

ESTUDO PROSPECTIVO DE PATENTES RELACIONADAS A UTILIZAÇÃO DO BACILLUS SUBTILIS EM BIOPROCESSOS

Camylla Carneiro Soares^{1*}, Janice Izabel Druzian², Ana Katerine de Carvalho Lima Lobato³

^{1,2,3} Universidade Federal da Bahia, BA, Brasil.

Rec.:15/07/2017. Ace.:07/03/2018

RESUMO

O *Bacillus subtilis* é uma bactéria não patogênica capaz de tolerar condições ambientais atípicas e por isso é amplamente estudada e utilizada em bioprocessos. Dentre seus bioprodutos encontra-se a surfactina, um dos biosurfactantes mais eficazes conhecidos. O objetivo desta prospecção foi realizar um levantamento do número de documentos destinados a produção de bioprodutos por *Bacillus subtilis*. Utilizou-se o banco de dados do Espacenet® e as palavras-chave “product” e “Bacillus subtilis”. Selecionou-se o código C12R 1/25 e localizou-se 980 patentes que após a retirada das duplicatas reduziu-se a 307. Notou-se que a utilização desse microrganismo em processos biotecnológicos teve seu ápice em 2014 com 73 patentes depositadas. O continente com mais depósitos é a Ásia. Coreia do Sul (89 patentes), Estados Unidos (63 patentes) e China (60 patentes) são os maiores detentores de patentes e Estados Unidos e Coreia do Sul os maiores inventores.

Palavras-chave: Biotecnologia. *Bacillus subtilis*. Bioprodutos.

PATENT PROSPECTIVE STUDY RELATED TO THE USE OF BACILLUS SUBTILIS IN BIOPROCESSES

ABSTRACT

Bacillus subtilis is a nonpathogenic bacterium able to tolerate atypical environmental conditions and is therefore widely studied and used in bioprocesses. Among its bioproducts is the surfactin, one of the most effective biosurfactants known. The objective of this prospection was to carry out a survey of the number of documents destined to the production of bioproducts by *Bacillus subtilis*. It was used the Espacenet® database and the keywords "product" and "Bacillus subtilis". The C12R 1/25 code was selected and 980 patents were found which, after eliminating duplicates, were reduced to 307. It was noted that the use of this microorganism in biotechnological processes had its apex in 2014 with 73 patents deposited. The continent with the most deposits is Asia. South Korea (89 patents), United States (63 patents) and China (60 patents) are the largest patent holders and United States and South Korea are the largest inventors.

Keywords: Biotechnology. *Bacillus subtilis*. Bioproducts.

Área tecnológica: Biotecnologia. Microbiologia.

*Autor para correspondência: s.camylla@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

A bactéria *Bacillus subtilis*, cujo habitat natural é o solo, é um bacilo gram positivo, não patogênico, não colonizador de tecidos, formador de esporos e naturalmente transformável, ou seja, a capacidade de capturar DNA exógeno faz parte do seu ciclo de vida (PACCEZ, 2007). Essa bactéria foi, por muito tempo, considerada estritamente aeróbica, porém, estudos conduzidos nos últimos anos, mostraram que tal espécie pode também crescer em ambientes anaeróbicos (ANDRADE, 2011).

Considerada como uma das principais espécies de microrganismos para produção de biossurfactantes, o *Bacillus subtilis* também ganhou destaque pela produção de uma vasta gama de bioprodutos de ampla utilidade como, por exemplo, os antibióticos e antifúngicos peptídicos para o controle de doenças de plantas, entre os quais se encontram a iturina e a fengicina. Além disso se destaca pela produção industrial de proteínas recombinantes já que a cultura dessas bactérias em sistema de produção de larga escala a densidades elevadas é fácil e barata. (WESTERS, 2004).

