume o compromisso de cumprir e fazer cumprir o Estatuto, o Regimento Geral e a legislação da UNESP, bem como as leis maiores do ensino no país. Para constar, foi elaborado o presente termo, assinado pelo Professor Doutor Julio Cezar Durigan, magnífico Reitor da UNESP, e pelo Professor Doutor Sandro Roberto Valentini, ora empossado. São Paulo, 16 de janeiro de 2017.

[Handwritten signatures and initials]

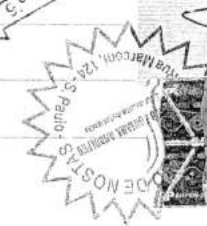
9.º TFE
9.º TFE
9.º TFE

9.º TABELIÃO DE NOTAS

Rua Marconi, 124 - 1º no 6º andar - CEP 01047-000 - São Paulo
Telefone: (11) 3259-2611 - Fax: (11) 2174-6858
www.nonoartorio.com.br

Reconheço as 3 firmas sem valor econômico por semelhança de JULIO CEZAR DURIGAN, SANDRO ROBERTO VALENTINI, MARIA DALVA SILVA PAGOTTO, do que dou fé.

Em tes. da verdade. GUSTAVO FONTANA ANDOLPHO -
São Paulo/Capital, 16 de janeiro de 2017. Valor recebido R\$ 17,10
Válido somente com selo de autenticidade. Selos pagos por verba.



S. Paulo, 06 MAR 2017



do Norte: Rua Rui Barbosa: 1.213,18 m² de reapecamento, no trecho entre as Ruas Luiz Gonzaga e R. de Janeiro; Rua Luiz Gonzaga: 868,50 m² de reapecamento, no trecho entre as Ruas Rui Barbosa e Bernardino Pinto.

PARÁGRAFO ÚNICO: Inalterado.

CLÁUSULA SEGUNDA: A Cláusula Terceira, que trata das Obrigações dos Partícipes, passa a ter a seguinte redação: Para a execução do presente Convênio o ESTADO e o MUNICÍPIO terão as seguintes obrigações:

I - COMPETE AO ESTADO:

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

i) Inalterada;

j) Inalterada;

k) Inalterada;

l) Inalterada;

m) Inalterada;

n) Inalterada;

o) Inalterada;

p) Inalterada;

q) Inalterada;

r) Inalterada;

s) Inalterada;

t) Inalterada;

u) Inalterada;

v) Inalterada;

w) Inalterada;

x) Inalterada;

y) Inalterada;

z) Inalterada;

aa) Inalterada;

ab) Inalterada;

ac) Inalterada;

ad) Inalterada;

ae) Inalterada;

af) Inalterada;

ag) Inalterada;

ah) Inalterada;

ai) Inalterada;

aj) Inalterada;

ak) Inalterada;

al) Inalterada;

am) Inalterada;

an) Inalterada;

ao) Inalterada;

ap) Inalterada;

aq) Inalterada;

ar) Inalterada;

as) Inalterada;

at) Inalterada;

au) Inalterada;

av) Inalterada;

aw) Inalterada;

ax) Inalterada;

ay) Inalterada;

az) Inalterada;

ba) Inalterada;

bb) Inalterada;

bc) Inalterada;

bd) Inalterada;

be) Inalterada;

bf) Inalterada;

bg) Inalterada;

bh) Inalterada;

bi) Inalterada;

bj) Inalterada;

bk) Inalterada;

bl) Inalterada;

bm) Inalterada;

bn) Inalterada;

bo) Inalterada;

bp) Inalterada;

bq) Inalterada;

br) Inalterada;

bs) Inalterada;

bt) Inalterada;

bu) Inalterada;

bv) Inalterada;

bw) Inalterada;

bx) Inalterada;

by) Inalterada;

bz) Inalterada;

ca) Inalterada;

cb) Inalterada;

cc) Inalterada;

cd) Inalterada;

ce) Inalterada;

cf) Inalterada;

cg) Inalterada;

ch) Inalterada;

ci) Inalterada;

cj) Inalterada;

ck) Inalterada;

cl) Inalterada;

cm) Inalterada;

cn) Inalterada;

co) Inalterada;

cp) Inalterada;

cq) Inalterada;

cr) Inalterada;

