



Outras petições

Número do Processo: BR 11 2016 015450 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: CL0015965734

Nacionalidade: Chilena

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción

Cidade:

Estado:

CEP:

País: Chile

Telefone:

Fax:

Email: brj@clarkemodet.com.br

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDAD DE TALCA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ:

Nacionalidade: Chilena

Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica

Endereço: Cardenal Raúl Silva Henríquez - Ex 1 Poniente, N 1141

Cidade: Comuna de Talca

Estado:

CEP:

País: CHILE

Telefone:

Fax:

Email:

Referência Petição

Pedido : BR 112016015450-9

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Flávia Salim Lopes

Numero OAB:

Numero API: 488

CPF/CNPJ: 02341292712

Endereço: Avenida Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Bourget) -
Centro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20020-080

Telefone: (21)3223-9500

Fax: (21)3223-9501

Email: flopes@clarkemodet.com.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento	Guia de compl. 201600966.pdf
Procuração	POA Universidad de Concepcion E-Pat F.pdf
Procuração	Poa E-Patentes Universidad de Talca (Flávia).pdf
Prioridade	201600966 Prio Chilena correta.pdf
Prioridade	201600966 - Prioridade Chilena trad.pdf
Esclarecimento	201600966 Esclarec complemen.pdf
Relatório Descritivo	201600966 Relatório.pdf
Reivindicação	201600966 Reivindicações.pdf
Desenho	201600966 Desenho.pdf
Resumo	201600966 Resumo.pdf
Emenda	201600966 Reivindic Emendadas.pdf

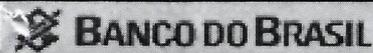
Declaração de veracidade

Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Obrigado por acessar o Peticionamento Eletrônico

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Este pedido foi enviado pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 25/08/2016 às 15:43



001-9

RECIBO DO SACADO

Local de Pagamento

Pagável em qualquer Banco

Vencimento

Contra-apresentação

Cedente

INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Agência/Código Cedente

2234-9/333.028-1

Data do Documento

Nº. documento

Espécie doc.

Aceite

Data Proces.

Nosso Número

17/08/2016

1606527589

RC

N

17/08/2016

00.000.2.2.16.0652758.9

Uso Banco

Carteira

Espécie

Quantidade

Valor

(=) Valor Documento

18/027

RS

R\$ 90,00

Número: BR 11 2016 015450 9 NN Complementar:

Petição: Eletrônico

(-) Desconto/Abatimento

Cod

Serviço

Petição Vinculada RPI Valor

(-) Outras deduções

260 - Outras petições

- - R\$ 90,00

(+) Mora/Multa

(+) Outros Acréscimos

API: 474

Procurador: Orlando de Souza

(=) Valor Cobrado

Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança

R\$ 90,00

Sacado

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION (CL0015965734)

Barrio Universitario s/n, Edificio Empredec, Concepción, -, CL,

Sacador/Avalista

5BR 0000 002 25082016 0192

90,000 20/55



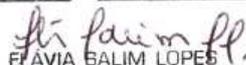
Corte na linha pontilhada

Autenticação mecânica - Controle Cedente

201600966

Para os fins de MEMO/INPI/PROC Nº 074 de 03/08/93, e do COMUNICADO publicado na RPI 1527 de 11/04/2000, declaro, sob as penas da lei, que as fotocópias aqui anexas constituem reproduções fidedignas dos originais que se encontram em poder de Flávia Salim Lopes.

Rio de Janeiro, 30 de junho de 2014


FLÁVIA SALIM LOPES

Clarke, Modet & C^o

BRAZIL

Av. Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Le Bourget) - Centro - Rio de Janeiro, RJ - CEP 20020-080 BRAZIL Email: brj@clarkemodet.com.br

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento particular de procuração

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Estabelecida em:

Barrio Universitario, Edificio Empredec S/N, UPI
Concepción - CL

outorga(m) a Clarke, Modet Propriedade Intelectual Ltda, inscrita no CNPJ sob o nº 33.033.101/0001-18, Antonio Trajano Lima Ribeiro da Silva, brasileiro, casado, advogado, inscrito na OAB/RJ sob o nº 18.817; Orlando de Souza, brasileiro, casado, Engenheiro Eletrônico, Agente da Propriedade Industrial N.º Reg.: 0474 - 18/09/98; Andréa Gama Possinhas Tardin, brasileira, casada, advogada, inscrita na OAB/RJ sob o nº 89.165; Flávia Salim Lopes, brasileira, solteira, Engenheira Química, Agente da Propriedade Industrial N.º 0488; Gilberto de Carvalho, brasileiro, casado, Agente da Propriedade Industrial nº 1368, com endereço na Av. Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Le Bourget) - Centro - Rio de Janeiro, RJ - Brasil, todos os poderes para representar o(s) Outorgante(s) perante as autoridades competentes do Brasil para o fim de obter a proteção e salvaguarda de direitos relativos a Propriedade Intelectual, tais como patentes de invenção, modelos de utilidade, registros de desenhos industriais, certificados de adição, garantias de prioridade, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas e de certificação, certificados de direito autoral, seja para obras artísticas, literárias, partituras musicais, campanhas de publicidade e outros, registro de programas de computador, registro de nomes de domínio, requerer o cancelamento de um nome de domínio, requerer a transferência da propriedade de um nome de domínio e a transferência do contato de um nome de domínio, promover notificações extrajudiciais, entre outros, com amplos e ilimitados poderes para assinar petições e documentos e requerer buscas e certidões, anotar transferências, fazer prova de uso de patentes e marcas, efetuar pagamento de anuidades, pedir prorrogações e ainda opor, protestar, recorrer, replicar, desistir, efetuar pagamentos de taxas e retribuições, cumprir exigências, requerer anotações de cessões e transferências, requerer e/ou contestar caducidades, alterações de nome, contratos de licença, requerer nulidades, anotações de quaisquer direitos ou prestação de assistência técnica ou transferências de tecnologia; desistir, dar quitação, substituir e revogar no todo ou em parte; praticar, enfim, todos e quaisquer atos perante todas as autoridades administrativas e judiciais brasileiras, inclusive poderes "ad judicium", em benefício do(s) Outorgante(s), ratificando atos anteriormente realizados; receber citações judiciais relativas à Propriedade Intelectual, podendo substabelecer no todo ou em parte.

Place and date (local e data) Concepción, Chile, 03 de Enero de 2014

Signature (assinatura)

Name (nome) SERGIO LAVANCHY MERINO

Job title (cargo) RECTOR UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

POWER OF ATTORNEY

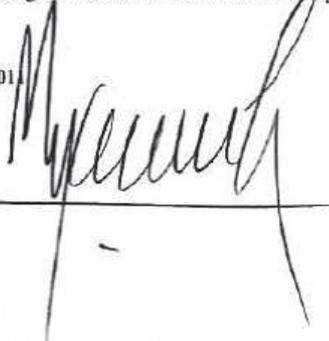
By this private instrument of power of attorney

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

Located at:

Barrio Universitario, Edificio Empredec S/N, UPI
Concepción - CL

grant to Clarke, Modet Propriedade Intelectual Ltda., registered with the National Register of Corporate Entity under number 33.033.101/0001-18, Antonio Trajano Lima Ribeiro da Silva, Brazilian, married, lawyer, registered at the Brazilian Bar association under number 18.817; Orlando de Souza, Brazilian, married, Electronic Engineer, Agent of the Industrial Property under number 0474 - 18/09/98; Andréa Gama Possinhas Tardin, Brazilian, married, lawyer, registered at the Brazilian Bar association under number 89.165; Flávia Salim Lopes, Brazilian, single, Chemical Engineer, Agent of the Industrial Property under number 0488; Gilberto de Carvalho, Brazilian, married, Agent of the Industrial Property under number 1368 located at Av. Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Le Bourget) - Centro - Rio de Janeiro, RJ - Brazil, all powers to represent the Grantor(s) before the competent authorities in Brazil, for the purpose of securing protection and safeguard of rights relating to the Intellectual Property, such as invention patents, utility models, registrations of industrial drawings, supplemental certificates, priority warranties, registrations of product, service, collective and/or certification marks, copyright protection for literary works, artistic works, music compositions, advertising campaigns and others, software registration certificates, domain name registrations, to request the cancellation of a domain name, to request the assignment of ownership of a domain name and the assignment of a contact of a domain name, send Warning Letters, with ample and unrestricted powers to sign petitions and documents and to apply for searches, certificates and recordation assignments; to produce evidence of use of patents and marks, to pay annuities, to request renewals, and, further, to oppose, to object to, to appeal, to respond, to disclaim, to pay taxes and fees, to comply with office actions, to petition recordations of assignments and transfers, to apply for and object to forfeiture proceedings; to petition name changes, license agreements, to request cancellations, recordations of whatever rights, or rendering of technical assistance, or technology transfers; to disclaim, to give quitance, to substitute and revoke in whole or in part; ultimately to perform all and any acts before all the Brazilian Administrative and judicial authorities, including "ad judicium" powers, on behalf of the Grantor(s), ratifying acts previously carried out; receive judicial summons relating to the Intellectual Property, being entitled to substitute in whole or in part.



O reconhecimento de firma só é necessário para o registro de programas de computador e/ou nomes de domínio
Notarization and legalization only required for registration of computer programs and/or domain names

Rio de Janeiro, 15 de Agosto de 2016

Flávia Salim Lopes
FLÁVIA SALIM LOPES

Clarke, Modet & Cº

BRASIL

Av. Marechal Câmara, 160 - 12º andar (Edifício Le Bourget) - Centro - Rio de Janeiro, RJ - CEP 20020-080 BRAZIL. Email: brj@clarkemodet.com.br

PROCURAÇÃO

Pelo presente instrumento particular de procuração UNIVERSIDAD DE TALCA RUT 70.885.500-06, representada por su Rector don Álvaro Rojas Marín, RUT 6.224.494-1.

estabelecida em: Cardenal Raúl Silva Henríquez – Ex 1 Poniente, N°1141, comuna de Talca, Chile

outorga a Clarke, Modet Propriedade Intelectual Ltda, inscrita no CNPJ sob o nº 33.033.101/0001-18, **Orlando de Souza**, brasileiro, casado, engenheiro eletrônico, Agente da Propriedade Industrial nº 0474, **Jansen Gava Moreira Viana**, brasileiro, solteiro, advogado, inscrito na OAB/RJ sob o nº 104.333, **Flávia Salim Lopes**, brasileira, solteira, engenheira química, Agente da Propriedade Industrial nº 0488, e **Fabrize Machado Pereira da Cruz**, brasileira, solteira, advogada, inscrita na OAB/RJ sob o nº 96.887, com endereço na Av. Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Le Bourget), Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, todos os poderes para representar a Outorgante perante as autoridades competentes do Brasil para o fim de obter a proteção e salvaguarda de direitos relativos a Propriedade Intelectual, tais como patentes de invenção, modelos de utilidade, registros de desenhos industriais, certificados de adição, garantias de prioridade, registros de marcas de produto, de serviço derivado de na solicitação **PCT/CL2014/000087 del 24/12/2014**. Em cumprimento do mandato pode ser promover notificações extrajudiciais, entre outros, com amplos e ilimitados poderes para assinar petições e documentos e requerer buscas e certidões, anotar transferências, fazer prova de uso de patentes e marcas, efetuar pagamento de anuidades, pedir prorrogações e ainda opor, protestar, recorrer, replicar, efetuar pagamentos de taxas e retribuições, cumprir exigências, requerer anotações de cessões e transferências, requerer e/ou contestar caducidades, alterações de nome e/ou sede, requerer nulidades, anotações de quaisquer direitos ou prestação de assistência técnica ou transferências de tecnologia; enfim, todos e quaisquer atos perante todas as autoridades administrativas e judiciais brasileiras, ratificando atos anteriormente realizados do Outorgante; receber citações judiciais relativas à Propriedade Intelectual.

PODER

Por el presente instrumento particular de poder UNIVERSIDAD DE TALCA, RUT 70.885.500-06, representada por su Rector don Álvaro Rojas Marín, RUT 6.224.494-1.

domiciliada en: Cardenal Raúl Silva Henríquez – Ex 1 Poniente, N°1141, comuna de Talca, Chile

otorga a Clarke, Modet Propiedad Intelectual Ltda, inscrita en el CNPJ en el N° 33.033.101/0001-18, **Orlando de Souza**, brasileño, casado, ingeniero electrónico, Agente de la Propiedad Industrial nº 0474, **Jansen Gava Moreira Viana**, brasileño, soltero, abogado, inscrito en la OAB/RJ en el nº 104.333, **Flávia Salim Lopes**, brasileña, soltera, ingeniera química, Agente de la Propiedad Industrial nº 0488, e **Fabrize Machado Pereira da Cruz**, brasileña, soltera, abogada, inscrita en la OAB/RJ en el nº 96.887, domiciliados en Av. Marechal Câmara, 160, 12º andar (Edifício Le Bourget), Centro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, todos los poderes para representar a la Otorgante ante las autoridades competentes de Brasil con el fin de obtener la protección y resguardar los derechos relativos a la Propiedad Intelectual, tales como patentes de invención, modelos de utilidad, registros de dibujos industriales, certificados de adición, garantias de prioridad, registros de marcas de producto y/o de servicio derivados de la entrada a fase nacional de la solicitud **PCT/CL2014/000087 del 24/12/2014**. En el desempeño del mandato se podrá promover notificaciones extrajudiciales, entre otros, con amplos e ilimitados poderes para firmar peticiones y documentos y solicitar búsquedas y certificados, anotar transferencias, hacer prueba de uso de patentes y marcas, efectuar pago de anualidades, pedir prórrogas y aún oponer, protestar, recurrir, replicar, efectuar pagos de tasas y retribuciones, cumplir acción oficiales, solicitar anotaciones de cesiones y transferencias, solicitar y/o contestar caducidades, cambios de nombre y/o de dirección; pedir nulidades, anotaciones de cualquier derecho o prestación de asistencia técnica o transferencias de tecnología; en fin, todos y cualquier acto ante todas las autoridades administrativas y judiciales brasileñas, ratificando actos anteriormente realizados por la Otorgante; recibir citaciones judiciales relativas a la Propiedad Intelectual.

