



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DA ECONOMIA  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

CARTA PATENTE Nº PI 1103781-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

**(21) Número do Depósito:** PI 1103781-4

**(22) Data do Depósito:** 03/08/2011

**(43) Data da Publicação Nacional:** 30/07/2013

**(51) Classificação Internacional:** A61K 31/07; A61P 33/02.

**(54) Título:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA E PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DAS MESMAS

**(73) Titular:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, Brasileira. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: Rua XV de Novembro, 569, Centro, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-310, Brasileira

**(72) Inventor:** CARLOS RICARDO SOCCOL; VANETE THOMAZ SOCCOL; FRANCISCO MENINO DESTÉFANIS VÍTOLA; MIGUEL DANIEL NOSEDA; RICARDO CANCIO FENDRICH.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 03/08/2011, observadas as condições legais

**Expedida em:** 17/11/2020

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados



## COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA E PROCESSOS PARA PRODUÇÃO DAS MESMAS

### **Campo da invenção**

[001] A presente invenção relaciona-se de forma geral aos campos da biotecnologia, bioprocessos industriais, bioquímica, parasitologia, microbiologia, patologia, medicina e doenças infecciosas. Especificamente, trata sobre composições para inibir a multiplicação de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* ou prevenir as infecções causadas por protozoários, do gênero *Leishmaniae* processos para a produção das mesmas. Mais especificamente, trata sobre processos de fabricação do material que é utilizado nas referidas composições. Estes processos incluem etapas de cultivo micelial de Basidiomycota em biorreatores e recuperação das substâncias leishmanicidas produzidas.

### **Histórico da Invenção**

#### **Leishmanioses**

[002] Doenças infecciosas são aquelas que podem ser transmitidas, direta ou indiretamente, de uma pessoa para outra. São causadas por microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus, fungos ou parasitos. Apesar do atual sucesso alcançado no controle de algumas doenças transmissíveis, algumas apresentam quadro de persistência. Nesse grupo, estão as leishmanioses (nas formas clínicas, visceral e tegumentar), para as quais, além da manutenção de elevadas prevalências, constata-se expansão na área de ocorrência, em geral associada às modificações ambientais provocadas pelo homem (LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.), The

Leishmaniasis in Biology and Medicine 1, Academic Press, London, 1–120, 1987).

[003] As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. O parasito se desenvolve em um organismo vivo (mamíferos ou flebotomíneos) e se multiplica por fissão binária. Essencialmente são consideradas zoonoses, mas tornam-se antropozoonoses quando há ingresso do homem no ciclo de transmissão do parasito (ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. International Journal for Parasitology 30: 1269-1281, 2000).

[004] O ciclo celular de *Leishmania* tem duas fases distintas: uma no hospedeiro vertebrado (forma amastigota) e outra no hospedeiro invertebrado (forma promastigota). A forma amastigota, com formato arredondado e sem flagelos, parasita o citoplasma de macrófagos infectados de hospedeiros vertebrados. A transmissão habitual acontece por meio de insetos de várias espécies de vetor (flebotomíneos), que adquirem o parasito ao picar animais infectados (reservatórios). O parasito diferencia-se e é transmitido ao homem ou a outros mamíferos sob a forma promastigota, de formato alongado e flagelado.

[005] A manifestação da doença ocasiona o surgimento de lesões cutâneas ou o comprometimento de órgãos internos. Sua gravidade é ditada especialmente pela condição do sistema imune do indivíduo infectado. Neste processo, a espécie envolvida de *Leishmania* também tem papel fundamental. Conforme a interação, uma grave desregulação fisiológica ocorre nos tecidos em que há presença de formas amastigotas do parasito.

[006] A infecção pode ocorrer de dois modos: visceral ou cutânea. A forma visceral (LV) é uma doença sistêmica que acomete

particularmente fígado, baço, medula óssea e linfonodos. A forma cutânea acomete pele e mucosas (nasal e oral), manifestando-se clinicamente nos formatos clássico, tegumentar de mucosa e tegumentar difusa. Uma forma cutânea, também denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), inclui ao mesmo tempo lesões cutâneas e de mucosa.