cs) Inalterada;

ct) Inalterada;

cu) Inalterada;

cv) Inalterada;

cw) Inalterada;

cx) Inalterada;

cy) Inalterada;

cz) Inalterada;

da) Inalterada;

db) Inalterada;

dc) Inalterada;

dd) Inalterada;

de) Inalterada;

df) Inalterada;

dg) Inalterada;

dh) Inalterada;

di) Inalterada;

dj) Inalterada;

dk) Inalterada;

dl) Inalterada;

dm) Inalterada;

dn) Inalterada;

do) Inalterada;

dp) Inalterada;

dq) Inalterada;

dr) Inalterada;

ds) Inalterada;

dt) Inalterada;

du) Inalterada;

dv) Inalterada;

dw) Inalterada;

dx) Inalterada;

dy) Inalterada;

dz) Inalterada;

ea) Inalterada;

eb) Inalterada;

ec) Inalterada;

ed) Inalterada;

ee) Inalterada;

ef) Inalterada;

eg) Inalterada;

eh) Inalterada;

ei) Inalterada;

ej) Inalterada;

ek) Inalterada;

el) Inalterada;

em) Inalterada;

en) Inalterada;

eo) Inalterada;

ep) Inalterada;

eq) Inalterada;

er) Inalterada;

es) Inalterada;

a) Inalterada;

b) Inalterada;

c) Inalterada;

d) Inalterada;

e) Inalterada;

f) Inalterada;

g) Inalterada;

h) Inalterada;

i) Inalterada;

j) Inalterada;

k) Inalterada;

l) Inalterada;

m) Inalterada;

n) Inalterada;

o) Inalterada;

p) Inalterada;

q) Inalterada;

r) Inalterada;

s) Inalterada;

t) Inalterada;

u) Inalterada;

v) Inalterada;

w) Inalterada;

x) Inalterada;

y) Inalterada;

z) Inalterada;

aa) Inalterada;

ab) Inalterada;

ac) Inalterada;

ad) Inalterada;

ae) Inalterada;

af) Inalterada;

ag) Inalterada;

ah) Inalterada;

ai) Inalterada;

aj) Inalterada;

ak) Inalterada;

al) Inalterada;

am) Inalterada;

an) Inalterada;

ao) Inalterada;

ap) Inalterada;

aq) Inalterada;

ar) Inalterada;

as) Inalterada;

at) Inalterada;

au) Inalterada;

av) Inalterada;

aw) Inalterada;

ax) Inalterada;

ay) Inalterada;

az) Inalterada;

ba) Inalterada;

bb) Inalterada;

bc) Inalterada;

bd) Inalterada;

be) Inalterada;

bf) Inalterada;

bg) Inalterada;

bh) Inalterada;

bi) Inalterada;

bj) Inalterada;

bk) Inalterada;

bl) Inalterada;

bm) Inalterada;

bn) Inalterada;

bo) Inalterada;

bp) Inalterada;

bq) Inalterada;

br) Inalterada;

bs) Inalterada;

bt) Inalterada;

bu) Inalterada;

bv) Inalterada;

bw) Inalterada;

bx) Inalterada;

by) Inalterada;

bz) Inalterada;

ca) Inalterada;

cb) Inalterada;

cc) Inalterada;

cd) Inalterada;

ce) Inalterada;

cf) Inalterada;

cg) Inalterada;

ch) Inalterada;

ci) Inalterada;

cj) Inalterada;

ck) Inalterada;

cl) Inalterada;

cm) Inalterada;

cn) Inalterada;

co) Inalterada;

cp) Inalterada;

cq) Inalterada;

cr) Inalterada;

cs) Inalterada;

ct) Inalterada;

cu) Inalterada;

cv) Inalterada;

cw) Inalterada;

cx) Inalterada;

cy) Inalterada;

cz) Inalterada;

da) Inalterada;

db) Inalterada;

dc) Inalterada;

dd) Inalterada;

de) Inalterada;

df) Inalterada;

dg) Inalterada;

dh) Inalterada;

di) Inalterada;

dj) Inalterada;

dk) Inalterada;

dl) Inalterada;

dm) Inalterada;

dn) Inalterada;

do) Inalterada;

dp) Inalterada;

dq) Inalterada;

dr) Inalterada;

ds) Inalterada;

dt) Inalterada;

du) Inalterada;

dv) Inalterada;

dw) Inalterada;

dx) Inalterada;

dy) Inalterada;

dz) Inalterada;

ea) Inalterada;

eb) Inalterada;

ec) Inalterada;

ed) Inalterada;

ee) Inalterada;

ef) Inalterada;

eg) Inalterada;

eh) Inalterada;

ei) Inalterada;

ej) Inalterada;

ek) Inalterada;

Ofício nº 203/2018 AUIN

São Paulo, 16 de julho de 2018.