Talca, Agosto 10 2016, Chile

La personería de don Álvaro Rojas Marín, para representar a la Universidad de Talca, consta en el D.S. N° 219 del Ministerio de Educación, de fecha 09.05.2014, publicado en el Diario Oficial el 20.06.2014.

Álvaro Rojas Marín
ALVARO ROJAS MARIN
RECTOR
UNIVERSIDAD DE TALCA



CERTIFICADO OFICIAL

El Director Nacional y el Conservador de Patentes que suscriben, certifican que las copias (38) adjuntas, corresponden a una solicitud de Patente de Invención.

Nº 3780-2013

Presentada en Chile con fecha:

30 DE DICIEMBRE DE 2013


Esteban Figueroa Nagel
Conservador de Patentes


Maximiliano Santa Cruz Scantlebury
Director nacional





INAPI
Ministerio de
Economía, Fomento y
Turismo

Gobierno de Chile



3114575 Solicitud: 2013-03780
Patente de invención

30/12/2013 10:12:49

USO EXCLUSIVO INAPI

Fecha		N° Solicitud
Fecha Publicación		
N° de Registro	Fecha de Registro	

SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTES

12 TIPO DE SOLICITUD <input checked="" type="checkbox"/> INVENCIÓN <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> DIBUJO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> ESQUEMA DE TRAZADO O TOPOGRAFÍA DE CIRCUITOS INTEGRADOS <input type="checkbox"/> DIVISIONAL <input type="checkbox"/> N° SOLICITUD ORIGEN	PRIORIDAD 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____ 31 N° _____ 32 FECHA ____ ____ ____ 33 PAIS _____		DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input checked="" type="checkbox"/> PODER <input checked="" type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> DOCUMENTO(S) DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> LISTADO DE SECUENCIAS <input type="checkbox"/> CERTIFICADO DEPOSITO MATERIAL BIOLÓGICO <input type="checkbox"/> DIVULGACIÓN INOCUA <input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN SOLICITUD INTERNACIONAL PCT <input type="checkbox"/> INFORME DE BUSQUEDA PCT <input type="checkbox"/> EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL PCT
--	--	--	---

PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

86 N° SOLICITUD INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
87 N° PUBLICACIÓN INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)	
54 TÍTULO O MATERIA DE LA SOLICITUD Biofertilizante y su proceso de elaboración.	

71 SOLICITANTE Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN	
RUT: 81.494.400-K DIRECCIÓN (Calle, Número) Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.	SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input checked="" type="checkbox"/> 3	CIUDAD Concepción REGIÓN 8 PAIS Chile E-MAIL upi@udec.cl TELÉFONO 041 - 220 4437

72 INVENTOR O CREADOR Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social ROSAS GAJARDO, Anali	
RUT: 12.050.795-8 DIRECCIÓN (Calle, Número) Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.	SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input checked="" type="checkbox"/> 2
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input checked="" type="checkbox"/> 1	CIUDAD Concepción REGIÓN 8 PAIS Chile E-MAIL upi@udec.cl TELÉFONO 041 - 220 4437

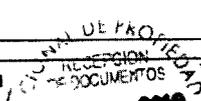
74 REPRESENTANTE Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social SEPÚLVEDA BARRERA, Ximena	
RUT: 13.106.919-7 DIRECCIÓN (Calle, Número) Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.	SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input checked="" type="checkbox"/> 2
CIUDAD Concepción REGIÓN 8 PAIS Chile E-MAIL upi@udec.cl TELÉFONO 041 - 220 4437	

De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos

N° DE PODER
(N° de Custodia Inapi)

9191

USO EXCLUSIVO INAPI





USO EXCLUSIVO INAPI

Fecha		N° Solicitud
Fecha Publicación		
N° de Registro	Fecha de Registro	

**ANEXO SOLICITUD DE PATENTES
OTRO/S, SOLICITANTE/S, INVENTOR/ES, Y OTRA/S PRIORIDAD/ES**

PRIORIDAD

31	N°	_____
32	FECHA	__/__/__
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__/__/__
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__/__/__
33	PAIS	_____

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social UNIVERSIDAD DE TALCA		
RUT:	70.885.500-6	DIRECCIÓN (Calle, Número) Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.		
TIPO	<input checked="" type="checkbox"/> 3	CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile
		E-MAIL upi@udec.cl	TELÉFONO 041 - 220 4437	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
TIPO	<input type="checkbox"/>	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
		E-MAIL	TELÉFONO	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
TIPO	<input type="checkbox"/>	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
		E-MAIL	TELÉFONO	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social LOPEZ EMPARAN, Roxana		
RUT:	14.519.795-3	DIRECCIÓN (Calle, Número) Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.		
TIPO	<input checked="" type="checkbox"/> 1	CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile
		E-MAIL upi@udec.cl	TELÉFONO 041 - 220 4437	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input checked="" type="checkbox"/> 2		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
TIPO	<input type="checkbox"/>	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
		E-MAIL	TELÉFONO	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
TIPO	<input type="checkbox"/>	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
		E-MAIL	TELÉFONO	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
TIPO	<input type="checkbox"/>	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
		E-MAIL	TELÉFONO	
		SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>		

RECEPCION DOCUMENTOS
01.08.2016



FPI - 41

(19)

HOJA TÉCNICA (RESUMEN)

(12) TIPO DE SOLICITUD

INVENCIÓN	x
-----------	---

MODELO DE UTILIDAD	
--------------------	--

(51) Int. Cl.	
---------------	--

(21) Número de Solicitud		
--------------------------	--	--

(22) Fecha de Solicitud			
-------------------------	--	--	--

(30) Número de Prioridad (País, Nº y Fecha)

(72) Nombre Inventor(es) (Incluir Dirección)
Anali Rosas Gajardo, Roxana Lopez Emparan
Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción.

(71) Nombre Solicitante (Incluir Dirección y Teléfono)
Universidad de Concepción, Universidad de Talca
Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción,
Fono: 041-220 4437.

(74) Representante (Incluir Dirección y Teléfono)
Ximena Sepúlveda Barrera, Barrio Universitario s/n,
Empreudec, Concepción, Fono: 041-220 4437.

(54) Título de la Invención (Máximo 330 caracteres)
Biofertilizante y su proceso de elaboración

(57) Resumen (Máximo 1600 caracteres)
Proceso para la elaboración de un biofertilizante, que comprende: a) realizar una FES para producir enzimas; b) Inmovilización de las enzimas y sustratos producidos durante la etapa a), a través de nanopartículas de alofan; y nueva fermentación para favorecer el desarrollo de microorganismos que mejoran la calidad del biofertilizante. Además se resguarda un biofertilizante producto de este proceso.

**Ministério de Economía, Fomento e Turismo
Governo do Chile**

CERTIFICADO OFICIAL

O Diretor Nacional e o Conservador de Patentes que assinam, certificam que as cópias (38) em anexo correspondem a um pedido de Patente de Invenção.

Nº 3780-2013

Apresentado no Chile na data:

30 de Dezembro de 2013

**Esteban Figueroa Nagel
Conservador de Patentes**



**Maximiliano Santa Cruz Scantlebury
Diretor Nacional**

Pedido de patente

12) Tipo de solicitação	Prioridade	Documentos
(X) Invenção		Resumo Descrição Reivindicações Desenhos Procuração Cessão

54) Título da solicitação:

Biofertilizante e seu processo de elaboração

71) Requerente:

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Barrio Universitario s/n Edificio Empreudec, Concepcion

Email: upi@udec.cl Tel: 041-2204437

72) Inventores:

ROSAS GAJARDO, Analí Barrio Universitario s/n Edificio Empreudec, Concepcion

Email: upi@udec.cl Tel: 041-2204437

74) Agente:

SEPÚLVEDA BARRERA, Ximena

Barrio Universitario s/n, Edificio Empreudec, Concepción.

Telefone: 041-220-4437

Nº procuração 9191

Assinatura e nome do representante

71) Requerente:

UNIVERSIDAD DE TALCA

Barrio Universitario s/n Edificio Empreudec, Concepcion

Email: upi@udec.cl Tel: 041-2204437

72) Inventores:

LOPEZ EMPARAN, Roxana Barrio Universitario s/n Edificio Empreudec, Concepcion

Email: upi@udec.cl Tel: 041-2204437

Folha Técnica (Resumo)

(71) Nome do requerente (incluir endereço e telefone)

Universidad de Concepción, Universidad de Talca

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción,

Fono: 041-220 4437.

(72) Nome do inventor (incluir endereço)

Análí Rosas Gajardo, Roxana Lopez Emparan

Barrio Universitario s/n, Empreudec, Concepción.

(74) Agente (incluir endereço e telefone)

Ximena Sepúlveda Barrera, Barrio Universitario s/n,

Empreudec, Concepción, Fono: 041-220 4437.

(54) Título da invenção

Biofertilizante e seu processo de elaboração

(57) Resumo

A invenção diz respeito a um método de produção de um fertilizante organomineral, compreendendo: (a) fermentação no estado sólido, a fim de produzir nutrientes essenciais e enzimas para a nutrição das plantas; (B) imobilização por meio de alofana nanopartículas e as enzimas de substratos produzidos no passo (a); e (c) renovação da fermentação, a fim de incentivar o desenvolvimento de microrganismos que melhoram a qualidade do biofertilizantes. A invenção refere-se ainda a biofertilizantes produzidos por este método

Ilmo Senhor Diretor do Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Pedido: 1120160154509 de 24/12/2014

PCT: PCT/CL2014/000087 de 24/12/2014

Titular(es): UNIVERSIDAD DE CONCEPCION;

UNIVERSIDAD DE TALCA

Título depositado: "PROCESO PARA PRODUÇÃO DE UM BIOFERTILIZADOR COMPREENDENDO OS PASSOS DE FERMENTAÇÃO DO ESTADO SÓLIDO, IMOBILIZAÇÃO ATRAVÉS DAS NANOPARTÍCULAS DE ALÓFANO E UMA SEGUNDA FERMENTAÇÃO; E O DITO BIOFERTILIZADOR"

ESCLARECIMENTO

Inicialmente, requerente vem, por meio deste, solicitar a alteração do endereço do titular UNIVERSIDAD DE TALCA para "**Cardenal Raúl Silva Henríquez - Ex 1 Poniente, N 1141, comuna de Talca, Chile**", devido a uma recente mudança no mesmo.

Ainda, a requerente apresenta a Procuração (2 folhas), o documento de Prioridade (7 folhas), as vias do relatório descritivo (35 folhas) e dos desenhos (8 folhas), juntamente com novas vias das reivindicações (3 folhas) e do resumo (1 folha) com a finalidade de completar a tradução do pedido PCT conforme originalmente depositado.

Adicionalmente, a requerente apresenta emenda voluntária composta de novo quadro reivindicatório (2 folhas - contendo 8 reivindicações) a fim de colocar o presente pedido em conformidade com as emendas do Artigo 19 do PCT.

Salienta-se que, para melhor clareza, o título do presente pedido foi alterado para "PROCESO PARA PRODUIR UM BIOFERTILIZANTE COMPREENDENDO AS ETAPAS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, IMOBILIZAÇÃO ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE ALOFANO E UMA SEGUNDA FERMENTAÇÃO; E O REFERIDO BIOFERTILIZANTE".

Desde já nos colocamos a inteira disposição para sanar qualquer dúvida ou tomar qualquer procedimento que se faça necessário.

Rio de Janeiro, 25 de agosto de 2016.

Flávia Salim Lopes

**PROCESSO PARA PRODUZIR UM BIOFERTILIZANTE COMPREENDENDO AS
ETAPAS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, IMOBILIZAÇÃO
ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE ALOFANO E UMA SEGUNDA
FERMENTAÇÃO; E O REFERIDO BIOFERTILIZANTE**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Esta tecnologia é orientada para a indústria da agricultura e pecuária, principalmente a primeira, e é projetada para melhorar os solos agrícolas, permitindo um aumento na disponibilidade de nutrientes, quando requeridos pelas plantas.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] A necessidade de produzir produtos alimentares de forma extremamente rápida e em grande quantidade tem levado a uma saída dos métodos agrícolas tradicionais, a fim de se obter maior produtividade das culturas. Estes rendimentos elevados, no entanto, tornam-se possíveis através da utilização de fertilizantes que requerem grandes quantidades de energia, principalmente a partir de combustíveis fósseis. Além disso, a utilização de fertilizantes químicos de uma maneira desproporcional é uma das principais causas de degradação do solo. É, portanto, necessário aumentar a aplicação de fertilizantes mais inócuos para substituir adubos químicos ou pelo menos reduzir o seu uso excessivo.

[003] Os fertilizantes mais utilizados em todo o mundo são produtos minerais que contêm principalmente nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Estes produtos são considerados indispensáveis para fornecer a quantidade de nutrientes necessários para o rendimento das culturas ideais. No entanto, muitos fatores associados com o uso de

fertilizantes de síntese química são atualmente objeto de intenso debate. Estes incluem: 1) a redução das reservas mundiais de rocha fosfática; 2) a poluição ambiental causada pela síntese química de fertilizantes de nitrogênio e fósforo; 3) a poluição ambiental causada pela aplicação de fertilizantes para o solo; e 4) a ineficiência da utilização de fertilizantes.