O *Bacillus subtilis* também é alvo de estudos devido a sua facilidade em produzir a surfactina, melhor surfactante natural caracterizado (KUSHIDA, 2000). Esse biossurfactante apresenta grande potencial detergente, emulsificante, solubilizante, dispersante e formador de espumas, propriedades bastante úteis para o desenvolvimento de cosméticos e medicamentos (EHRHARDT, 2015). Além disso, a surfactina possui um vasto espectro de aplicação farmacêutica, das quais pode-se citar a capacidade de inibição da formação de coágulos, formação de canais iônicos em membranas (BANAT *et al.*, 2000), além de atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antiviral (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Alguns estudos revelaram que o *Bacillus subtilis* é também capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica (KAI *et al.* 2007). Chen *et al.* (2008) encontraram 14 compostos voláteis de *Bacillus subtilis*, identificados através da cromatografia gasosa de espectro de massa (CG-MS), com aparente fonte de compostos bioativos.

Inúmeros bioprodutos comerciais a base de *Bacillus subtilis* estão registrados pela United States Environmental Protection Agency (USEPA), sendo indicados como fungicida e bactericida para diversas culturas de plantas, tais como: algodão, tomate, soja, amendoim, milho hortaliças, culturas produtoras de grãos etc. No Brasil há o Serenade® da Agraquest, antifúngico e antibiótico comercial composto exclusivamente por *Bacillus subtilis* (FILHO, *et al.*, 2010).

São grandes as aplicações dos bioprodutos obtidos por *Bacillus subtilis* e suas características como biodegradabilidade, aceitabilidade ecológica, baixa toxicidade e possibilidade de serem produzidas com a utilização de matérias-primas renováveis e de baixo custo os tornam alvo de vários estudos. Desta forma, visando estimular a inovação tecnológica no setor, foi realizado um estudo prospectivo sobre os metabólitos produzidos por *Bacillus subtilis* utilizando o monitoramento de patentes. Esta pesquisa englobou documentos depositados desde o ano de 1952 até março de 2017.

METODOLOGIA

A base de dados escolhida foi a do Banco Europeu de Patentes, o Espacenet®, pois é uma base mundial de acesso livre usualmente utilizada para prospecção e que abrange patentes depositadas em mais de 90 países. Inicialmente, empregou-se as palavras-chave “product” e “*Bacillus subtilis*” e então foram obtidas as principais classificações internacionais por códigos, referentes a utilização de *Bacillus subtilis* em bioprocessos.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do bacillus subtilis em bioprocessos.

O código selecionado para o estudo de patentes foi o C12R 1/25, referente a processos empregando a bactéria *Bacillus subtilis*, conforme mostrado na Tabela 1. Foram encontradas uma quantidade relevante de registros, num total de 980, o que nos permitiu trabalhar no estudo prospectivo com uma maior confiabilidade.

Tabela1 – Códigos de patentes utilizados no estudo prospectivo.

CÓDIGOS	CLASSIFICAÇÃO
C	Química e metalurgia
C12	Bioquímica; cerveja, SPIRITS; vinho; vinagre; microbiologia; enzimologia; mutação ou engenharia genética
C12R	Processos utilizando microrganismos
C12R 1/00	Processos utilizando microrganismos
C12R 1/01	Usando bactérias ou ACTINOMYCETALES
C12R 1/07	Bacillus
C12R 1/125	Bacillus subtilis