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini
Reitor
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

Assunto: Designação de procurador junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI

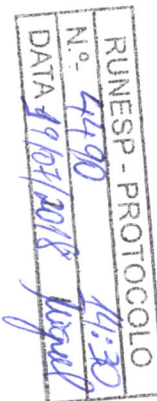
Ilustríssimo Senhor Reitor,

1. A Agência Unesp de Inovação – AUIN, por meio de sua Gerência de Propriedade Intelectual, realiza junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e outras instituições competentes o requerimento e acompanhamento dos direitos de propriedade intelectual de invenções de titularidade da UNESP.
2. Para tal, faz-se necessária a outorga dos poderes da UNESP, como titular dos direitos de propriedade intelectual de suas invenções, para um procurador que a represente legalmente junto ao INPI.
3. Isto posto, vimos por meio deste solicitar a designação do Gerente de Propriedade Intelectual, Renan Padron Almeida, como procurador da UNESP junto ao INPI, mediante assinatura da Procuração anexa a este ofício.
4. Sem mais para o momento, aproveitamos a oportunidade para manifestar a Vossa Senhoria protestos de consideração e apreço.

Respeitosamente,


Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti
Diretor Executivo
Agência Unesp de Inovação

Agência UNESP de Inovação
Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro
CEP: 01049-010, São Paulo - Estado de São Paulo - Brasil
Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br



PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento,

a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01.049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ/MF sob nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente UNESP, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, ou quem legalmente o substitua,

nomeia e constitui seu procurador, **RENAN PADRON ALMEIDA**, brasileiro, portador do RG nº 43.746.608-5, SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 337.783.018/96,

outorgando-lhe poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Intelectual – INPI e outras instituições competentes, 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 cópias, termos de cessão de direitos, termos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade intelectual, 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 sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou de 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.

São Paulo, 16 de julho de 2018.

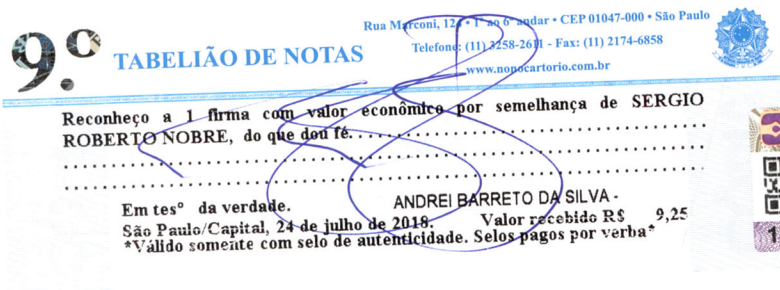


UNESP

pl Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini

Reitor

SERGIO ROBERTO NOBRE
VICE-REITOR NO EXERCÍCIO DA REITORIA



Agência UNESP de Inovação

Rua Quirino de Andrade, 215 – 9º andar - Centro

CEP: 01049-010, São Paulo/SP - Brasil

Fone: +55 11 5627 0696 - e-mail: auin@unesp.br

MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se insere no campo das ciências biológicas, mais precisamente na área de Alimentos e Biotecnologia, e descreve um método de purificação de enzima lipase, produzida pela cepa selvagem de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, utilizando DEAE-Celulose em uma etapa única, permitindo produzir uma lipase purificada com um teor reduzido de impurezas, utilizando-se de técnica simples, mais rápida e de custo reduzido.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] Com o constante desenvolvimento de novas técnicas, diminuição dos custos e o crescimento da biotecnologia de biocatalisadores enzimáticos, os catalisadores químicos vêm sendo substituídos em um grau significativo. Fatores como alta seletividade, especificidade, capacidade de agir em condições brandas e efeito residual nulo fazem com que as enzimas sejam cada vez mais procuradas como catalisadores para uma infinidade de reações. A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para síntese de compostos de alto valor agregado. Em países mais desenvolvidos, os projetos nesta área estão normalmente entre os prioritários e englobam grupos de pesquisa com alto potencial de produção de conhecimento e geração de tecnologias de ponta.