[004] Os cálculos sobre as reservas remanescentes de rocha fosfática, o mineral mais importante usado para sintetizar fertilizantes fosfatados, têm variado nos últimos anos (Van Vuuren et al., 2010). Isto é devido ao grande número de fatores que afetam a disponibilidade deste recurso e sua imprevisibilidade. Fatores relevantes incluem a demanda por fertilizantes fosfatados, os diversos métodos técnicos para estimar quantitativamente as reservas de rocha fosfática, novas políticas agrícolas, a crise econômica, instabilidade geopolítica e distorções de mercado (Cordell et al., 2011). Um exemplo de uma tal distorção de mercado foi a crise alimentar global de 2008, durante o qual o preço das commodities de rocha fosfática aumentou 800% durante um período de 18 meses. Além disso, a maioria dos estudos sobre as reservas de rocha fosfática são baseados em estimativas realizadas por cada país e relatórios de avaliações científicas e industriais, utilizando uma variedade de métodos técnicos (Jasinski, 2010). De acordo com muitos autores, um momento de definição na disponibilidade de fertilizantes fosfatados será o que é conhecido como o pico de produção de rocha fosfática (Dery & Anderson, 2007; Cordell et al, 2009; Cordell et al, 2011a), definido como o momento em que a

quantidade máxima de rocha fosfática de alta qualidade é produzida a um preço baixo. Após este ponto ter sido alcançado, a produção de rocha fosfática diminuirá independentemente da demanda crescente do mercado, principalmente devido a limitações econômicas e energéticas (Cordell et al., 2011a). Diferentes estudos sobre o pico de produção de rocha fosfática, em geral, preveem que este momento ocorrerá dentro dos próximos 20 a 70 anos (Cordell et al, 2009; Van Kauwenbergh, 2010; Lindström et al.; Cordell & White 2011). Este alto grau de vulnerabilidade do mercado global de rocha fosfática torna necessário diversificar as fontes de P, investindo em fertilizantes fosfatados renováveis e/ou recuperação de todas as fontes de P presente na cadeia alimentar de forma mais eficiente.

[005] Em um nível global, é amplamente reconhecido que a produção de fertilizantes requer grandes quantidades de energia e é uma fonte significativa de gases de efeito estufa. Estima-se que a produção de fertilizantes consome 1,2% de toda a energia global e causa cerca de 1,2% das emissões de gases de efeito estufa (Kongshaugh, 1988). No caso dos fertilizantes de nitrogênio, os principais gases de efeito estufa emitidos são CO₂, gerados a partir da combustão de gás natural para a síntese de amônia, e óxido nitroso, liberados durante a produção de ácido nítrico. A produção de fertilizantes fosfatados também é responsável pela emissão de grandes quantidades de CO₂, devido à utilização de combustíveis fósseis em todo o processo de produção (Wood e Cowie, 2004).

[006] Os fertilizantes de nitrogênio e potássio geralmente contêm baixas concentrações de As, Cd e Pb, e,

por conseguinte, não contribuem significativamente para a acumulação de elementos tóxicos em solos e culturas (Raven & Loeppert, 1997; Luo et al., 2009). Os fertilizantes fosfatados, no entanto, podem conter uma elevada concentração de metais pesados (As), dependendo do tipo e origem do mineral a partir do qual o fósforo é extraído (Jiao et al., 2012; Chaney, 2012). Em termos gerais, a rocha fosfática sedimentar contém uma maior concentração de impurezas, incluindo elementos tóxicos, do que a rocha fosfática ígnea (Hartley et al., 2012). Infelizmente, os processos para a remoção dos contaminantes presentes na rocha fosfática que têm sido desenvolvidos até a presente data não são economicamente viáveis (Stacey, 2010). Embora estudos medindo a concentração de arsênio em mais de 300 amostras de fertilizantes fosfatados de várias origens tenham obtido concentrações relativamente baixas de arsênio, com uma média de entre $7,6 \text{ mg kg}^{-1}$ e 20 mg kg^{-1} de As em mais de 90% das amostras (Nziguheba & Smolders, 2008; Jiao et al., 2012), a redução das fontes de rocha fosfática de alta qualidade faz com que seja altamente provável que haja uma tendência a aumentar o uso de rochas fosfáticas a partir de fontes com alta concentração de metais pesados (Stacey et al., 2010). É provado que o uso a longo prazo de fertilizantes fosfatados com uma concentração elevada de As aumenta consideravelmente a concentração de As em solos, um elemento altamente persistente que é absorvido pelas plantas (Hartley et al., 2013). Ser absorvido por plantas lhe permite atingir a cadeia alimentar humana e criar um alto risco para a saúde humana. Isto pode ocorrer, por exemplo, com a acumulação de As em arroz cultivado em

condições de inundação (Meharg et al., 2009; Meharg & Zhao, 2012). Outros elementos tóxicos contidos nos fertilizantes fosfatados, como o cádmio (Cd) e chumbo (Pb) estão presentes em concentrações mais variáveis do que o As (Jiao et al., 2012). Em uma avaliação de 277 amostras de fertilizantes, 16% continham uma concentração maior do que 100 mg kg^{-1} de Cd, com uma tendência semelhante para Pb (Jiao et al., 2012).

[007] Por outro lado, tem-se observado que os fertilizantes de micronutrientes tem uma maior concentração de elementos tóxicos, tais como Cd e Pb do que os fertilizantes fosfatados e produtos NPK (CDFA, 1998; US EPA, 1999).

[008] Eutrofização, tanto natural como antropogênica, consiste em um acúmulo de nutrientes em águas superficiais, estimulando o crescimento da flora aquática. Em geral, o nutriente que mais contribui para o crescimento de algas neste caso é P, assim como algumas espécies de algas, tal como algas azuis-verdes podem biologicamente fixar N atmosférico (Chien et al., 2011). A principal fonte de P para a eutrofização na água é a agricultura (EPA, 2009), devido ao escoamento superficial de P dissolvido na água (Preedy et al., 2001). A este respeito, vários estudos têm observado um maior escoamento de P a partir de fertilizantes fosfatados em comparação com chorume animal (Bundy et al., 2001; Preedy et al., 2001; Tabara, 2003).

[009] A eficiência máxima de fertilizantes de nitrogênio, fósforo e potássio aplicados diretamente ao solo é de cerca de 55%, 35% e 60%, respectivamente. Assim, a perda total global de N, por exemplo, pode atingir 9,45

milhões t cada ano. A fim de aumentar a eficiência dos fertilizantes, produtos tais como fertilizantes de liberação lenta e de liberação controlada, bem como inibidores da urease e da nitrificação têm sido desenvolvidos (Xiang et al., 2008). No entanto, essas tecnologias só visam reduzir a perda de nutrientes, ao invés de permitir a liberação dos nutrientes de acordo com as exigências da planta em cada estágio fenológico.

[0010] Nos solos a fração de nutrientes orgânicos é maior do que a de nutrientes inorgânicos. N inorgânico, por exemplo, é um dos elementos mais instáveis nos solos devido a uma série de processos que causam a sua perda, tais como: a lixiviação de NO_3^- ; desnitrificação biológica levando a perdas de N sob a forma de N_2 e N_2O ; desnitrificação química onde N é perdido na forma de NO_x , N_2O_x e N_2 ; volatilização causando a perda de N sob a forma de NH_3 ; e a erosão do solo que conduz à perda de N, na forma de NH_4^+ e N orgânico. Devido a essas perdas, não é possível para N acumular-se nos solos em uma forma inorgânica. Por outro lado, N acumula naturalmente nos solos em suas formas orgânicas em matéria orgânica e/ou composta. Os aminoácidos asparagina e glutamina, por exemplo, são duas das formas mais abundantes de N orgânico em solos. De fato, alguns estudos demonstraram que a percentagem de NH_4^+ liberado durante a hidrólise da asparagina e da glutamina foi igual à soma destes substratos presentes em ácidos húmicos (Bremner, 1955; Sowden, 1958). A mineralização destes aminoácidos é catalisada pelas enzimas L-asparaginase e L-glutaminase. Assim, ambas as enzimas desempenham um papel importante para a mineralização do N em solos e sua

posterior disponibilidade para as plantas (Hojjati & Nourbakhsh, 2007; Nourbakhsh & Alinejadian, 2009).

[0011] Tal como com N, o enxofre orgânico (S) nos solos compreende cerca de 98% a 99% do teor total de enxofre (Tabatabai, 1982). Do total de S orgânico [(500 a 1500 mg kg⁻¹ de S no solo)] contido no perfil do solo e nos resíduos orgânicos, a forma de sulfato de éster (R-O-SO₃H) corresponde de 30% a 75% (Aguilera et al., 2002). O sulfato de éster é considerado a forma mais lábil de enxofre em solos e é, por conseguinte, a forma mais diretamente relacionada com a nutrição das plantas (Maynard et al., 1985; Eriksen et al., 1998). Entre as enzimas relacionadas com a transformação de enxofre a partir de polímeros inorgânicos, enzimas arilsulfatases são consideradas chave para a mineralização do sulfato de éster, e são, portanto, responsáveis pela mobilização de enxofre a partir da matéria orgânica ou substratos orgânicos tais como composto (Klose & Tabatabai, 1999).

[0012] Na maioria dos solos, o fósforo orgânico (P) faz-se entre 20% e 80% do total de P. Por conseguinte, constitui uma importante reserva de potencial (Fransson e Jones 2007). A maioria do P orgânico consiste nas formas de monoéster e diéster de fosfato (Borie & Rubio, 2003; Briceño et al., 2005; Turner, 2008). Ambas as formas de P orgânico são mineralizadas pelas enzimas fosfatase alcalina e ácida. O produto final resultante é o fosfato, o qual pode ser rapidamente absorvido pelas plantas (Sanyal & DeDatta, 1991). Fosfatases são muito sensíveis à deficiência de fósforo no solo, de modo que há um aumento acentuado da fosfatase quando a quantidade de P na solução

de solo diminui (Sedenko & Zaitseva, 1984; Smith & Chevalier, 1984).

[0013] Estudos sobre a adição de enzimas no solo, a fim de acelerar o processo de mineralização, não são novos. Um dos primeiros estudos realizados por Neumann et al. (1999) mostrou que a adição da enzima fosfatase ácida no solo, a fim de acelerar a mineralização de P orgânico, conduziu a uma baixa liberação de P a partir da fração orgânica, como também a atividade da enzima foi significativamente reduzida devido à desnaturação. Assim, a estratégia de usar enzimas para a mineralização acelerada só pode ser eficaz se a enzima estiver ativa e imobilizada em um suporte. Na verdade, foi demonstrado que qualquer enzima adicionada nos solos é naturalmente retida ou imobilizada nos primeiros 3 minutos depois de entrar em contato com as diferentes frações do solo, embora isso não garanta que a enzima esteja ativa. A este respeito, estudos foram efetuados na imobilização artificial de fosfatase ácida e arilsulfatase usando suportes, tais como substâncias húmicas, argilas 2:1, e óxidos de Al e Mn. Nestes casos, a atividade enzimática diminuiu porque certos suportes agiram como inibidores enzimáticos ou perderam proteína durante o processo de imobilização artificial das enzimas (Rao & Gianfreda, 2000; Kelleher et al., 2004; Whalen & Warman, 1996b). Por conseguinte, a fim de controlar a mineralização dos substratos orgânicos com enzimas, é necessário escolher suportes que podem reter uma alta concentração de proteína e que não inibem a atividade da enzima. De acordo com os resultados obtidos por Rosas et al. (2008) e Lopez e Rosas (2008), a imobilização da

fosfatase ácida de minerais de argila de um Andisol aumentou a atividade específica da enzima em 89% a 144%. Além disso, o processo de imobilização utilizando este suporte não conduziu a uma perda de proteína, um fenômeno comum quando se utiliza outros tipos de suportes, quer orgânico ou inorgânico (Rao & Gianfreda, 2000). A este respeito, Pant e Warman (2000), que estudaram a mineralização de P por fosfatase ácida, determinaram que a adição de fosfatase imobilizada nos solos aumentou o fósforo disponível (extraído com água e NaOH) em 49%. López e Rosas (2008) relataram um aumento no P disponível (Olsen P) de até 150% com fosfatase ácida imobilizada em argilas de Andisol e níveis muito baixos de proteína enzimática.

[0014] A maioria dos agricultores reconhecem a importância da adição de compostos aos solos devido aos seus nutrientes e os efeitos sobre as propriedades físicas dos solos. No entanto, a disponibilidade de nutrientes do composto é dependente de processos de mineralização. Assim, como com os fertilizantes minerais, a liberação de nutrientes do composto não coincide com a absorção da planta. A mineralização da matéria orgânica no solo é realizada por enzimas dos ciclos de N, P e S. No entanto, a degradação do solo e a utilização de espécies vegetais menos adaptadas do que a flora nativa levaram a uma perda sucessiva da atividade enzimática nos solos. O uso de enzimas imobilizadas poderia ser uma maneira mais eficiente e ambientalmente amigável de produzir nutrientes para a produção agrícola.

[0015] O estudo da imobilização enzimática em nanopartículas de sílica tem avançado de forma

significativa nos últimos anos, como a imobilização nestes suportes aumenta a atividade da enzima e a eficiência catalítica (Gill, 2001; Reetz et al., 2003; Shchipunov et al., 2004). Wei et al. (2001) imobilizaram uma fosfatase ácida em nanoporos de sílica. Neste suporte, a atividade da enzima e a eficiência catalítica aumentaram porque o tamanho dos poros e a área superficial do suporte facilitaram o transporte do substrato e do produto. Luckarift et al. (2004) mostraram que as enzimas imobilizadas em uma matriz de sílica apresentaram um elevado grau de estabilidade térmica e sem degradação proteolítica após 30 dias à temperatura ambiente na ausência de antibióticos. O tamanho das partículas e dos poros e a estrutura destes nanomateriais de sílica são semelhantes aos microagregados de alofano. Alofano é o principal constituinte dos minerais de argila de Andisol. Esta argila é caracterizada por uma área de superfície que varia entre 700 m²/g e 1100 m²/g e um tamanho aproximado de 35 Å a 55 Å (3,5 nm a 5,5 nm) ((Parfitt, 1990). Alofano é considerado uma nanopartícula natural devido ao seu tamanho, a área de superfície grande, o tamanho do poro e estabilidade estrutural (nanoargila).

[0016] A adição de enzimas imobilizadas oferece vantagens claras em relação à fertilização tradicional, incluindo as seguintes: 1) a fertilização tradicional de P leva a uma alta disponibilidade inicial de P, uma das principais causas de eutrofização da água; 2) a enzima é ativada sob condições de baixa disponibilidade de nutrientes, gerada por absorção natural da planta, e é inativada quando alcança níveis médios de disponibilidade

(15 mg kg⁻¹ a 20 mg kg⁻¹; López & Rosas, 2008); 3) A enzima imobilizada pode permanecer ativa por longos períodos de tempo e contribuir para a disponibilidade natural de nutrientes para mais do que um ciclo de cultura.