[007] A doença é endêmica em muitas partes do mundo e tem ampla distribuição. Está localizada, majoritariamente, em regiões de pobreza, sendo reconhecidamente negligenciada. Além do envolvimento da saúde e do bem-estar psicológico do doente, constitui um significativo entrave ao desenvolvimento socioeconômico (THOMAZ-SOCCOL et al. A new focus of cutaneous leishmaniasis in the central area of Paraná State, southern Brazil. *Acta Tropica* 111: 308–315, 2009).

[008] Existem aproximadamente 350 milhões de pessoas sob risco de infecção em 98 países; destes, 72 são países em desenvolvimento. A prevalência da leishmaniose é de aproximadamente 12 milhões de casos em todo o mundo. Estima-se a revelação de dois milhões de novos casos anuais, sendo 1,5 milhões correspondentes a leishmaniose cutânea e 500 mil de leishmaniose visceral (WHO - World Health Organization. *Leishmaniasis and Leishmania/HIV co-infection. WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases*. Acessado em: <http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/Leishmaniasis>, 2011).

[009] A leishmaniose visceral tem ampla distribuição, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 90% de novos casos ocorrem no Brasil, Índia, Nepal, Bangladesh e Sudão (WHO - World Health Organization, *Research on leishmaniasis*. Acessado em: <http://www.who.int/leishmaniasis/> 2011); (GRADONI, L.; SOTERIADOU, K.;

LOUZIR, H.; DAKKAK, A.; TOZ, S. O.; JAFFE, C.; DEDET, J.-P.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C.; DUJARDIN, J.C. Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. *Tropical Medicine & International Health* 13: 1272–1276, 2008).

[010] A Leishmaniose Tegumentar Americana, a forma cutânea mais grave, distribuiu-se amplamente no continente americano, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Está presente principalmente no Brasil, com casos em todos os estados do Brasil. (CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *The yellow book, health information for travelers*, CDC 2010); (SVS / MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2.ed. Brasília, 2007).

[011] De modo geral, as leishmanioses são de difícil erradicação, pois possuem uma diversidade de aspectos epidemiológicos e clínicos. Mesmo para patologias semelhantes, há grande variação de antigenicidade, que impede o desenvolvimento de uma vacina eficaz (SUVERCHA BHARDWAJ A, R.K. VASISHTA B, SUNIL K. ARORA. Vaccination with a novel recombinant *Leishmania* antigen plus MPL provides partial protection against *L. donovani* challenge in experimental model of visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 121: 29–37, 2009).

### **Fungos, macromicetos e micotecnologia**

[012] Os fungos são organismos com características diferentes dos vegetais e animais. São eucariotos. Podem ser aquáticos, terrestres e até mesmo aéreos. São aclorofilados e, portanto, heterotróficos, devendo retirar o material e a energia para sua constituição da decomposição de material orgânico. Podem ser sapróbios, parasitas ou simbiontes. São capazes de realizar reprodução assexuada e, em alguns casos, sexuada. Alguns são unicelulares, como as leveduras e outros são

multicelulares, como os mofos, bolores e cogumelos. As espécies de fungos são classificadas como pertencente ao reino Fungi, porém algumas são consideradas, por alguns autores, como pertencentes a outros reinos, como protozoa e chromista (PUTZKE, J.; PUZKE, M. T. L. Generalidades sobre fungos. In: Os reinos dos fungos. 2ª ed., 1(1): 21-30, ed. Edunisc, Santa Cruz do Sul, 2004).

[013] Estima-se que exista aproximadamente 1,5 milhão de espécies de fungos no planeta. Destas, menos de 70.000 são conhecidas (HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95, (6): 641-655, 1991). Menos de 0,5% das espécies conhecidas são utilizados para processos produtivos industriais. Pelo menos 3.608 espécies de fungos nativos do Brasil foram descritas e encontram-se na Lista de Espécies da Flora, organizada pelo Ministério do Meio Ambiente. Das espécies nativas descritas, 523 são endêmicas (MAIA, L. C.; CARVALHO JR., A. A. Fungos. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do RJ. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000003>, 2010).