[003] Lipases são biocatalisadores de muita importância em diferentes áreas, desta forma o mercado global dessas enzimas está projetado para alcançar US\$ 590,5 milhões em 2020, um crescimento de 6,5% em 5 anos. Apesar do

crescimento da procura mundial por enzimas, apenas cerca de 200 de 4000 tipos de enzimas estão disponíveis comercialmente no mercado global. Destas 200 enzimas, apenas cerca de 20 tipos são produzidos em massa, dentre estas as lipases.

[004] As lipases (E.C.3.1.1.3) têm sido definidas como carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa, ou seja, com cadeia acila constituída por mais de 10 átomos de carbono. Enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar apenas acilgliceróis de cadeia com menos de 10 carbonos são denominadas genericamente como esterases. A maioria das lipases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro. Dependendo das condições, as lipases também catalisam reações de síntese, como de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóolise e acidólise), aminólise (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular).

[005] Apesar de todas as vantagens citadas sobre a utilização de lipases em comparação com métodos químicos, ainda existem problemas e desafios a serem resolvidos no desenvolvimento de métodos de aplicações destas enzimas, principalmente do ponto de vista econômico, pois o custo de produção e de purificação das enzimas (quando requerida) torna os métodos enzimáticos mais caros do que os métodos químicos convencionais.

[006] A recuperação de lipases a partir do meio de produção envolve, rotineiramente, um primeiro passo de ultrafiltração e/ou precipitação com sulfato de amônio, seguido por purificação até a homogeneidade em colunas cromatográficas de troca iônica, utilizando geralmente

Dietilaminoetil (DEAE) como trocador aniônico e Carboximetil (CM) como trocador catiônico, ou ainda grupos trocadores fortes como trietilaminoetil, em colunas Mono Q ou Q-Sepharose, e de filtração em gel. A cromatografia de interação hidrofóbica (CIH) também está presente na maioria dos protocolos de purificação, sendo utilizadas colunas com agarose com grupos octila ou fenila. Algumas alternativas, como a extração aquosa em duas fases e extração por micelas reversas têm sido utilizados para a recuperação da enzima. De modo geral, para purificar lipases microbianas, alcançando em média rendimentos de 30% e fatores de purificação em torno de 320 vezes, de 4 a 5 passos de purificação são necessários.

[007] Os métodos de purificação de lipases são dependentes do microrganismo produtor, dos meios e condições de cultivo e das características da enzima. Como resultado desta diversidade, não há métodos de purificação de aplicação geral. Assim sendo, enzimas produzidas por cepas diferentes do mesmo microrganismo podem apresentar propriedades distintas. Consequentemente, a definição das operações de um método de purificação depende do uso da molécula alvo e também de suas características físico-químicas e do tipo de impurezas presentes, sendo obrigatório o estudo de técnicas de purificação individualizadas para cada lipase.

[008] Desta maneira, o método geral de purificação de proteínas pode ter, mesmo na melhor das hipóteses, um impacto econômico negativo no custo final do biocatalisador. O método de downstream de lipases, ou seja, a bioseparação e a recuperação do produto final, pode ser responsável por até 80% dos custos totais de produção. Dessa forma, muitos

métodos tradicionais não são mais usados devido ao seu custo elevado, de vida curta e efeitos indesejáveis ao ambiente.

[009] A fim de estabelecer um método biotecnológico competitivo para a purificação de enzimas, alguns grupos de pesquisa buscam desenvolver metodologias não convencionais de separação de biomoléculas, como a utilização de micelas reversas, separação em duas fases utilizando polietilenoglicol e sais, imunopurificação, utilização de polieletrólitos e a sua capacidade para formar complexos não-solúveis com proteínas, imobilização e ressuspensão controladas, entre outros. A busca por novas técnicas de bioseparação é um método contínuo e na maioria das vezes individualizado, buscando sempre a melhor eficiência, com altas recuperações e baixo custo.