[0017] A compostagem é um processo bio oxidativo (Albrecht et al. 2010), no qual diferentes tipos de resíduos orgânicos (palha, cascas, peles, subprodutos agrícolas e pecuários, estrume, etc.) sofrem uma decomposição e humificação e são modificados através de uma ampla faixa de processos biológicos e bioquímicos (Tiquia et al., 2001). Esta transformação leva a um produto relativamente estável contendo uma grande quantidade de substâncias húmicas e livres de substâncias fitotóxicas e agentes patogênicos (Zucconi & De Bertoldi, 1987; Claassen & Carey, 2004). O papel das enzimas nessas transformações é crucial (Tiquia et al., 2001; Tiquia et al., 2002), uma vez que fornecem facilmente os nutrientes disponíveis para os diferentes microrganismos durante cada estágio de compostagem. Entre estas enzimas estão aquelas que poderiam ter aplicações agrícolas importantes, tais como fosfatases, arilsulfatases e enzimas do ciclo de N.

[0018] Como afirmado por Gautam et al. (2010), a compostagem é um processo que faz com que seja possível a reciclagem de resíduos orgânicos e a produção de matéria orgânica que pode ser aplicada ao solo, reduzindo assim o impacto ambiental do referido resíduo. Vuorinen (2000), Mondini et al. (2004) e Fuentes (2009) observaram em seus estudos níveis de atividade de fosfatase alcalina e ácida mais elevados do que os dos solos agrícolas e até mesmo do

que os medidos em uma Andisol em um ecossistema de floresta intocada no sul do Chile.

[0019] Godden et al. (1983), Vuorinen (2000) e Fuentes (2009) observaram que a atividade da fosfatase aumentou durante os primeiros dias de compostagem do estrume bovino e manteve-se constante durante a fase termofílica. Em relação ao período de maior atividade da fosfatase, Albrecht et al. (2010), que realizou a compostagem de resíduos verdes e lodo de esgoto, afirmaram que a atividade da fosfatase é cíclica por natureza, com o pico da fosfatase ácida a ser atingido primeiro e, posteriormente, o de fosfatase alcalina. Por conseguinte, a produção de enzimas depende de cada etapa do processo de compostagem.

[0020] A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica baseada em compostagem em que a fermentação ocorre na ausência de água de escoamento livre e substratos sólidos naturais ou sintéticos são utilizados como suporte para o crescimento microbiano (Pandey et al., 2009). Esta técnica faz com que seja possível criar condições ideais para a produção de biomoléculas específicas, mantendo as vantagens do processo de compostagem original, tais como: os requisitos de energia baixos, a utilização de substratos fermentáveis de baixo custo que também fornecem fontes de carbono, nitrogênio e macro e microelementos necessários para o crescimento dos microrganismos (Petruccioli et al. 2011), e a eliminação de resíduos sólidos (Pandey, 2000). Na verdade, o uso industrial da FES na produção da enzima está se tornando mais e mais generalizado todos os dias (Rodríguez & Sanromán, 2005).

[0021] Durante a FES, um dos fatores-chave para a atividade enzimática é a temperatura. Na verdade, a atividade enzimática foi descrita como sendo dependente da temperatura durante o processo de compostagem (Mondini et al., 2004). O nível de umidade também parece ser de importância durante a FES. De acordo com Manpreet et al. (2005), o intervalo de umidade adequado para este tipo de fermentação varia entre 40% e 80%. Assim, a fim de otimizar a produção da enzima durante a fermentação, é necessário controlar a temperatura e a umidade.

[0022] Com base nos níveis de atividade da fosfatase ácida observados na Andisol em ecossistemas naturais, como florestas no sul do Chile, com valores atingindo 1 UI g⁻¹ de solo seco (Redel et al., 2008) e os níveis relatados para o processo de compostagem de 0,3 UI g⁻¹ a 3,4 UI g⁻¹ (Vuorinen, 2000; Tiquia et al., 2001; Pandey, 2003), é possível inferir que o estrume bovino pode ser usado como uma matéria-prima para a produção de enzimas e que os níveis máximos de atividade da fosfatase podem ser alcançados usando FES com estrume bovino, de um modo com base no processo de compostagem e a uma temperatura de 35°C (correspondendo à fase mesofílica/ termofílica).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0023] A invenção consiste em um processo para a produção de um biofertilizante baseado em enzimas imobilizadas em um nanomaterial, tornando-se possível aumentar a disponibilidade de nutrientes, quando requerido pelas plantas.

[0024] A primeira etapa do referido processo consiste de uma fermentação em estado sólido sob condições

necessárias para a produção de certas enzimas-chave para a nutrição das plantas. Também são produzidos durante esta fermentação os substratos necessários para que as enzimas catalisem as reações de mineralização necessárias para fornecer plantas com P, N, S e outros elementos suficientes. Durante a segunda etapa do processo, o nanomaterial alofano é adicionado ao produto de fermentação. Este nanomaterial consiste em nanopartículas de Si e Al que formam agregados nos quais as enzimas produzidas durante a FES são imobilizadas, protegendo-as contra a degradação microbiana e aumentando a sua eficiência catalítica. A terceira etapa consiste de uma segunda fermentação sob condições necessárias para a redução do número de microrganismos patogênicos que possam ter sobrevivido à primeira fase, melhorando assim a qualidade do produto de fermentação. O resultado desses processos é um produto de fermentação que foi enriquecido com enzimas, substratos orgânicos, hormônios de crescimento de plantas e micro e macro nutrientes minerais necessários para o crescimento das plantas.

[0025] Na primeira etapa, o resíduo agrícola, pecuário e agroindustrial é submetido a fermentação em estado sólido tanto em reatores ou pilhas. Os parâmetros de fermentação são uma temperatura entre 25 °C e 70 °C e níveis de umidade entre 55% e 80%. Esta fase dura entre 12 e 18 dias nos reatores e 5 e 10 semanas em pilhas e promove a produção de enzimas, tais como fosfatases, sulfatases, asparaginases e glutaminases em adição a substratos orgânicos e microrganismos benéficos. O fato de microrganismos patogênicos - especialmente aqueles associados com doenças

gastrointestinais, tais como *E. coli* e *Salmonella sp.* - multiplicarem-se também nesta fase faz com que seja necessário realizar uma segunda FES durante a etapa final do processo.

[0026] A duração da etapa de FES depende se a fermentação é realizada em reatores ou pilhas. Em reatores, é possível observar um padrão cíclico, onde a atividade aumenta e diminui ao longo de um período prolongado, fazendo uma fermentação mais curta necessária. Por outro lado, a atividade em pilhas após três meses de FES - onde são alcançadas temperaturas de 70 °C - é semelhante ao dos primeiros picos obtidos a partir dos reatores.

[0027] No final da primeira etapa as nanopartículas são adicionadas. Estas consistem em alofano a uma percentagem compreendida entre 10% e 40% peso/peso (matéria seca fermentada versus matéria seca de alofano). Esta etapa permite o encapsulamento das enzimas e parte dos substratos gerados anteriormente. Um dos principais objetivos na criação de um biofertilizante é para que o mesmo seja um biocatalisador eficiente, para o qual é importante a imobilização das enzimas que ele contém. A este respeito, estas nanopartículas têm uma relação de área superficial/volume ideal para servir como um transportador enzimático. Alofano é uma nanopartícula ou nanoargila que permite um grau muito elevado de imobilização enzimática. É constituído de esférulas com um diâmetro de 3 nm a 8 nm, que formam agregados porosos, permitindo a interação com a matéria orgânica e a proteção física das enzimas na referida matéria.

[0028] Durante a terceira etapa, uma segunda e mais prolongada FES é realizada durante 30 a 60 dias a uma temperatura entre 15 °C e 50 °C e com níveis de umidade entre 60% e 85%. Estas condições favorecem o desenvolvimento de processos que produzem metabólitos que controlam e eliminam bactérias patogênicas.

[0029] O produto final deste processo é um biofertilizante que contém:

a) enzimas encapsuladas, principalmente, sulfatases, fosfatases, asparaginases e glutaminases;

b) substratos orgânicos contendo P, N e S;

c) compostos orgânicos benéficos para o crescimento das plantas, tais como hormônios, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos;

d) micro-organismos benéficos para o desenvolvimento da planta.

[0030] O biofertilizante tem uma concentração de matéria orgânica de 55% a 70%, de alofano de 10% a 40%, e uma concentração de enzimas encapsuladas no alofano de: 1,09 UI g⁻¹ a 4,4 UI g⁻¹ para a fosfatase alcalina; 0,2 UI g⁻¹ a 1,2 UI g⁻¹ para a fosfatase ácida; 0,05 UI g⁻¹ a 0,10 UI g⁻¹ para arilsulfatase; 0,6 UI g⁻¹ a 1,05 UI g⁻¹ para a L-asparaginase; e 3,0 UI g⁻¹ a 4,6 UI g⁻¹ para a L-glutaminase.

[0031] Este biofertilizante contém um acúmulo de nutrientes organicamente armazenados que serão liberados por meio de ação enzimática durante o desenvolvimento das plantas, dependendo da concentração de nutrientes no solo. Estes nutrientes são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Nutrientes disponíveis no biofertilizante

Matéria orgânica	64,37%
Nitratos (N-NO ₃)	55,80 mg/kg
Amônia (N-NH ₄)	404,70 mg/kg
Nitrogênio disponível	460,40 mg/kg
Fósforo (P)	0,78%
Potássio (K)	1,20%
Cálcio (Ca)	3,08%
Magnésio (Mg)	0,30%
Ferro (Fe)	5600 ppm
Manganês (Mn)	580 ppm
Zinco (Zn)	360 ppm
Cobre (Cu)	80 ppm
Boro (B)	62,27 mg/kg
N total	3,08%
Na	0,51%

[0032] A eficácia deste biofertilizante é igual a ou maior do que a dos fertilizantes químicos, mas com um maior grau de eficiência e de sustentabilidade, uma vez que permite a reutilização de resíduos e evita a perda desnecessária de nutrientes para o ambiente, devido ao fato de apenas os nutrientes necessários para a planta serem liberados quando requisitados ao longo do tempo.

[0033] Ao contrário da compostagem que acrescenta, principalmente, substratos orgânicos e substâncias húmicas aos solos, o biofertilizante também adiciona enzimas, o que lhe permite liberar nutrientes dos substratos orgânicos em quantidades suficientes para o desenvolvimento das plantas. Na primeira etapa do processo de produção do biofertilizante, isto é, a etapa de fermentação para a produção de enzimas, é possível produzir grandes

quantidades das referidas enzimas (Tabela 2), enquanto que quantidades significativas destas enzimas não têm sido detectadas em produtos de compostagem comerciais.

Tabela 2: Quantidade de enzimas produzidas durante a fermentação

	Produção de enzima em IU/t de matéria seca fermentada
Arilsulfatase	100000
Fosfatase ácida	600000
Fosfatase alcalina	4000000
L-asparaginase	800000
L-glutaminase	2000000

[0034] Em resumo, este novo biofertilizante tem em uma formulação as vantagens de ambos os fertilizantes minerais de liberação controlada, proporcionando a planta com nutrientes disponíveis progressivamente ao longo do tempo, e de composto, a adição de substratos orgânicos, substâncias húmicas e microrganismos benéficos aos solos.

EXEMPLOS DE APLICAÇÃO

Exemplo 1: Processo de produção do biofertilizante

[0035] O estrume utilizado para os ensaios de FES foram coletados a partir de baias de engorda de bezerros na fazenda agrícola Pullami em Coihueco na região chilena de Bío-Bío.

[0036] O processo compreende três etapas, as quais são descritas abaixo:

I. Fermentação em estado sólido do estrume para produção de enzimas.

[0037] A atividade enzimática foi avaliada sob diferentes condições de temperatura e umidade durante a

fermentação em estado sólido de estrume bovino, a fim de otimizar o processo de produção da enzima.

[0038] O efeito da temperatura na atividade enzimática durante a fermentação em estado sólido de estrume bovino, foi avaliada a 25 °C, 35 °C e 55 °C.

[0039] Os reatores para o processo de fermentação em estado sólido foram projetados adaptando o sistema proposto por Grewal et al. (2006). Este sistema faz com que seja possível controlar as condições de temperatura e de umidade. O primeiro teste foi realizado a uma temperatura de 25 °C e com estrume não seco, isto é, com um nível de mais de 80% de umidade. Para o segundo teste a temperatura foi de 35% e a umidade foi de 60%, e para o terceiro teste a temperatura foi de 55 °C e a umidade foi de 60%.

[0040] A Figura 1 mostra o equipamento utilizado para o processo de fermentação. Um reator (5) foi colocado em uma incubadora (6), em que o referido reator consistia em um tubo de PVC cilíndrico de 16 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento com uma capacidade aproximada de 4 L. A base do cilindro foi coberta com uma malha de arame de metal com furos de 1x1 mm, a fim de homogeneizar o fluxo de ar de entrada. A malha de arame foi apoiada em um disco de acrílico. A fim de assegurar a fermentação aeróbia, os reatores foram ligados a uma linha de ar (3) fornecida por um sistema de arejamento externo alimentado por um compressor de 2 HP (1491,39 W) (1). O ar alimentado para dentro do reator foi tratado, em primeiro lugar com um coletor de vapor e, subsequentemente, com um filtro de ar destinado a minimizar o teor de óleo do motor do compressor. Isso garantiu que o ar estava livre de

partículas que poderiam ter afetado o processo biológico e/ou a medição da atividade enzimática. Um rotâmetro (2) regulou o fluxo de ar, o qual foi ajustado a 100 ml/min. A linha de ar foi ligada através de um tubo para um frasco de vidro com água destilada (4), no qual ocorreu borbulhamento, a fim de manter as condições de umidade estáveis nos biorreatores. A fim de medir a temperatura, um coletor de dados (7) foi utilizado que funcionava como um scanner com entradas de sensor de temperatura (termopares) conectados a um computador (8).

[0041] A cada sete dias o estrume em cada reator foi virado. Este consistia em misturar o estrume, a fim de homogeneizar. Depois de cada ciclo, uma amostra de 50 g foi retirada de cada reator. Estas amostras foram utilizadas para determinar os parâmetros físicos, químicos e bioquímicos.