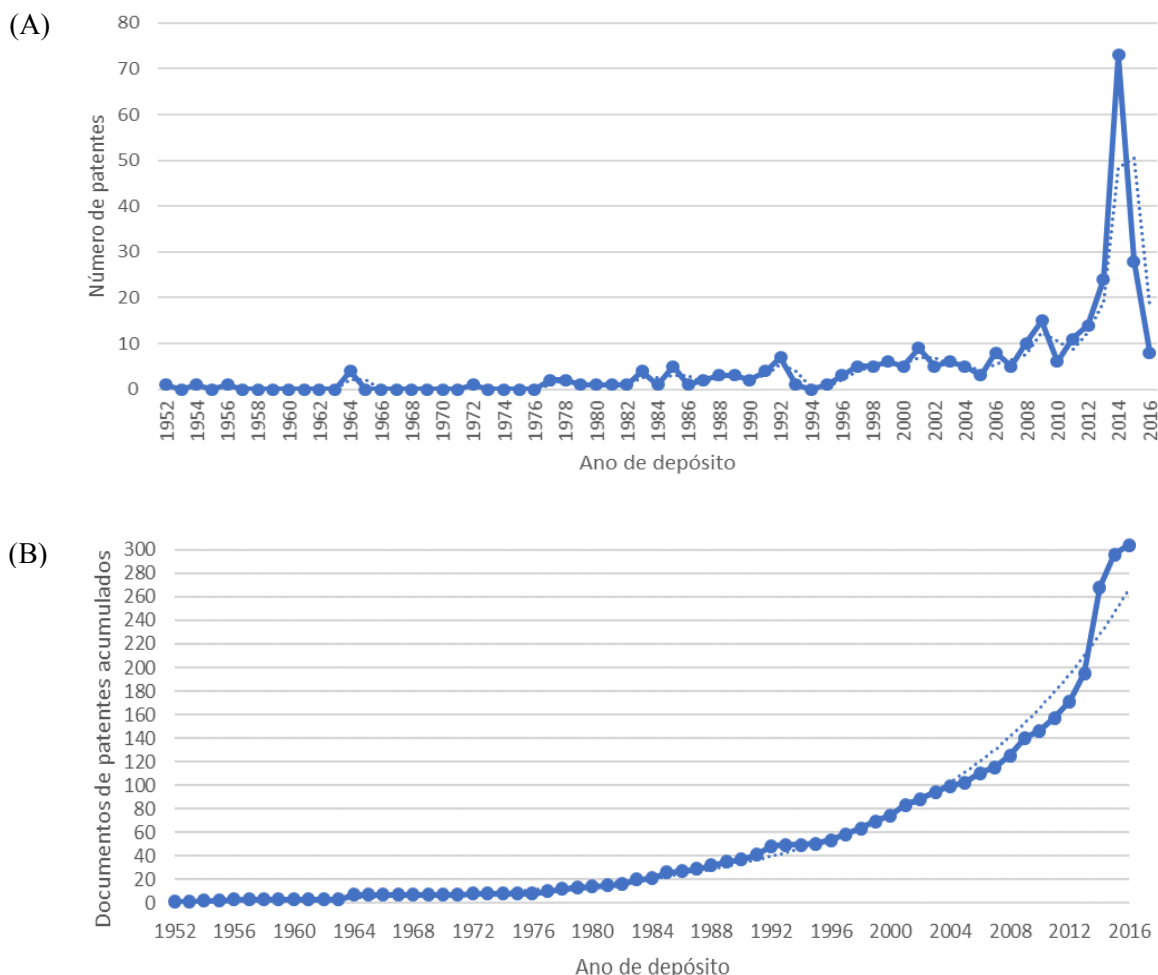
Fonte: Banco Europeu de Patentes (2016).

Analisou-se 500 das 980 patentes encontradas e após a eliminação das duplicatas utilizado o software Microsoft Excel e remoção das patentes que não tinham ligação com o tema proposto, foram obtidos 307 documentos. Estas patentes serviram de base para a construção de um banco de dados que possibilitou a análise destes documentos, assim como a determinação das tendências tecnológicas no setor. Foram analisados, nesta prospecção, o número de patentes depositados por país e por ano de depósito, bem como os principais inventores e depositantes. Os resultados obtidos foram expressos em forma de gráficos elaborados no software Microsoft Excel. A prospecção tecnológica foi realizada de dezembro de 2016 a março de 2017.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1A demonstra o montante de patentes depositadas, após a eliminação da duplicidade, referente ao código C12R 1/25 entre os anos de 1952 onde se identificou o primeiro registro até o ano de 2016. Na Figura 1B observa-se o número de documentos de patentes acumulados entre os anos de 1952 a 2016.