[010] Como o método de purificação é sofisticado e de extrema complexidade, o custo desta etapa pode representar até 80% do custo do produto final. Desta forma, com o intuito de criar um método simples, rápido e com custo bastante reduzido, desenvolveu-se o presente método de etapa única que utiliza DEAE-Celulose como matriz para adsorção seletiva e isopropanol para remoção da proteína de interesse já purificada.

ESTADO DA TÉCNICA

[011] Existem no estado da técnica, alguns trabalhos descrevendo método envolvendo lipases, por exemplo:

[012] O documento intitulado "*One kind of Burkholderia cepacia lipase immobilized preparation method thereof*" descreve um método envolvendo lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia*, assim como a

presente invenção. Entretanto, tal documento trata-se de método de imobilização que utiliza como matriz nanotubos de carbono, enquanto a presente invenção foca no método de purificação e utiliza como matriz DEAE-Celulose. Esta diferença já caracteriza uma dicotomia nos objetivos das tecnologias. Além disso, a lipase também é produzida por espécies diferentes, ou seja, *Burkholderia cepacia* e não *Burkholderia lata*.

[013] O documento intitulado "*Lipase production method*" descreve um método de produção de uma enzima protease utilizando uma lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia*, enquanto que a presente invenção propõe um método de purificação de uma enzima lipase.

[014] O documento intitulado "*Enzymatic production of fatty acid ethyl esters*" consiste em um método de obtenção de ácidos graxos livres, utilizando-se de uma lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia* e de celulose, entre outros oito suportes, para a imobilização da enzima. No entanto, o referido documento descreve um método de aplicação da enzima e obtenção de ácidos graxos livres, e não a purificação de uma enzima lipase. Além disso, o referido documento descreve o uso de celulose como um suporte poroso para a imobilização da enzima e posterior aplicação, enquanto a presente invenção utiliza-se da DEAE-Celulose para ligação seletiva de proteínas e posterior obtenção da enzima pura.

[015] O documento intitulado "*Lipolytic activity of suspended and membrane immobilized lipase originating from indigenous Burkholderia sp 20*" descreve um método de imobilização de enzima em uma membrana de nitrato de celulose

utilizando-se de uma lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia* e de uma matriz de celulose para a imobilização da enzima. Em contrapartida, a presente invenção difere de tal documento por tratar-se de um método de purificação da enzima em matriz de DEAE-Celulose.

[016] O documento intitulado *"Purification and characterization of a novel cold-adapted lipase from Burkholderia anthina NT15"* descreve um método de purificação de uma lipase e utiliza-se de uma lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia*. Enquanto tal documento foca em um método de purificação de uma lipase produzida pela cepa *Burkholderia anthina* NT15, a presente invenção foca no método de purificação de lipase produzida pela cepa *Burkholderia lata*. Adicionalmente, o referido documento descreve um método de purificação compreendendo três etapas, isto é, polietileno glicol PEG1000/fosfato de potássio em sistema de separação de fases; coluna de DEAE-Celulose-32 em cromatografia clássica de separação iônica; e coluna de Sephadex G100 em cromatografia clássica de separação por tamanho molecular. Verifica-se que após tais etapas, a lipase foi purificada com 41,3% de recuperação. Em contrapartida, a presente invenção descreve um método não convencional e não utiliza métodos clássicos de cromatografia em coluna, utilizando-se de ligação seletiva de enzima/proteína em matriz de DEAE-Celulose em suspensão, não em coluna, em etapa única para obtenção de uma lipase 100% pura e com 55% de recuperação. Embora as duas tecnologias utilizem lipase e DEAE-Celulose, o protocolo e a aplicação da matriz é completamente diferente, gerando um método inovador, simples com apenas uma etapa, de baixo custo

e maior rendimento em comparação com a tecnologia proposta em tal documento.

[017] O documento intitulado "*Immobilized lipase catalyzed synthesis of n-amyl acetate: parameter optimization, heterogeneous kinetics, continuous flow operation and reactor modeling*" descreve um método de aplicação de lipase produzida por uma cepa bacteriana do gênero *Burkholderia* e obtenção de n-amil acetato a partir de n-amil álcool. A referida tecnologia imobiliza a enzima em suporte hidroximetil-propil-celulose (HMP-Celulose), de alto custo, e álcool polivinílico. Assim, tal documento difere da presente invenção, que consiste de um método não convencional de purificação da enzima em matriz de DEAE-Celulose em suspensão.