[014] Macromicetos ou macrofungos, popularmente conhecidos como cogumelos, são fungos que produzem corpos de frutificação visíveis a olho nu. O ciclo de vida desses organismos pode ser resumido nas seguintes etapas: 1. Os corpos de frutificação produzem esporos; 2. Os esporos, sob condições propícias, germinam dando origem a estruturas multicelulares filamentosas mononucleadas haplóides, denominadas micélio primário; 3. Dois micélios primários compatíveis se fundem para formar um micélio com dois núcleos haplóides por célula, denominado micélio secundário; 4. o micélio secundário é capaz de gerar os tecidos que dão origem a corpos de frutificação, fechando o ciclo. Os macromicetos podem ser classificados em basidiomicetos ou ascomicetos, dependendo da forma das estruturas que produzem esporos. A maioria dos macrofungos são basidiomicetos (ARORA, D.

What is a mushroom. In: Mushrooms Demystified, a comprehensive guide to the fleshy fungi, 2ª ed., c.1, pp.4-5. Ten Speed Press, Berkeley, 1986); (WRIGHT, J. E.; ALBERTÓ, E. Hongos. Guia de la region pampeana. v. I (Hongos con laminillas). Ed. L.O.L.A., Buenos Aires, 2002).

[015] Podemos utilizar o termo micotecnologia para classificar as tecnologias decorrentes do emprego de fungos. Desde as fermentações mais tradicionais, como as empregadas na produção de bebidas alcoólicas, pães e queijos até o cultivo micelial submerso de linhagens geneticamente modificadas podem ser consideradas micotecnologias. Outros exemplos incluem: o cultivo de cogumelos comestíveis e medicinais, a produção de alimentos fermentados como o shoyu, o tempêh e o misô (SOCCOL, C. R. Aproveitamento do resíduo de soja da fabricação de extrato hidrossolúvel para a elaboração de pasta de soja fermentada. In: IX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Curitiba, 1986); (SOCCOL, C. R. Aproveitamento do resíduo de soja da fabricação do extrato hidrossolúvel para a elaboração de molho fermentado de soja. In: III Encontro Sul Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Londrina, 1988).

[016] Alguns produtos de aplicação industrial, como o ácido cítrico e diversas enzimas, também são produzidos em larga escala através do cultivo de fungos filamentosos (MACIEL, G. M.; VANDENBERGUE, L. P. S.; HAMINIUK C. W. I.; SOCCOL, C. R.; Characterization and stability of xylanase produced by SSF with *Aspergillus niger*, using sugar cane bagasse and soybean meal as substrate. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. Anais SINAFERM 2007, p. 1-13, Curitiba, 2007); (RODRIGUEZ, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; ROEPCKR, C. B. S.; SOCCOL, C. R. Increase of citric acid production by solid-state fermentation using citric pulp as substrate and random mutagenesis induced by UV in *Aspergillus niger*. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos - Anais

SINAFERM 2007, p.1-10, GRAFFIT, Curitiba, 2007). Uma aplicação de grande destaque na atualidade é a produção de biocombustíveis, notadamente o etanol, a partir da fermentação dos mais variados substratos por leveduras. Os substratos usuais são ricos em mono e dissacarídeos (SIQUEIRA, P.; KARP, S.; CARVALHO, J.; STURM, W.; RODRIGUEZ-LEON, J.; THOLOZAN, J.; SINGHANIA, R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology* 99:8156-8163, 2008), porém está em fase de pesquisa o chamado etanol de segunda geração, que poderá ser obtido a partir de diversos materiais lignocelulósicos através de processos que dependem tanto de fungos filamentosos, como de leveduras (**PI0221003887192**; SELEGHIM, P.; POLIKARPOV, I. Desafios para transformar conceitos em realidade. In: *Scientific American Brasil*, 87: 32-37, Dossiê Biocombustível, 2009).