Figura 1 – Documentos de patentes depositados: (A) evolução anual e (B) acumulados entre os anos de 1952 e 2016.



Fonte: Autoria Própria (2016).

Pode-se observar pela análise das Figuras, que as três primeiras patentes foram depositadas nos anos de 1952, 1954 e 1956. Os primeiros países detentores dessa tecnologia que utiliza a bactéria *Bacillus subtilis* em bioprocessos foram a França (1952), a Alemanha (1954) e os Estados Unidos (1956), segundo a base de dados utilizada, o Espacenet®. Pode-se inferir ainda, que por 11 anos, entre 1952 e 1963, apenas essas três patentes haviam sido depositadas.

Até o ano de 1982, observou-se que o número de depósitos de patentes manteve uma certa constância, com o auge em 1964 com quatro patentes depositadas. Nota-se ainda que a partir deste ano, o número de patentes inicia um crescimento, sendo que a partir de 1995 essa ascensão se torna mais acelerada. Isso demonstra que houve um aumento no interesse pelo estudo dos bioprodutos obtidos utilizando a bactéria *Bacillus subtilis* e que sua aplicação tecnológica tem se tornando cada vez mais aceita e mais utilizada.

Entre os anos de 2010 e 2016, observa-se um aumento significativo no número de patentes depositadas, tendo seu ápice em 2014 com um total de depósitos de 73 patentes. Neste ano que houve este aumento expressivo, diz-se que ocorreu o surgimento de uma onda tecnológica, ou seja, provavelmente uma mudança na metodologia e/ou nas tecnologias de produção ocasionou tal ápice.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do bacillus subtilis em bioprocessos.

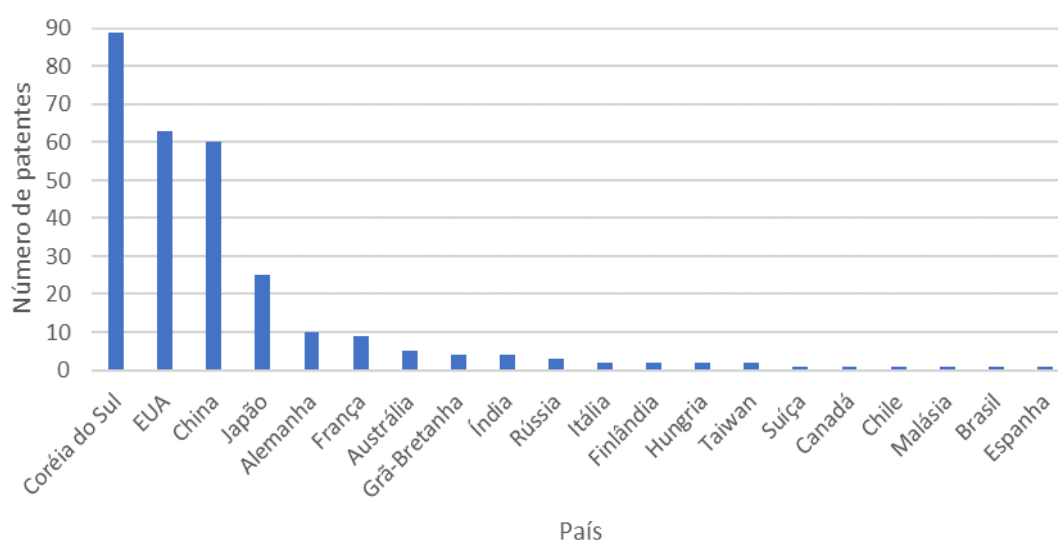
Este crescimento no número de patentes depositadas demonstra ainda o aumento do interesse no estudo de bioprodutos oriundos do processo fermentativo do *Bacillus subtilis*. Uma das explicações para esse crescente interesse pode ser devido à ampla preocupação ambiental pois, um dos principais metabólitos do *Bacillus subtilis* é a surfactina, melhor biosurfactante já caracterizado, e este possui baixa toxicidade e é biodegradável. Desta forma, este bioproduto é um grande aliado em casos de derramamento de petróleo, no processo chamado de biorremediação, já que a exploração de petróleo tem crescido de forma significativa, principalmente após a descoberta de grandes reservas em águas profundas e a possibilidade de explorá-las (KOSARIC, 1992; MULLIGAN e GIBBS, 1993; BOGNOLO, 1999). Portanto, a utilização dessa tecnologia é uma forma de utilizar processos naturais controlados para criar soluções biodegradáveis que evitem a poluição.