[018] Assim, a presente invenção proporciona, de maneira inesperada, um método de purificação que é capaz de entregar uma enzima altamente purificada, de forma simples, em tempo hábil e a baixo custo.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[019] A presente invenção tem por objetivo propor um método para purificação da enzima lipase, produzida pela cepa selvagem de *Burkholderia lata*. Adicionalmente, este protocolo descreve um método que compreende um único passo em que a lipase é deixada em contato com DEAE-Celulose para ligação seletiva e posterior recuperação da enzima pura. Este método permite produzir uma lipase com teor reduzido de impurezas, utilizando-se de técnica simples, mais rápida e de custo reduzido. Ainda, foi desenvolvido este protocolo para ligação seletiva da enzima na cauda apolar de uma matriz de celulose, um método não convencional capaz de purificar

a enzima em pequenos e grandes volumes, em solução, diretamente do sobrenadante de cultura deslipidado e sem a necessidade de colunas cromatográficas.

[020] Desta maneira, a purificação simples apresentada, com relativamente alta recuperação, é promissora para a aplicação em larga escala.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[021] Para obter uma visualização total e completa do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se fazem referências, conforme se segue.

[022] A Figura 1 apresenta esquematicamente as eletroforeses SDS-PAGE, onde em A, a linha 1 representa marcadores moleculares; a linha 2 representa a lipase purificada com DEAE-Celulose, aplicação de 100 µg de proteína; a linha 3 representa a lipase purificada com DEAE-Celulose, aplicação de 45 µg de proteína. Revelação por Coomassie Blue. Já em B, a linha 1 representa o sobrenadante de cultura; e a linha 2 representa a lipase purificada com DEAE-Celulose, aplicação de 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

[023] A Figura 2 apresenta esquematicamente as eletroforeses SDS-PAGE comparando a purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 utilizando, onde A representa Sephadex-G75 em coluna cromatográfica; B representa DEAE-Sephadex em coluna cromatográfica; C representa DEAE-Celulose em etapa única sem coluna cromatográfica, as linhas 1 representam o sobrenadante de cultura; e as linhas 2 representam o extrato purificado de acordo com o método indicado pela letra. Foram aplicados 15 µg de proteína. Revelação por nitrato de prata.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[024] A presente invenção refere-se a um método de purificação de lipases bacterianas utilizando fibras de celulose DEAE-Celulose contendo dietilaminoetil em etapa única, conferindo ao método, agilidade, baixo custo e baixa complexidade de realização.

[025] O referido método utiliza como matriz de purificação fibras de celulose, em forma de DEAE Celulose contendo Dietilaminoetil ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$) que se comportam como bases fracas e promovem maior rendimento de purificação, ou fibras de celulose pura que, embora possuam menor rendimento também possuem um custo menor.

[026] Para a purificação, de 1 a 10 g da matriz de celulose é adicionada a um volume de 10 a 1000 mL do extrato enzimático tamponado em pH 7,0 (tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L), e deixado sob agitação branda em agitador magnético durante 20 minutos.

[027] Após a adsorção da enzima a matriz, a mistura é centrifugada a 2000 rpm, durante 5 minutos. A matriz de celulose recuperada é lavada duas vezes com solução de NaCl 0,2 mol/L para remover outras proteínas sem interesse adsorvidas à matriz. O método de lavagem é seguido de centrifugação e recuperação da matriz de celulose e da enzima.

[028] Para recuperação da enzima ligada à cauda apolar da matriz de celulose, o suporte é então adicionado a uma solução de isopropanol 50% (v/v) em tampão de pH 7,0 (citrato-fosfato 0,05 mol/L). Após a centrifugação, a matriz de celulose pode ser limpa para remoção do álcool e reutilizada sem perda de rendimento, enquanto que o

sobrenadante, contendo a enzima pura, é dialisado para a remoção do álcool e posteriormente liofilizado.