[0042] Para o primeiro teste de fermentação, estrume fresco da fazenda de engorda animal foi utilizado exatamente como foi recebido, com 80% de umidade e fermentado a 25 °C para simular a temperatura ambiente durante a primavera, com três repetições.

[0043] Para o segundo teste de FES, o estrume bovino foi tratado para diminuir o nível de umidade a 60% e os efeitos da temperatura sobre a atividade enzimática foram avaliados. As temperaturas utilizadas para o teste foram de 35 °C e 55 °C, o que corresponde às temperaturas médias alcançadas durante as fases mesofílica e termofílica, respectivamente, do processo de compostagem. A atividade enzimática foi medida até se observar um comportamento repetitivo ao longo do tempo, com ciclos de aumento e

diminuição da atividade. Este estudo foi realizado durante um período de 10 semanas.

[0044] Atividade da fosfatase ácida e alcalina: A atividade enzimática foi determinada utilizando um método adaptado do proposto por Vuorinen (1993, 2000), que consiste na pesagem de 0,25 g de amostra e mistura com 1,25 ml de 62,3 mM de 4-nitrofenil fosfato em uma solução MUB pH 5,0 para determinar a atividade da fosfatase ácida e pH 9,0 para determinar a atividade da fosfatase alcalina. A enzima com o substrato foi então incubada a 30 °C durante 30 min. A mistura foi então rapidamente arrefecida em um banho de gelo e 3 ml de éter dietílico resfriados foram adicionados. A mistura foi agitada durante 60 min em um agitador refrigerado a 4 °C. Depois da agitação, 0,5 ml da solução resultante foi extraído e, para a fosfatase ácida, adicionado a 40,5 ml de solução 0,5 M de NaOH em um frasco volumétrico de 10 ml. Para a fosfatase alcalina, 1 ml da solução já contendo 4,5 ml de solução 0,5 M de NaOH foi dissolvido em 2 ml de água destilada e agitado vigorosamente. A absorbância a 420 nm foi medida, em seguida, para o extrato obtido anteriormente utilizando um espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi efetuada para determinar a concentração do produto (p-nitrofenol) na amostra. A atividade foi expressa como UI g⁻¹ do produto de fermentação seco (unidades internacionais, em função da matéria seca fermentada).

[0045] As curvas de atividade de ambas as enzimas a diferentes temperaturas do reator são apresentadas na Figura 2 para a fosfatase alcalina e na Figura 3 para a fosfatase ácida.

[0046] Na FES a 25 °C e 80% de umidade, os mais altos níveis de atividade de fosfatase alcalina foram alcançados na semana 9 do teste, com um valor de 3,40 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada, seguido pela semana 4, com um valor de 3,36 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada, como visto na Figura 2. Os mais altos níveis de fosfatase ácida foram atingidos durante a semana 7 do teste, com um valor de 1,02 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada, seguido por 0,98 g UI⁻¹ de matéria seca fermentada na semana 5 e 0,93 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada na semana 6, como pode ser visto na Figura 3.

[0047] Para a fosfatase alcalina, os valores obtidos no teste a 25 °C e 80% de umidade foram maiores do que os esperados, uma vez que, em estudos semelhantes a maior atividade enzimática de enzimas hidrolase tem sido associada com temperaturas mais elevadas, que são atingidas naturalmente durante o processo de compostagem (Vuorinen, 2000; Mondini et al., 2004). Em relação à fosfatase ácida, tal como com os resultados obtidos para a fosfatase alcalina, foi observado um comportamento cíclico para a atividade enzimática durante a FES, com valores elevados de atividade de fosfatase ácida nas semanas 7, 5 e 6.

[0048] Na FES realizada com 60% de umidade, a evolução ao longo do tempo das misturas a 35 °C e 55 °C foi caracterizada por um aumento acentuado na atividade da fosfatase alcalina na semana 3 do teste, com valores de 4,39 g UI g⁻¹ de matéria seca fermentada e 2,44 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada, respectivamente. A atividade da fosfatase ácida aumentou nas semanas 5 e 9 do teste, com valores de 1,22 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada a 35 °C e

0,24 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada a 55 °C. Em ambos os casos, os valores obtidos a 55 °C foram inferiores.

[0049] Atividade da arilsulfatase: A metodologia para a determinação da atividade enzimática descrita por Gonzalez et al. (2003) e Fornasier et al. (2002) foi adaptada, a ação da enzima hidrolítica sendo aplicada a um substrato artificial (sulfato de p-nitrofenila, pNPS), a fim de detectar o produto (p-nitrofenol, pNP) utilizando espectrofotometria a 420 nm. A quantidade de atividade enzimática foi, assim, proporcional à concentração de pNP no meio após a hidrólise. 0,25 g de material fermentado foram pesados e foram adicionados 5 ml de tampão de acetato pH 5,7 e 1,25 ml de pNPS 5 mM em uma solução tampão, e a mistura foi incubada durante 1 h a 37 °C. Após a incubação, a mistura foi arrefecida a 4 °C e 3 ml de éter de dietílico foram adicionados. A mistura foi então agitada a 200 rpm durante 1 h e 0,5 ml do sobrenadante foram misturados com 2,5 ml de NaOH 1 M e a absorbância foi determinada a 420 nm. A atividade enzimática na amostra foi quantificada por comparação com uma curva baseada na solução de referência (material fermentado sem substrato).

[0050] Como mostrado na Figura 4, um nível elevado de atividade de arilsulfatase foi registrado na semana 5 do teste a 25 °C e 80% de umidade, com um valor de 0,1094 g UI⁻¹ de matéria seca fermentada, ao passo que o nível mais baixo de atividade para este teste foi registrado na semana 1, com um valor de 0,0569 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada. O nível mais elevado de atividade de arilsulfatase para o teste com 60% de umidade e uma temperatura de 35 °C foi alcançado na semana 2, com um

valor de 0,1038 g UI⁻¹ de matéria seca fermentada, ao passo que o nível mais baixo de atividade foi observado na semana 5 com um valor de 0,0058 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada a uma temperatura de 55 °C.

[0051] Estudos sobre a atividade de arilsulfatase são especialmente raros em relação a compostagem e processos de fermentação (Cayuela et al. 2008). Tejeda et al. (2009) detectaram um nível máximo de atividade de arilsulfatase de 0,0078 UI/g durante a semana 2 do processo de compostagem, com temperaturas próximas daquelas da fase mesofílica e umidade de 52,8%, o referido valor sendo muito mais baixo do que os obtidos no presente estudo. Da mesma forma, em um estudo de compostagem com resíduos de lagares de azeite, Cayuela et al. (2007) descreveram um nível de atividade de arilsulfatase máximo de 0,0156 UI/g após 34 semanas, no final de um processo de compostagem com 40%-60% de umidade. Mondini et al. (2004), observaram níveis de atividade de arilsulfatase máximos de 0,0335 UI/g após 85 dias, com jardim e resíduos de algodão. É importante notar, contudo, que o objetivo destes estudos foi caracterizar o composto maduro ou estabilizado após o processo de degradação, enquanto que o presente estudo foi realizado em uma FES como tal, com níveis de umidade elevados, temperaturas constantes e temperaturas mais baixas.

[0052] Atividade da L-asparaginase e da L-glutaminase:
A metodologia utilizada baseou-se em dois processos: o primeiro foi descrito por Frankenberger e Tabatai (1991a, 1991b) e Keeney e Nelson (1982) para a etapa de reação enzima-substrato; e o segundo envolveu a utilização de um equipamento "amônio íon-seletivo" com uma membrana de gás,

cujo princípio baseia-se na transformação de íons de amônio em amônia a um pH superior a 11. Uma amostra de 0,5 g de fermentação foi misturada com 10 ml de tampão Tris pH 10 e 1 ml de substrato (0,5 mol/L de asparagina ou 0,5 mol/L de glutamina). Como um controle, 0,5 g de fermentado com 9 ml de tampão Tris pH 10 foram usados em conjunto com 1 ml de substrato para o qual 35 ml de $\text{Ag}_2\text{SO}_4\text{-KCl}$ foram adicionados antes do processo de incubação. Os tubos de branco foram os mesmos tubos das amostras e dos controles, mas não se adicionou qualquer substrato. Todas as amostras, com os seus tubos de branco e de controle correspondentes, foram incubadas durante 2 h a 37 °C. Após incubação e, como com o controle, 35 ml de $\text{Ag}_2\text{SO}_4\text{-KCl}$ foram adicionados às amostras para parar a reação. As amostras foram subsequentemente filtradas e a NH_3 foi destilada através de destilação a vapor e presa em ácido bórico (Sadzawka et al., 2005). Uma vez que as diferentes amostras tinham sido destiladas, elas foram tituladas com ácido sulfúrico 0,005 M (H_2SO_4). A quantidade de ácido sulfúrico consumido foi proporcional à concentração de amônio e representou a liberação do produto gerado pela enzima.

[0053] Os níveis de atividade de L-asparaginase foram maiores com a fermentação a 25 °C e 80% de umidade do que sob outras condições testadas, atingindo um valor de 1,03 UI g^{-1} de matéria seca fermentada na semana 9 do teste. No teste de fermentação a 35 °C e 55 °C com 60% de umidade, os mais altos níveis de atividade foram registados nas semanas 7 e 6, respectivamente, com um aumento visível na atividade da enzima a 55 °C, a partir da semana 6, conforme visto na Figura 5. A diferença quase não existente entre os níveis

máximos de atividade atingidos a 25 °C e 55 °C confirma a ampla faixa de temperaturas em que as enzimas funcionam. Este é descrito por El-Bessoumy et al. (2004), que afirmam que, embora a L-asparaginase atinja níveis máximo de atividade a 37 °C, mantém-se a atividade em 52% a 50 °C.

[0054] A L-glutaminase foi significativa em alcançar os mais altos níveis de atividade de todas as enzimas testadas. Sob a fermentação a 25 °C, um máximo de 4,6 UI g⁻¹ de matéria seca fermentada foi alcançado nas semanas 5 e 10, enquanto que a 35 °C e 55 °C, o nível de atividade mais elevado foi atingido a 35 °C durante as primeiras 5 semanas de fermentação, mas com níveis mais baixos do que os atingidos a 25 °C (Figura 6).

[0055] Estes resultados permitem determinar as condições ótimas de fermentação para a obtenção de uma preparação com as enzimas corretas para satisfazer os requisitos específicos de um solo. No caso, por exemplo, da produção de um biofertilizante onde é desejada uma elevada atividade da enzima fosfatase alcalina, a referida enzima pode ser obtida em 3 semanas de fermentação de estrume, a uma temperatura de 35 °C e com 60% de umidade. Por outro lado, se uma mistura com uma elevada atividade da enzima L-glutaminase é desejada, a fermentação deve ser realizada a 25 °C, com 80% de umidade e por não mais de 5 semanas. Assim, é possível obter elevados níveis de atividade enzimática a partir de um baixo custo e substratos abundantes, tais como estrume. Além disso, nem sempre é necessário tratar o estrume antes da fermentação para ajustar a umidade.

[0056] Fermentação no estado sólido em pilhas: As pilhas de estrume bovino para produção de enzimas tinham um volume mínimo de 1 m³. Neste caso, 2 pilhas com as dimensões de 3 m x 2,5 m x 1 m (comprimento, altura e largura, respectivamente) foram utilizadas para avaliar duas configurações diferentes de FES. A primeira pilha foi isolada termicamente com malha de polietileno preto preenchido com palha de trigo, enquanto que a segunda pilha foi deixada exposta. A atividade enzimática foi medida em amostras obtidas diretamente das pilhas após a FES, bem como a atividade enzimática nas condições de armazenamento à temperatura ambiente e 4 °C.

[0057] O estrume foi obtido a partir de baias de vacas leiteiras na Estação Experimental Humana do Instituto de Pesquisa de Agricultura e Pecuária (INIA) na área de Los Angeles no Chile. Aproximadamente 2 t foram coletadas em uma área coberta ao longo de um período de 3 dias e, posteriormente, transportadas para a Estação Experimental de El Nogal da Faculdade de Agronomia da Universidade de Concepción, onde o estrume foi distribuído ao longo de uma superfície de polietileno para a secagem até que um nível de 60% de umidade foi atingido. Em seguida, duas pilhas com as dimensões de 3 m x 2,5 m x 1 m (comprimento, altura e largura, respectivamente) foram criadas, uma das quais foi coberta com malha e isolamento de palha. As pilhas foram viradas 4 vezes ao dia para controlar a temperatura e molhadas com a mesma frequência para manter um nível de 60% de umidade. Após 9 dias, 4 pilhas foram criadas a partir das 2 pilhas iniciais, a fim de realizar a FES. Após 30 dias de FES a matéria foi colocada em sacos (Tabela 3).

Tabela 3: Amostragem durante a FES

Descrição	Dias após o início da FES
Primeira amostragem para medir a atividade enzimática das pilhas de FES	40
Armazenamento em sacos, a 4 °C e a temperatura ambiente	58
Segunda amostragem para medir a atividade enzimática dos sacos armazenados	58

[0058] A Figura 7 mostra a atividade das diferentes enzimas: fosfatase alcalina (a), fosfatase ácida (b) e arilsulfatase (c) depois da fermentação no estado sólido sob uma cobertura de isolamento em comparação com a atividade enzimática na pilha de fermentação sem isolamento. É possível observar uma tendência para uma atividade mais elevada na pilha coberta neste caso. A Figura 8 mostra os níveis de atividade das diferentes enzimas: fosfatase alcalina (a), fosfatase ácida (b) e arilsulfatase (c), a partir da pilha isolada (preta) e da pilha exposta (cinza) depois de terem sido armazenadas durante 37 dias. As condições de armazenagem foram: 1) em sacos, a 4 °C e 2) em sacos, à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que o fermentado a partir da pilha isolada armazenada a 4 °C tinha níveis de atividade significativamente mais elevados do que as outras amostras. Armazenadas em um armazém, a atividade enzimática diminuiu devido principalmente à perda de umidade do material fermentado. No entanto, este processo pode ser revertido pela adição de água ao produto, como pode ser visto na Figura 9.

II. Adição de alofano a um estrume fermentado para obter um biofertilizante

[0059] O alofano usado para este estudo consistiu de esférulas com um diâmetro de 5 nm.