Além disso, bioprodutos a base de *Bacillus subtilis* também se mostram efetivos na redução de enfermidades no campo e são menos agressivos ao meio ambiente. Assim, a utilização desses bioprodutos tem se pautado na principal tendência mundial, que visa estudos com microrganismos no controle de doenças, almejando a redução drástica de produtos químicos que causam distúrbios ambientais importantes (FILHO *et al.*, 2010).

Em relação aos depósitos de patentes, é importante ressaltar que estes são mantidos em período de sigilo durante 18 meses contados da data de depósito ou da prioridade mais antiga e por isso, a realização dos estudos de prospecção tecnológica podem sofrer uma limitação, já que um número considerável de depósitos não se encontra disponível em domínio público (BRASIL, 1996; FLORÊNCIO *et al.*, 2017). Além disso, o período de sigilo encobre o que há de mais recente em termos de tecnologia nas diversas áreas do conhecimento e, por isso, parte do ano de 2015 e o ano de 2016 podem não estar corretamente analisados.

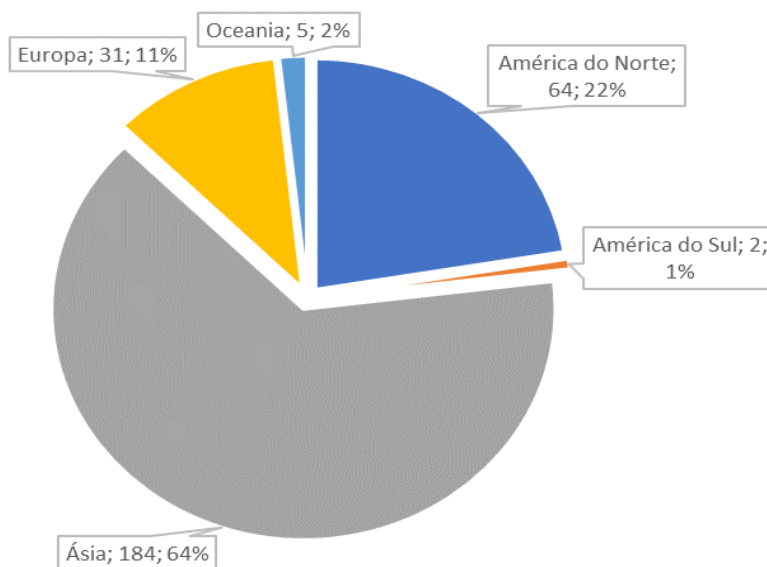
As Figuras 2 e 3 explicitam a distribuição dos depósitos de patentes por país e por continente, respectivamente.

Figura 2 – Distribuição dos depósitos de patentes por país.



Fonte: Autoria Própria (2016).

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do bacillus subtilis em bioprocessos.

Figura 3 – Distribuição dos depósitos de patentes por continente.

Fonte: Autoria Própria (2016).