[029] Os ensaios realizados com 3 lipases microbianas distintas produzidas por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, *Fusarium sp.* (GFC) e *Botryosphaeria ribis* demonstraram rendimentos superiores a 45% e banda única em eletroforese SDS-PAGE.

[030] Devido às características apolares formarem agregados de alta massa molecular da enzima e, uma vez que a lipase a ser purificada atua em substratos comumente apolares, foi desenvolvido este protocolo para ligação seletiva da enzima na cauda apolar de uma matriz de celulose. O método é não convencional e de etapa única, sendo capaz de purificar a enzima de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em pequenos (5 mL) e grandes volumes (500 mL), em solução, diretamente do sobrenadante de cultura deslipidado e, ainda, sem a necessidade de colunas cromatográficas.

[031] A precipitação com sulfato de amônio a 80%, embora tenha apresentado bons resultados de pré-purificação, não se faz necessária neste protocolo.

[032] Assim, este método apresenta presteza, uma vez que ocorre em etapa única; baixo custo, por utilizar DEAE-Celulose, que é encontrada em abundância; eficiência, na recuperação da enzima e, adicionalmente, é inédito em sistemas de purificação de lipases.

[033] A lipase purificada apresentou um fator de purificação de 46,5, atividade específica de 18.422 U/mg e recuperação de atividade de 53% (Tabela 1). A eletroforese SDS-PAGE indicou a presença de uma única banda de 32 kDa (Figura 1), que se aproxima de muitas lipases conhecidas de

Burkholderia sp. com pesos moleculares entre 29 e 35 kDa.

[034] Este protocolo de purificação tem sido aplicado para a purificação de lipases produzidas por outros microrganismos e tem se mostrado eficiente (dados não mostrados), ou seja, isso indica que, além de um método simples, barato e eficiente, também se mostra versátil para a purificação de lipases.

Tabela 1 - Purificação da lipase de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em um passo por método não convencional utilizando DEAE-Celulose

Fração	Atividade total (U)	Atividade enzimática (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	FP
Sobrenadante de cultura	697,5	139,5	0,35200	396,31	100,00	1,00
DEAE-Celulose	375,7	375,7	0,00204	18422,12	53,86	46,48

FP: Fator de Purificação.

[035] A lipase extracelular de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 foi purificada até à homogeneidade por etapa única utilizando DEAE-Celulose e isopropanol com eficiência superior às metodologias tradicionais utilizando colunas cromatográficas (Figura 2).

[036] Em comparação com a maioria das outras lipases purificadas, a purificação da lipase de *B. lata* foi bastante simples e com elevada recuperação. A purificação de uma lipase de *P. aeruginosa* LST-03, descreveu um método de quatro etapas sucessivas com 12,6% de recuperação. Também utilizando um protocolo de quatro etapas, incluindo uma cromatografia de troca iônica e uma cromatografia de permeação em gel, foi purificada uma lipase de *Burkholderia*

multivorans PSU-AH130 com recuperação de 12,1%.

[037] A purificação da lipase de *Burkholderia* sp. EQ3 com precipitação com acetona e mais dois passos cromatográficos obtém uma purificação de 70,9 vezes, porém com uma recuperação de apenas 7,6%. A lipase de *Burkholderia ambifaria* YCJ01 foi purificada com um fator de 24,2 e recuperação de 12,5%, utilizando cromatografia de troca aniônica e interação hidrofóbica.

[038] A lipase extracelular de *Burkholderia ubonensis* SL-4 foi purificada através de *Q Sepharose Fast Flow* (FF) e cromatografia de filtração em gel com recuperação de 13,34% e uma purificação de 68,5 vezes, e a atividade específica final de 362,82 U/mg. A utilização do método de adsorção-dessorção em matriz de polipropileno de uma etapa, purificou a lipase de *Burkholderia* sp. HY-10 em 54,5 vezes com um rendimento de 30%. Rendimentos de purificação mais baixos, de 4,8% para a lipase de *B. cepacia* ATCC 25416, 3,9% para a lipase de *Burkholderia* sp. GXU56 e 0,96% para a lipase de *B. multivorans* V2, também foram relatados. Uma maior recuperação, de 52%, foi obtida para a lipase de *Pseudomonas* sp. S5, mas empregando cromatografia de afinidade em combinação com cromatografia de troca iônica. A purificação da lipase de *Pseudomonas* sp. DMVR46 foi descrita utilizando precipitação com acetona e cromatografia de troca iônica (DEAE-Celulose) com um fator de purificação de 28,9 e recuperação de 29,7%. Uma purificação de 240 vezes com recuperação de 14,8% para a lipase de *Pseudomonas mendocina* PK-12CS foi obtida utilizando precipitação com acetona e cromatografia de troca iônica.