[0060] O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de imobilização de enzimas com alofano determinando a correta proporção de alofano/estrume para o mais alto nível de atividade enzimática, bem como o momento ideal para a adição do alofano e imobilização das enzimas.

[0061] O estrume utilizado foi coletado de baias de engorda de bezerros e armazenado em um celeiro durante pelo menos 1 mês. Subsequentemente, o estrume foi seco e tratado molhando-o e triturando-o com uma máquina de lascar, após o qual foi armazenado à temperatura ambiente durante 2 semanas. Antes do início do teste, o nível de umidade do estrume foi trazido até 60%.

[0062] O teste consistiu de 2 tratamentos e três réplicas para cada um. Todos os tratamentos foram fermentados durante 16 dias a 35 °C e com 65% de umidade, com exceção para o tratamento 1, correspondendo ao estrume não fermentado. Para realizar a fermentação, foi utilizada uma câmara de incubação com condições controladas. O alofano foi adicionado a cada unidade experimental em uma proporção de 15% a 30% de matéria seca no final do processo de fermentação (após 16 dias). O estrume não fermentado sem alofano foi utilizado como um controle.

[0063] A Tabela 4 mostra as condições analisadas, onde o teor de alofano corresponde a 11% em uma base úmida. É importante notar que a concentração enzimática é diferente

para cada uma das três misturas de estrume, como as enzimas veem do próprio estrume.

Tabela 4: Condições experimentais para o teste

Proporção de alofano/estrume	Adição de alofano (dias)	Estrume (Sólido seco em gramas)	Alofano (Sólido seco em gramas)
0 / 100	Estrume	525	0
	Controle	525	0
15 / 85	16	446,25	78,75
30 / 70	16	367,5	157,5

[0064] A atividade enzimática dos fermentados com 15% e 30% de alofano foi analisada e comparada com a atividade no estrume e no fermentado sem alofano. A atividade das diferentes enzimas foi testada no material fermentado obtido, ao qual foram adicionadas duas proporções diferentes de alofano. Em resumo, a atividade enzimática foi medida no estrume não fermentado (F), estrume fermentado sem alofano (s/A) e no estrume fermentado com alofano adicionado após 16 dias, no final do processo de FES. De acordo com os resultados apresentados na Figura 10, onde os níveis de atividade da fosfatase ácida são mostrados, não houve diferenças significativas entre as misturas de 15/85 e 30/70 de alofano/fermentado. De um ponto de vista financeiro, é, portanto, aconselhável trabalhar com uma proporção de 15% de alofano a 85% da matéria fermentada.

III. Segunda fermentação no estado sólido para o amadurecimento do fermentado.

[0065] A segunda fermentação no estado sólido é realizada para reduzir o número de agentes patogênicos e obter um biofertilizante que seja inócuo para as plantas e de utilização segura. Como mostrado na Tabela 4, este processo permite uma redução significativa nos níveis de *E. coli* no material fermentado.

[0066] A fim de determinar a quantidade de agentes patogênicos presentes nas diferentes fases do processo de produção do biofertilizante, amostras foram tomadas ao longo do processo, tal como descrito abaixo:

a) Estrume bovino fermentado, fermentado durante 17 dias a 35 °C e com 65% de umidade em um reator. Amostra retirada da etapa 1.

b) Estrume bovino fermentado, fermentado em uma pilha exposta por 90 dias. Amostra retirada da etapa 1.

c) Fermentado maduro da pilha de FES. Amostra retirada da etapa 3 do processo.

[0067] Níveis de *Salmonella sp.* foram determinados usando o método do número mais provável. Assim, 100 g, 10 g e 1 g de amostras foram tomadas a partir das diferentes amostras fermentadas utilizando sacos estéreis enriquecidos com caldo de lactose, homogeneizou-se com um Stomacher e incubou-se durante 24 h a 35 °C. As misturas foram então transferidas para um meio seletivo de Rappaport-Vassiliadis para *Salmonella spp.* e incubadas durante 24 h a 35 °C. Os tubos com qualquer grau de turbidez foram transferidos para placas de ágar SS e incubados novamente durante 24 h a 35 °C. As colônias de *Salmonella* suspeitas (fermentação sem

lactose, produzindo H₂S) foram verificadas usando o sistema Remel RapID ONE.

[0068] Para a contagem de *E. coli*, foram preparados 25 g de amostras de cada tipo de fermentado, adicionou-se 225 ml de solvente e homogeneizou-se em um Stomacher. Para cultura, diferentes diluições da preparação foram inoculadas no Agar ES coliformes ChromoCult. As colônias suspeitas foram, em seguida, confirmadas por meio de testes bioquímicos (TSI, LIA, MIO, ureia e citrato).

[0069] Os resultados das contagens são mostrados na Tabela 5, onde pode ser visto que os níveis de *E. coli* diminuíram no fermentado C.

Tabela 5: Contagem de bactérias patogênicas

Etapa	Contagem de <i>Salmonella</i> (MPN g-1)	Contagem de <i>E. coli</i> (CFU g-1)
Fermentado a	< 0,3	6160000
Fermentado b	< 0,3	143000000
Fermentado c	< 3	210

Exemplo 2: Efeito do biofertilizante em uma safra de gramínea perene (*Lolium perenne L.*).

[0070] Os efeitos da formulação de biofertilizante na produção de *Lolium perenne L.* (gramínea perene) foram avaliados em relação à porcentagem de germinação, altura das plantas jovens e produção de matéria seca.

Teste de germinação:

[0071] Como uma primeira etapa, um teste foi realizado para avaliar os efeitos do biofertilizante em mudas de gramínea perene com 7 dias de idade. As sementes de gramínea perene foram pré-germinadas e transplantadas após 7 dias para vasos contendo o biofertilizante e vasos de

controle contendo o composto comercial (Vitta Frut produzido por Rosario S.A.). As plantas foram regadas com água destilada e não foram adicionados outros fertilizantes. O desenvolvimento das plantas foi registrado por 1 semana. Os resultados na Figura 11 mostram que as plantas que foram transplantadas para o composto comercial apresentaram maiores taxas de mortalidade e níveis de desenvolvimento mais baixos em comparação com as plantas tratadas com o novo biofertilizante.

[0072] Para a etapa 2, a percentagem de germinação de plantas crescidas no solo para o qual tinha sido adicionado o biofertilizante foi medida e comparada com os resultados obtidos a partir da germinação das sementes de gramínea perene em um solo não tratado com baixo teor de nutrientes (solo de controle, Tabela 6) e um solo que foi fertilizado tradicionalmente com um produto mineral. Como pode ser visto na Figura 12, a percentagem de germinação foi maior quando utilizando o biofertilizante, enquanto que o solo que foi fertilizado tradicionalmente tinha uma percentagem de germinação mais baixa do que o solo de controle (possivelmente indicando um grau de sensibilidade por parte das sementes aos fertilizantes minerais). Letras diferentes indicam diferenças significativas nas médias de cada tratamento (teste t, $p < 0,05$).

Tabela 6: Caracterização química do solo de controle

N-NO₃ ppm	N-NH₄ ppm	S ppm	P ppm	OM %	pH*	EC dS/m
1,12	3,08	2,42 MB	6 B	2,66	5,88	0,037 S/R

Teste de desenvolvimento da planta:

[0073] O estrume bovino fermentado utilizado foi preparado a partir de um processo controlado com duração de 2 semanas a 35 °C e com 60% de umidade em base húmida.

[0074] O teste foi realizado em uma câmara de incubação sob as seguintes condições: foto período de 16 horas de luz, com uma temperatura de 22 °C durante o dia e 15,5 °C durante a noite.

[0075] Vasos com um diâmetro de 15 cm foram utilizados como unidades experimentais. Estes foram cheios com 1,5 kg de solo com baixo nutriente (Tabela 6), que foi peneirado até 2 mm. Para cada unidade experimental, uma dose equivalente a 7 t ha⁻¹ de qualquer dos biofertilizantes ou fertilizantes inorgânicos com concentrações idênticas de nutrientes ao biofertilizante foi adicionado. Houve também um controle ao qual não se adicionou qualquer fertilizante. No caso do fertilizante inorgânico, N foi aplicado como ureia, P como superfosfato triplo e K como cloreto de potássio. A Tabela 7 apresenta os tratamentos e suas composições. 120 sementes de *Lolium perenne* L. ('Grasslands Nui') foram semeadas em cada unidade experimental. Uma vez que as plântulas emergiram, as unidades foram diminuídas a fim de deixar 100 plantas por unidade. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com 3 repetições.

Tabela 7: Composição de cada tratamento de fertilizante

Tratamento	Dose de nutriente	Fertilização
Controle	0	-

Biofertilizante	56,317	kg N/ha	7	t
	54,6	kg P/ha		biofertilizante
	84	kg K/ha		/ha
Fertilizante inorgânico	56,317	kg N/ha	122,428	kg urea/ha
	54,6	kg P/ha	271,813	kg TSP/ha
	84	kg K/ha	168	kg KCl/ha

[0076] 15 dias após as sementes terem germinado, a altura das plantas foi medida. Como pode ser visto na Figura 13, as plantas tratadas com o biofertilizante foram mais altas do que aquelas dos tratamentos de fertilizantes inorgânicos e controle. Além disso, e ao contrário das expectativas, as plantas tratadas com o fertilizante mineral não foram significativamente diferentes das do controle.

[0077] Após dois meses de crescimento, o rendimento em matéria seca foi medido para cada tratamento. De acordo com os resultados, as plantas tratadas com o biofertilizante deram um rendimento mais elevado de matéria seca comparado com o controle e tratamentos com fertilizantes minerais (Figura 14).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um biofertilizante, CARACTERIZADO por compreender as seguintes etapas:

a) fermentação no estado sólido para a produção de enzimas e nutrientes essenciais para a nutrição das plantas;

b) imobilização das enzimas e substratos produzidos durante a etapa a) usando nanopartículas de alofano; e

c) uma segunda fermentação para favorecer o desenvolvimento de microrganismos que melhoram a qualidade do biofertilizante.

2. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por a etapa a) ser iniciada com resíduos agrícolas, pecuários e agroindustriais e poder ser realizada em reatores ou pilhas.

3. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por a etapa a) ser realizada a uma temperatura de entre 25 °C e 70 °C, com um nível de entre 55% e 80% de umidade e durar entre 12 e 18 dias, quando realizado em reatores e entre 5 e 10 semanas, quando realizado em pilhas.

4. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por na etapa b) alofano ser adicionado em uma proporção compreendida entre 10% e 40% peso/peso em relação à matéria seca fermentada.

5. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, CARACTERIZADO por na fase b) agregados de enzima-alofano serem formados para proteger as

enzimas de degradação microbiana e aumentar a sua eficiência catalítica.

6. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa c) consistir em uma fermentação no estado sólido mais prolongada com duração entre 30 e 60 dias e ser realizada a uma temperatura de entre 15 °C e 50 °C, com um nível de entre 60% e 85% de umidade.

7. Biofertilizante, **CARACTERIZADO** por compreender:

a) enzimas encapsuladas, principalmente, fosfatases, sulfatases, asparaginases e glutaminases, em agregados de enzima-nanopartículas;

b) substratos orgânicos encapsulados do tipo hormônios de crescimento de plantas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos;

c) moléculas orgânicas e microrganismos benéficos para as plantas.

8. Biofertilizante, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por compreender uma concentração entre 55% e 70% de matéria orgânica, entre 10% e 40% de alofano e uma concentração de enzimas encapsuladas no alofano correspondente a: (1,09 a 4,4) UI g⁻¹ de fosfatase alcalina; (0,2 a 1,2) UI g⁻¹ de fosfatase ácida; (0,05 a 0,10) UI g⁻¹ de arilsulfatase; (0,6 a 1,05) UI g⁻¹ de L-asparaginase; e (3,0 a 4,6) UI g⁻¹ de L-glutaminase.

9. Biofertilizante, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por compreender ainda nutrientes imediatamente disponíveis.

10. Biofertilizante, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por permitir o crescimento de plantas

melhorado começando com a germinação da planta e o desenvolvimento da planta superior com respeito à altura e rendimento.