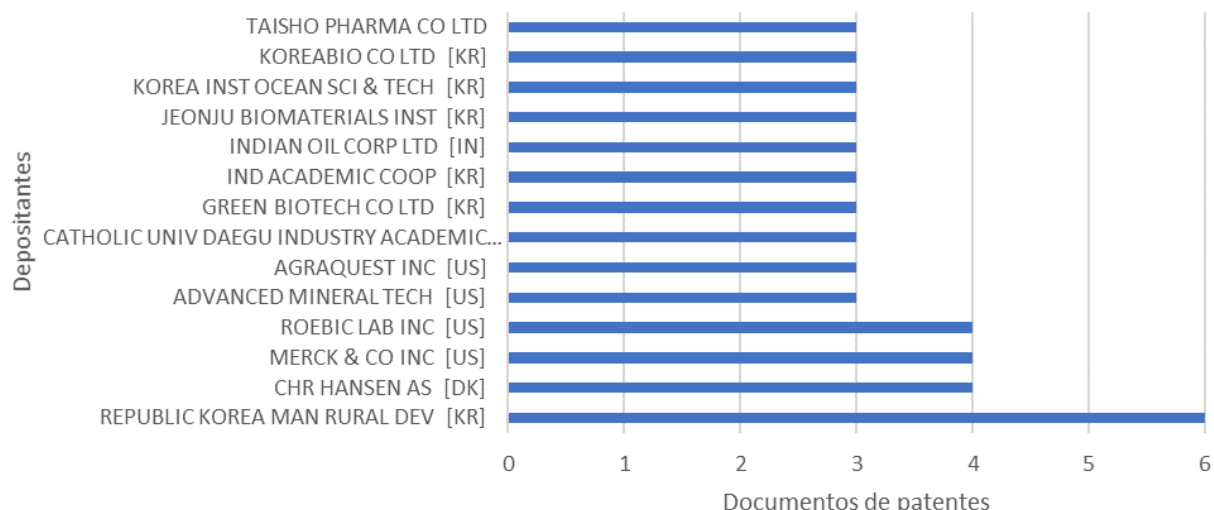
Pode-se inferir observando as Figuras que tal tecnologia se encontra, principalmente, concentrada nos países desenvolvidos, sendo que a Coréia do Sul, de onde vieram cerca de 89 do total de documentos depositados, domina este ramo. Posteriormente, os Estados Unidos e a China com 63 e 60, respectivamente. Outros três países apresentam uma quantidade significativa de patentes, o Japão com 25, a Alemanha com 10 e a França com 9.

A Ásia domina o depósito de patentes nessa tecnologia, como observado na Figura 3, com 64% do total, uma vez que três dos maiores países depositantes (Coréia do Sul, China e Japão) se encontram no continente asiático, conforme analisado na Figura 2. Os Estados Unidos são, praticamente, responsáveis por todas as patentes depositadas pela América do Norte, uma vez que a contribuição canadense para o continente é de uma patente depositada no ano de 1990. A América do Sul possui apenas duas patentes nessa área, sendo uma brasileira depositada no ano de 2011 pela Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e uma chilena.

Dentre os países com uma quantidade expressiva de patentes depositadas, pode-se destacar a Alemanha a qual possui a primeira empresa do mundo, Evonik Industries, a produzir biossurfactante em escala industrial no ano de 2016 (EVONIK INDUSTRIES, 2016). Portanto, apesar da Europa ocupar o terceiro lugar no ranking dos depósitos de patentes por continente, conforme a Figura 4, este país europeu foi o primeiro a pôr em prática a fabricação e comercialização deste importante bioproduto.

A Figura 4, ilustra os principais detentores da tecnologia, onde observa-se que na Coréia do Sul encontra-se os maiores depositantes, com um total de seis das quatorze principais detentoras e 21 patentes depositadas ao todo. Os Estados Unidos vêm em segundo lugar com quatro dos principais depositantes somando 14 patentes.