[039] Todos os exemplos utilizam técnicas

cromatográficas complexas e de alto custo, além de resultarem em baixos índices de recuperação.

[040] É muito comum que métodos de purificação de lipases exijam vários passos, incluindo um ou mais passos cromatográficos. Assim, uma série de métodos ou combinações de etapas de purificação acabam sendo necessários, elevando os custos e diminuindo o rendimento do método global.

[041] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

[042] Ainda, é possível compreender que, a partir da comparação entre os exemplos apresentados, a purificação simples revelada, com relativamente alta recuperação, é altamente promissora para a aplicação em larga escala para purificação de lipases com custo reduzido.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de purificação de lipases bacterianas, **caracterizado** pelo fato ser realizado em etapa única compreendendo simultaneamente:

- Adição de matriz de celulose ao extrato enzimático tamponado;
- Agitação branda;
- Adsorção da enzima à matriz;
- Centrifugação;
- Duas lavagens com NaCl 0,2 mol/L;
- Recuperação da matriz e da enzima;
- Adição a uma solução de isopropanol 50% (v/v) em tampão;
- Diálise do sobrenadante; e,
- Liofilização do sobrenadante para recuperação da enzima.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de fibras de celulose serem utilizadas como matriz de purificação.

3. Método, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de a matriz de purificação ser principalmente em forma de DEAE Celulose contendo dietilaminoetil ($\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), e fibras de celulose pura, preferencialmente em forma de DEAE Celulose.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de compreender de 1 a 10 g da matriz de celulose, adicionada a um volume de 10 a 1000 mL do extrato enzimático tamponado em pH 7,0, e deixado sob agitação branda em agitador magnético por 20 min

5. Método, de acordo com a reivindicação 1,

caracterizado pelo fato de após a matriz de celulose adsorver o extrato enzimático, a mistura é centrifugada a 2000 rpm durante 5 min, sendo a matriz e a enzima recuperadas e lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,2 mol/L.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de a recuperação da enzima ligada à cauda apolar da matriz de celulose ocorrer quando o suporte é adicionado a uma solução de isopropanol 50% (v/v) em tampão citrato-fosfato 0,05 mol/L pH 7,0.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de após a centrifugação, a matriz de celulose pode ser limpa e reutilizada sem perda de rendimento, enquanto o sobrenadante, contendo a enzima pura, é dialisado para a remoção do álcool e posteriormente liofizado.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de os ensaios serem realizados com 3 lipases microbianas distintas produzidas por *Burkholderia lata* LBBI0-BL02, *Fusarium sp.* (GFC) e *Botryosphaeria ribis*.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de os ensaios demonstrarem rendimentos superiores a 45% e banda única em eletroforese SDS-PAGE.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de a lipase purificada apresentar um fato de purificação de 46,5, atividade específica de 18.422 U/mg e recuperação de atividade de 53%.

Resumo**MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DE LIPASES BACTERIANAS**

A presente invenção descreve um método de purificação de enzima lipase, produzida pela cepa selvagem de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02. Diferentemente das invenções apresentadas, permite produzir uma lipase purificada através de um protocolo que compreende um único passo em que a lipase é deixada em contato com a DEAE-Celulose para ligação seletiva e posterior recuperação da enzima pura. A purificação em etapa única da lipase produzida pela bactéria ocorre através da adição da matriz de celulose a um extrato enzimático com tampão do sistema. O método de lavagem é seguido de centrifugação e recuperação da matriz de celulose e a enzima. Os ensaios realizados com 3 lipases microbianas distintas produzidas por *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, *Fusarium sp.* (GFC) e *Botryosphaeria ribis* demonstraram rendimentos superiores a 45% e banda única em eletroforese SDS-PAGE. Desta maneira, a purificação simples apresentada neste método, com relativamente alta recuperação, é promissora para a aplicação em larga escala para purificação de lipases com custo reduzido.