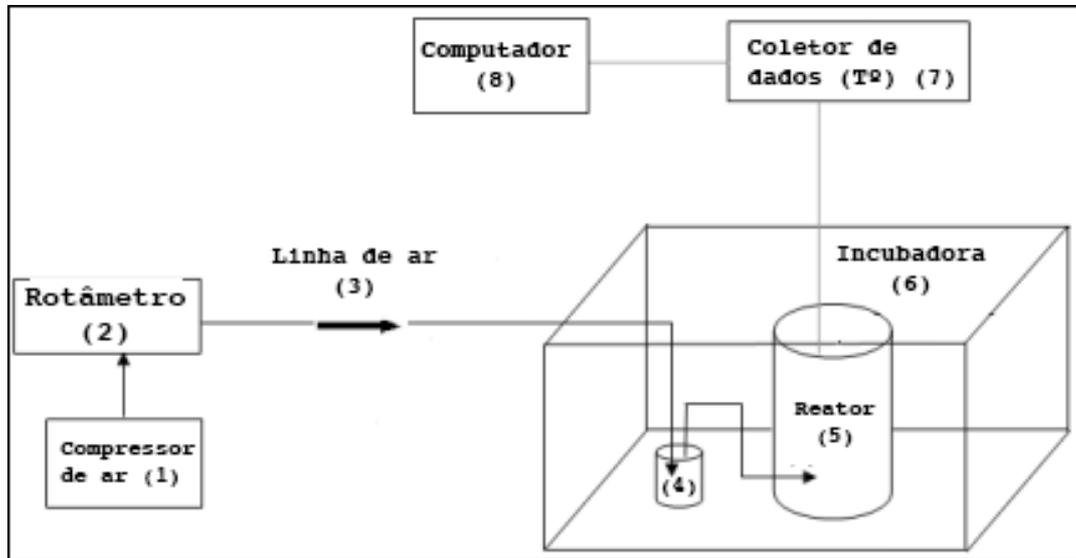


Figura 1

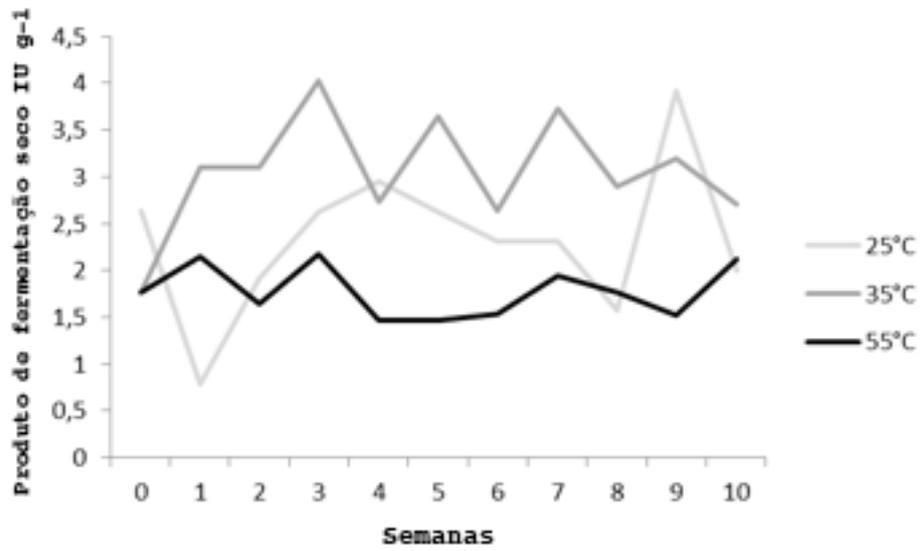


Figura 2

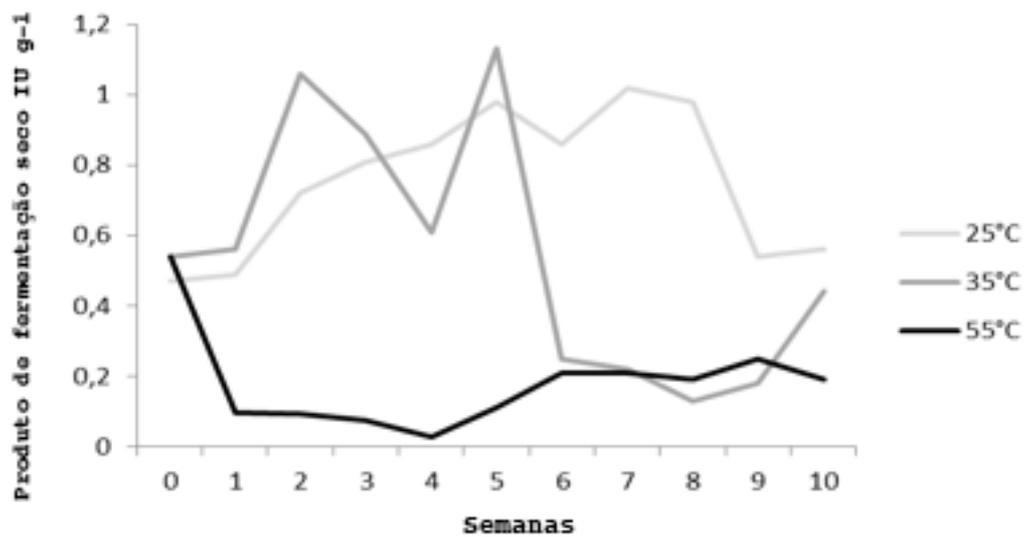


Figura 3

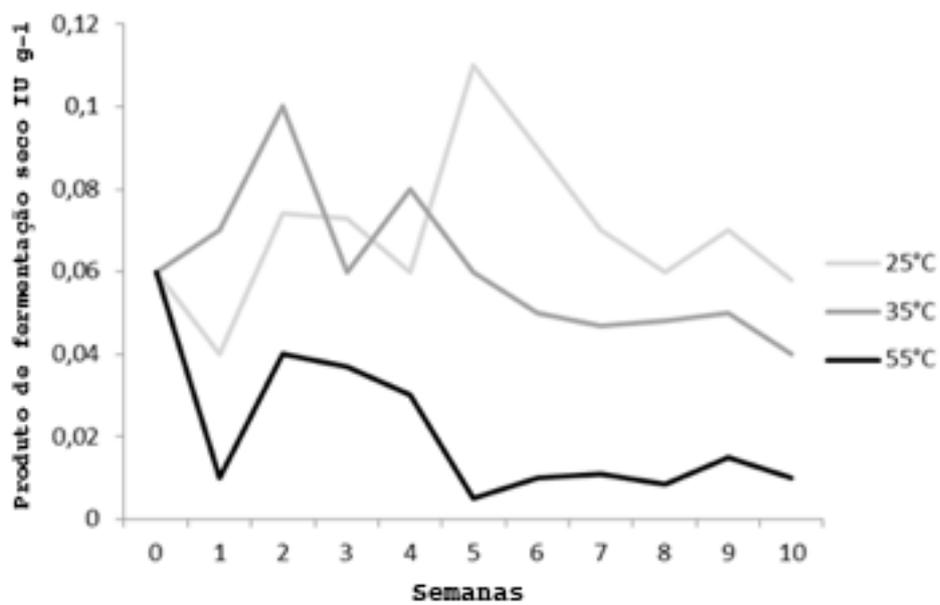


Figura 4

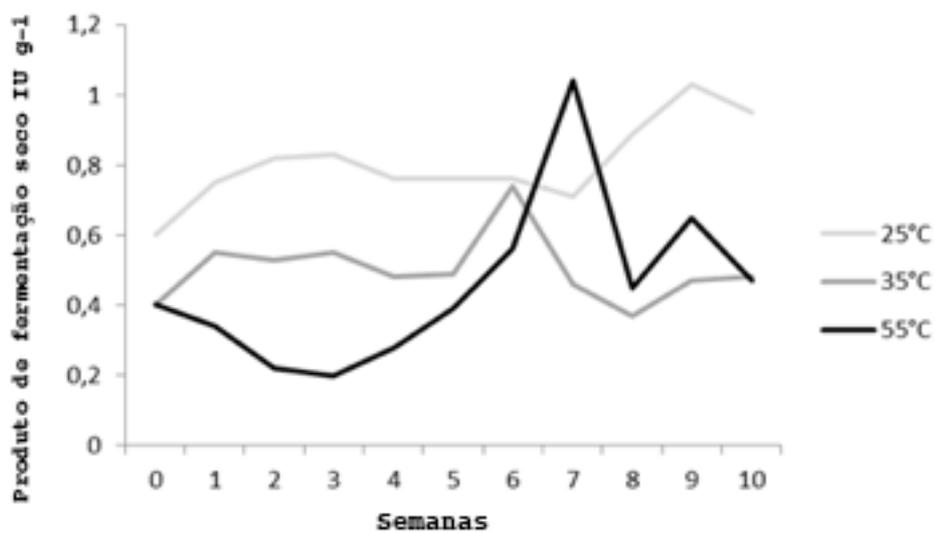


Figura 5

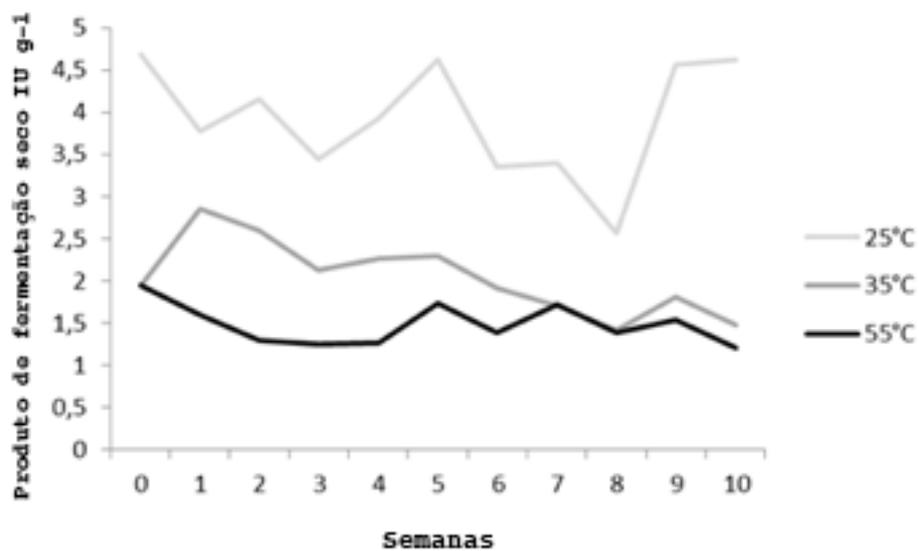


Figura 6

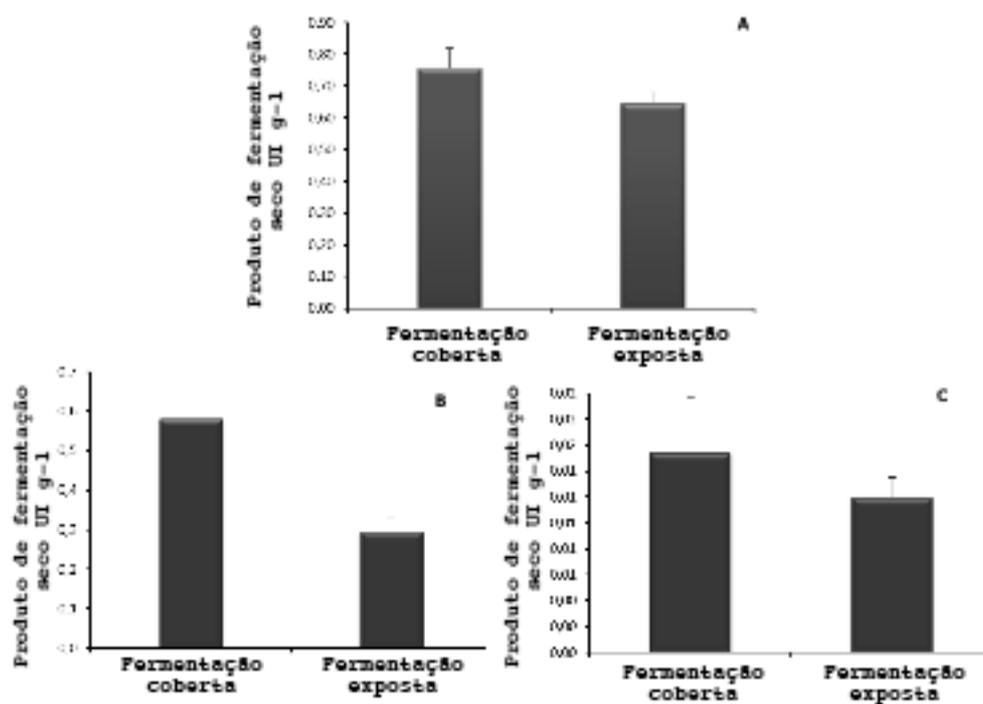


Figura 7

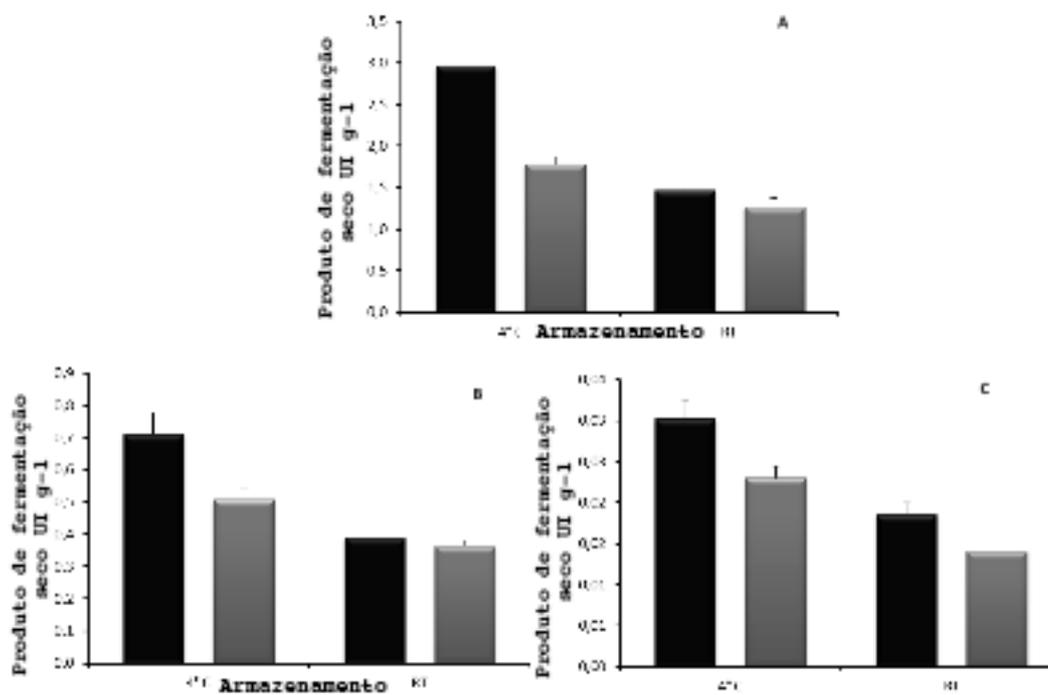


Figura 8

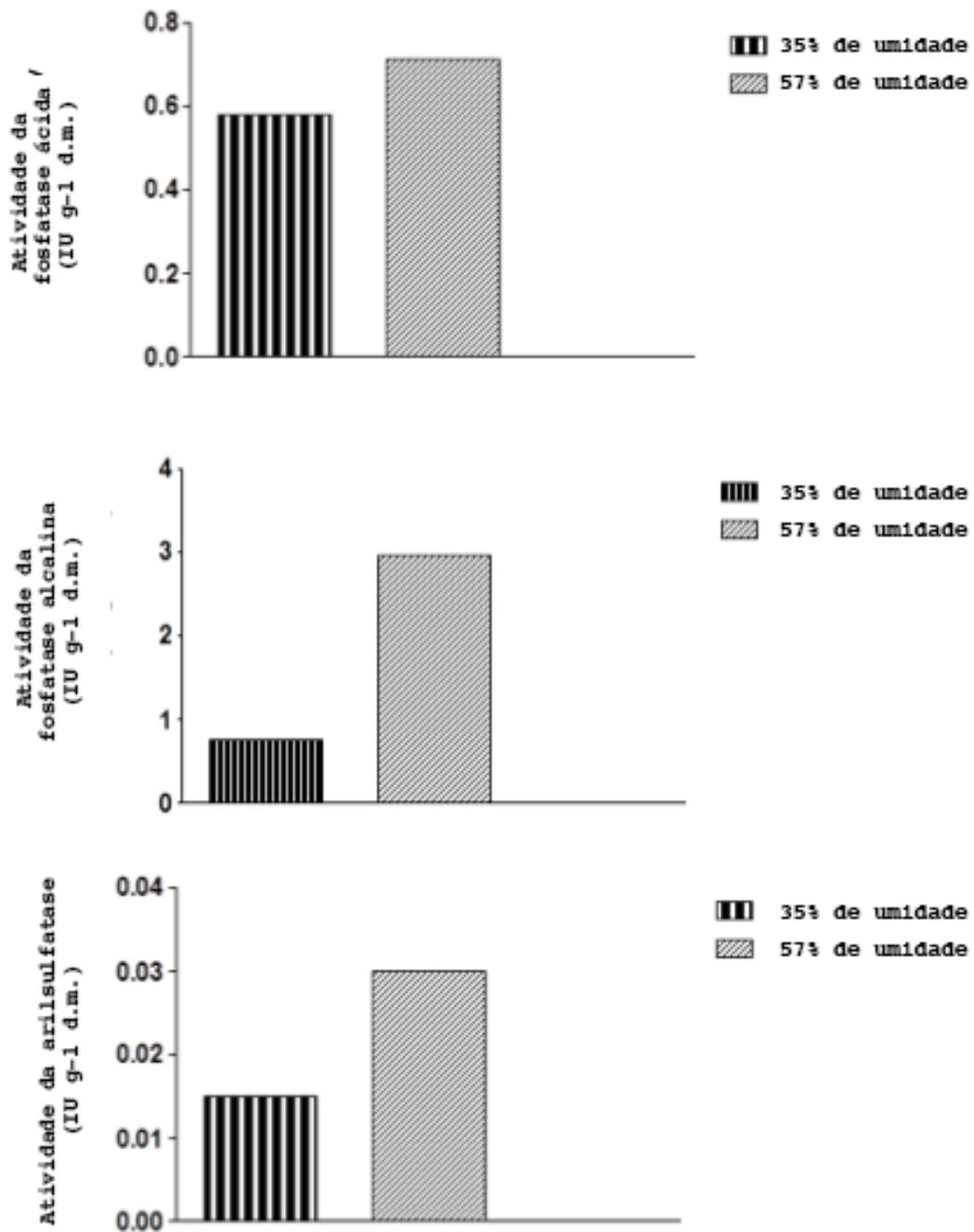


Figura 9

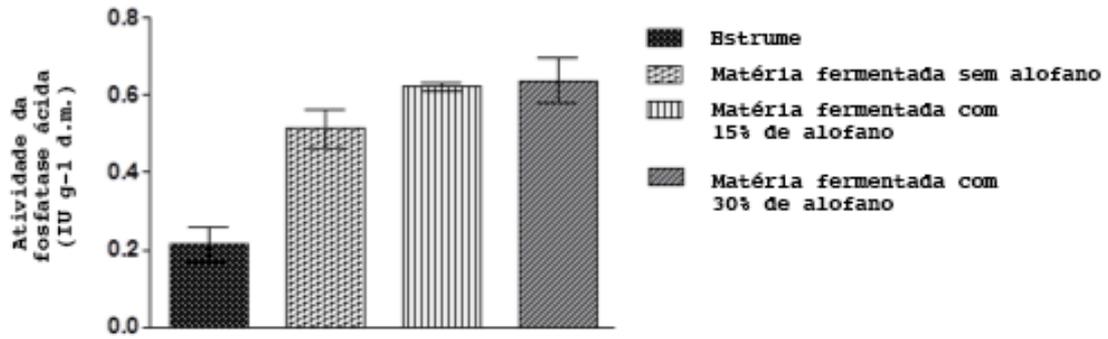


Figura 10

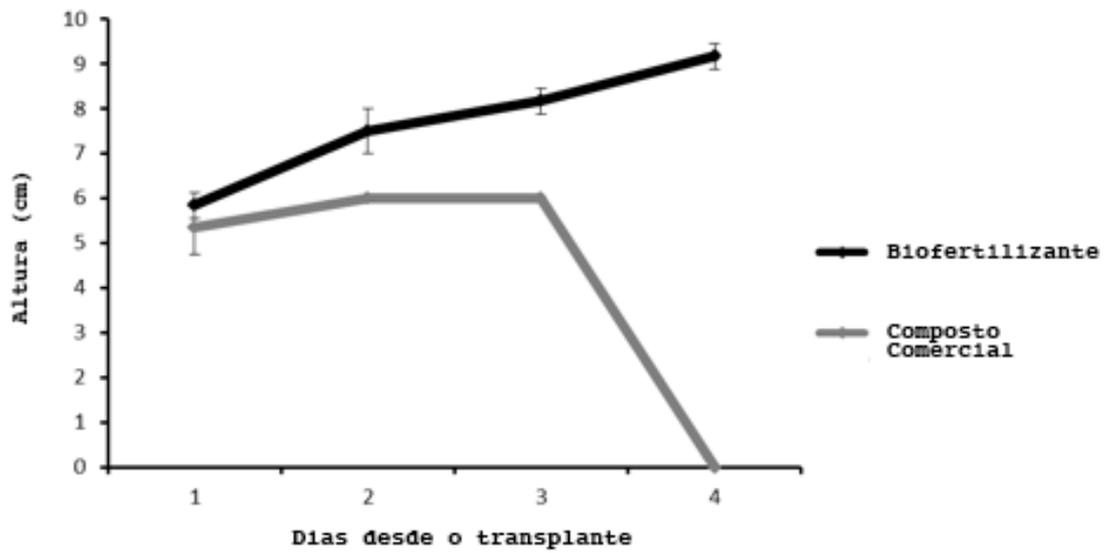


Figura 11

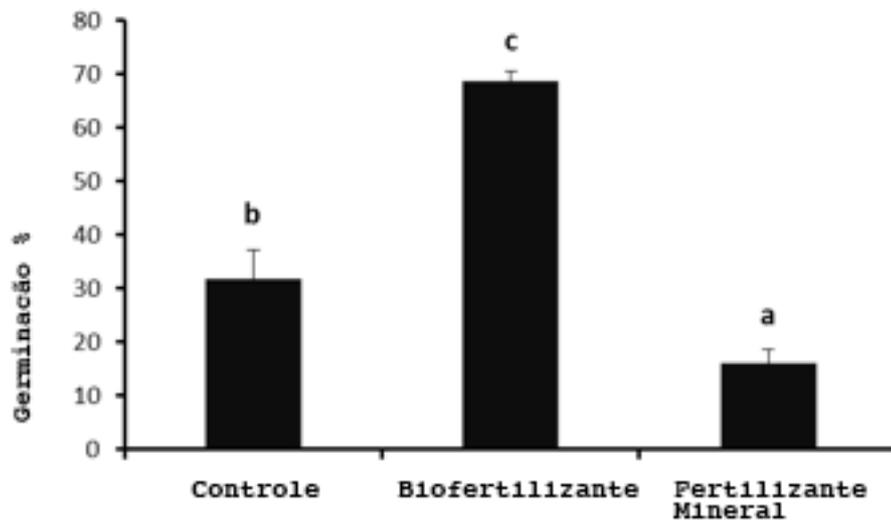


Figura 12

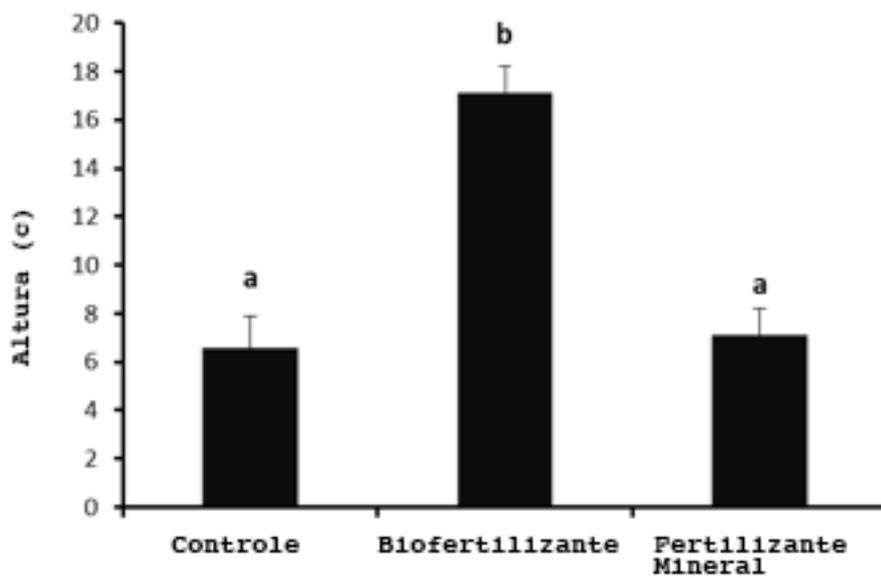


Figura 13

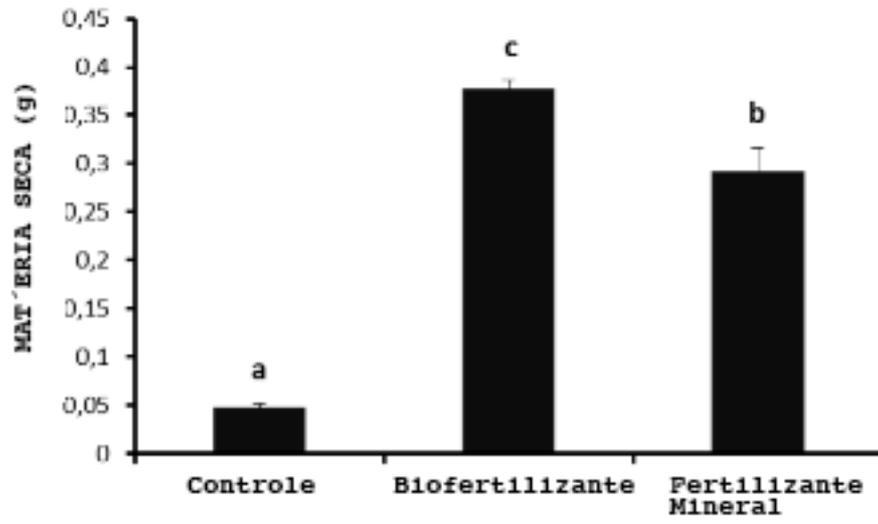


Figura 14

RESUMO

"PROCESSO PARA PRODUZIR UM BIOFERTILIZANTE COMPREENDENDO AS ETAPAS DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO, IMOBILIZAÇÃO ATRAVÉS DE NANOPARTÍCULAS DE ALOFANO E UMA SEGUNDA FERMENTAÇÃO; E O REFERIDO BIOFERTILIZANTE"

Processo para a produção de um biofertilizante, compreendendo as seguintes etapas: a) fermentação no estado sólido para a produção de enzimas e nutrientes essenciais para a nutrição das plantas; b) imobilização usando nanopartículas de alofano das enzimas e substratos produzidos durante a etapa a); e c) uma segunda fermentação para favorecer o desenvolvimento de microrganismos que melhoram a qualidade do biofertilizante. Proteção também é pretendida para o biofertilizante que é produzido a partir deste processo.

REIVINDICAÇÕES EMENDADAS

1. Processo para a produção de um biofertilizante, **CARACTERIZADO** por compreender as seguintes etapas:

a) fermentação no estado sólido (FES) para a produção de enzimas e nutrientes essenciais para a nutrição das plantas;

b) imobilização das enzimas e substratos produzidos durante a etapa a) usando nanopartículas de alofano; e

c) uma segunda fermentação para favorecer o desenvolvimento de microrganismos que melhoram a qualidade do biofertilizante.

2. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa a) ser iniciada com resíduos agrícolas, pecuários e agroindustriais e poder ser realizada em reatores ou pilhas.

3. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa a) ser realizada a uma temperatura de entre 25 °C e 70 °C, com um nível de entre 55% e 80% de umidade e durar entre 12 e 18 dias, quando realizada em reatores e entre 5 e 10 semanas, quando realizada em pilhas.

4. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por na etapa b) alofano ser adicionado em uma proporção compreendida entre 10% e 40% peso/peso em relação à matéria seca fermentada.

5. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por na etapa b) agregados de enzima-alofano serem formados para proteger as

enzimas de degradação microbiana, aumentando a sua eficiência catalítica.

6. Processo para a produção de um biofertilizante, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por a etapa c) consistir em uma FES mais prolongada com duração entre 30 e 60 dias e ser realizada a uma temperatura de entre 15 °C e 50 °C, com um nível de entre 60% e 85% de umidade.

7. Biofertilizante, **CARACTERIZADO** por compreender:

a) enzimas encapsuladas em agregados de enzima-nanopartículas correspondentes a: 1,09 UI g⁻¹ a 4,4 UI g⁻¹ de fosfatase alcalina; 0,2 UI g⁻¹ a 1,2 UI g⁻¹ de fosfatase ácida; 0,05 UI g⁻¹ a 0,10 UI g⁻¹ de arilsulfatase; 0,6 UI g⁻¹ a 1,05 UI g⁻¹ de L-asparaginase; e 3,0 UI g⁻¹ a 4,6 UI g⁻¹ de L-glutaminase; alofano de 10% a 40%;

b) substratos orgânicos para as enzimas encapsuladas do tipo nitrogênio total (3,08%) e fósforo total (0,5%);

c) entre 55% e 70% de substratos orgânicos encapsulados do tipo hormônios de crescimento de plantas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos; e

d) moléculas orgânicas e microrganismos benéficos para as plantas.

8. Biofertilizante, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** por permitir o crescimento de plantas melhorado começando com a germinação da planta e o desenvolvimento da planta superior com respeito à altura e rendimento.