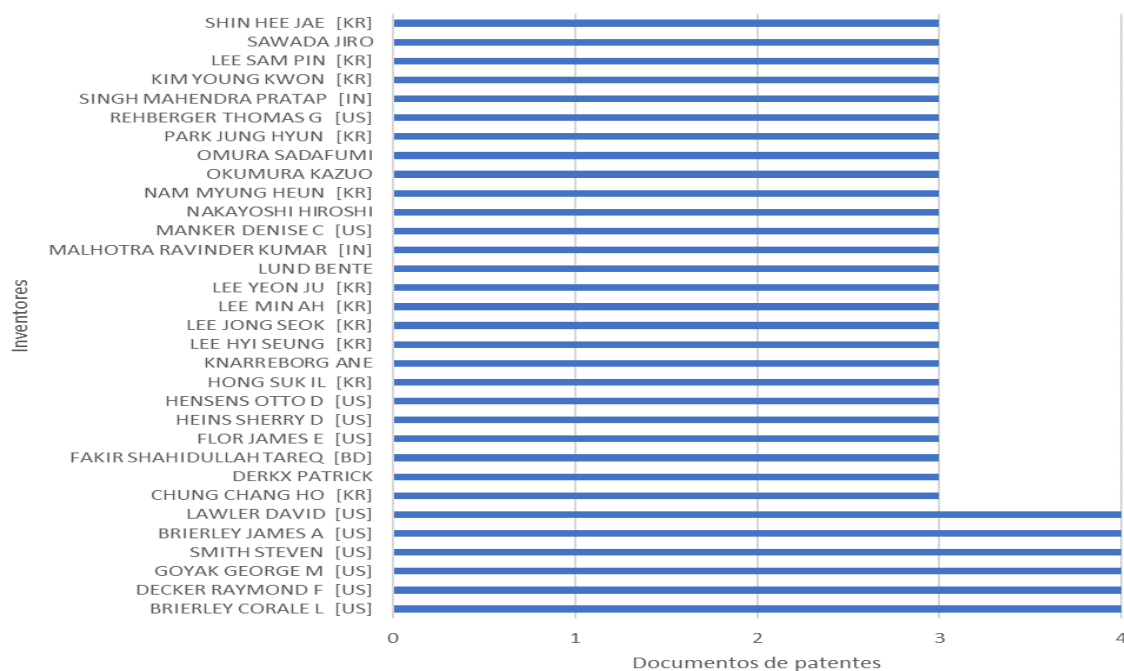
Figura 4 – Distribuição dos documentos de patentes pelos principais depositantes.



Fonte: Autoria Própria (2017).

Entre os inventores que mais detêm patentes na área de utilização do *Bacillus subtilis* estão aqueles originários dos Estados Unidos, como mostra a Figura 5. Dentre eles, se destacam o casal James e Corale Brierley, ambos membros da Academia Nacional de Engenharia dos Estados Unidos (NAE), onde realizam trabalhos referentes a inovações que aplicam a biotecnologia à produção e remediação de minas. Seus trabalhos técnicos ao longo das décadas se tornaram base para muitas tecnologias (MINING FOUNDATION OF THE SOUTHWEST, 2014). Apesar do casal americano citado estar entre os maiores inventores de patentes (Figura 5), estes não aparecem nos principais depositantes como visto na Figura 4, o que demonstra que eles não detêm as tecnologias por eles inventadas.

Figura 5 – Distribuição dos documentos de patentes por inventores e país de origem.



Fonte: Autoria Própria (2017).

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do bacillus subtilis em bioprocessos.

CONCLUSÃO

A partir da análise das patentes depositadas entre os anos de 1952 e 2016, pode-se concluir que existe uma tendência ao crescimento de depósitos envolvendo o *Bacillus subtilis*, uma vez que a utilização desta tecnologia cria soluções biodegradáveis que evitam a poluição, a exemplo dos biossurfactantes produzidos por este microrganismo que podem ser aplicados na biorremediação e na recuperação melhorada do petróleo.

A utilização de processos biodegradáveis tem se tornado de grande valia, uma vez que a população mundial tem crescido e a quantidade de resíduos gerada acompanhou o crescimento. Entretanto, esta produção acelerada de resíduos tem se tornado um problema no que diz respeito a sua falta de utilização e a sua forma de descarte. Por isso, a utilização do *Bacillus subtilis* em processos biotecnológicos sofreu um aumento significativo, já que esta é uma bactéria fermentativa, capaz de utilizar resíduos para a formação dos seus produtos e, além disso, tais produtos gerados são biodegradáveis, possuem baixa toxicidade e podem ser utilizados de forma segura no meio ambiente, a exemplo dos biossurfactantes e dos bactericidas e fungicidas utilizados em cultivos de plantas.

No que diz respeito aos países nos quais se origina e se detêm a tecnologia patenteada, esta se encontra concentrada nos países mais desenvolvidos, sendo amplamente dominado pela Coréia do Sul, Estados Unidos, China e Japão. Isto ocorre em virtude dos custos para estudos e para produção que ainda são mais elevados que os métodos tradicionais e, por isso, faz-se necessário a posse de recursos para tal investimento.

Além disso, no que diz respeito aos depósitos de patentes, parte do ano de 2015 e o ano de 2016 podem ter sofrido uma limitação devido ao período de sigilo de 18 meses, pois um número considerável de patentes não se encontra ainda disponível em domínio público.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C.J. **Estudo da Utilização do Glicerol Oriundo da Cadeia de Biodiesel por *Bacillus subtilis* para a Produção de Biossurfactantes, Enzimas e Aromas**. 140 f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potencial Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as Emulsifying Agents for Hydrocarbons. **Colloid and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 157, n. 1, p. 41-52, 1999.

BRASIL. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula os direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de maio de 1996.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.

EHRHARDT, D. D. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* utilizando resíduo do processamento do abacaxi como substrato**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do *Bacillus subtilis* em bioprocessos.

ESPACENET [Base de dados – Internet]. European Patent Office; 2016. Disponível em: <https://worldwide.espacenet.com/>. Acesso em 20 jan. 2017.

EVONIK Industries. SEPAWA Innovation Award for REWOFERM® biosurfactant. Dez. 2016. Disponível em: http://corporate.evonik.com/en/media/press_releases/pages/news-details.aspx?newsid=63969. Acesso em: 12 mar. 2017.

FILHO, R. L.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas** V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

FLORENCIO, M. N. da S.; MIRANDA, D. P. S. L de; SANTOS, A. da C.; DIAS, C. T.; RUSSO, C. T.; JUNIOR, A. M. de O. Prospecção Tecnológica: um estudo sobre os depósitos de patentes em nanobiotecnologia. **Cad. Prospec.**, Salvador, v. 10, n. 2, p.315-326, abr./jun. 2017.

KAI, M.; EFFMERT, U.; BERG, G.; PIECHULLA, B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. **Archives of Microbiology**, v.187, p.351–360, 2007.

KOSARIC, N. Biosurfactants in Industry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1731-1737, 1992.

KUSHIDA, M.M. **Caracterização Parcial e Propriedades de Biossurfactantes Bacterianos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MINING FOUNDATION OF THE SOUTHWEST. 2014 Medal of Merit Recipients. Disponível em: http://www.miningfoundationsw.org/James_Corale_Brierley. Acesso em: 20 mar. 2017.

MULLIGAN, N.C.; GIBBS, F.B. Biosurfactants: Production, Properties and Applications. Capítulo. Factors Influencing the Economics of Biosurfactants. **Marcel Dekker**: New York, NY, p. 329-368, 1993.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Quím. Nova**, v.25, n. 5, p. 772-776, 2002.

PACCEZ, J.D. **Aplicação de Linhagens Geneticamente Modificadas de *Bacillus subtilis* no Desenvolvimento de Vacina de Mucosas Contra Patógenos Entéricos**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W.J. *Bacillus subtilis* as Cell Factory for Pharmaceutical Proteins: a Biotechnological Approach to Optimize the Host Organism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299-310, 2004.

SOARES, C.C.; DRUZIAN, J.I.; LOBATO, A.K. de C.L.L. Estudo prospectivo de patentes relacionadas a utilização do bacillus subtilis em bioprocessos.