[017] Outra aplicação com potencial grandemente inexplorado no Brasil é o cultivo de cogumelos. Existem dezenas de espécies de cogumelos comestíveis e medicinais produzidos comercialmente no mundo inteiro (LEIFA, F.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; PAN, H. Production of mushrooms. In: *Advances in Fermentation Technology*. (Org.: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C.-G.), AsiaTech Publisher, INC, v. 1: 445-46, Nova Deli, 2008). Destas, apenas quatro são produzidas em grande escala no país (URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, 2005). Seguindo uma tendência atual de procura por alimentos saudáveis, espera-se que o consumo possa aumentar nos próximos anos, se houver um aumento na produção de novas espécies e uma queda nos preços. Pouco se sabe sobre a comestibilidade de macromicetos nativos de distribuição mais restrita, porém diversas espécies apresentam textura e

aroma atrativos. Mais estudos sobre composição química e toxicidade devem ser conduzidos, com o objetivo de identificar espécies potencialmente comestíveis (MEIJER, A. A. R. Biodiversidade de macrofungos da Mata Atlântica com potencial de uso na alimentação. Em: Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe (SIRGEALC), anais do congresso, Embrapa, Brasília, 1999).

[018] Devem existir muitas espécies comestíveis desconhecidas na Mata Atlântica, levando em consideração o número de espécies comestíveis conhecidas em alguns países micófilos. O investimento em pesquisa nessa área é estratégico. Há um mercado promissor no próprio país e de uma maneira mais imediata, nos países micófilos, especialmente na Europa e na Ásia (NASS- National Agricultural Statistics Service. Mushrooms statistics. U. S. Department of Agriculture. Acessado em: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/>); (BOA, E.Wild edible fungi, a global overview of their use and importance to people. In: Non-wood forest products, 17, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, 2004).O Brasil é um grande produtor agroindustrial e madeireiro. Da mesma forma, é um grande produtor de resíduos lignocelulósicos, como palhas, cascas, bagaços, sabugos, farelos, etc. Estes materiais geralmente são queimados para obtenção de energia ou misturados a adubos ou rações animais. Nenhuma destas aplicações apresenta tantas vantagens como a produção de etanol ou o cultivo de cogumelos.Além de gerar produtos de alto valor comercial, o resíduo gerado após o cultivo de cogumelos tem propriedades nutricionais incrementadas em relação aos substratos antes do cultivo, devido à biomassa micelial desenvolvida e a decomposição do substrato pelas enzimas fúngicas. Por esse motivo, os resíduos lignocelulósicos tornam-se melhores componentes de rações e adubos depois de utilizados como substrato para cultivo de macromicetos (FAN, L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. *Flammulina velutipes* on coffee husk and

coffee spent-ground. Braz. Archives of Biology and Technology 44: 205-212, 2001); (BEAUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Cultivo do fungo comestível *Lentinula edodes* em resíduos agroindustriais do Paraná através do uso de fermentação no estado sólido. Boletim do CEPPA 14(1), 1996); (STAMETS, P. Cultivating gourmet mushrooms on agricultural waste products. In: Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, c.18, p.181-189, ed. Ten Speed Press, Berkeley, 1993); (STAMETS, P. Maximizing substrate's potential through species sequencing. In: Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms, c.18, pp.419-422, ed. Ten Speed Press, Berkeley, 1993). Não apenas os resíduos agroindustriais e da indústria madeireira podem ser utilizados, mas, a exemplo da China, diferentes espécies de capim podem ser cultivadas para obtenção de biomassa para o cultivo de fungos. Nos países asiáticos, dezenas de espécies de cogumelos comestíveis e medicinais são cultivadas utilizando-se esta técnica, elegantemente nomeada "jun-cao", que significa literalmente cogumelo-capim em chinês. Pesquisadores da Embrapa testaram com sucesso, diversas espécies de capim nativas do Brasil para cultivar diferentes espécies de macromicetos (URBEN, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, 2005).

[019] Os fungos são excelentes decompositores de matéria orgânica, constituindo literalmente os recicladores da natureza. Esta capacidade pode ser utilizada eficientemente para a degradação de poluentes em estações de tratamento de efluentes ou mesmo em acidentes ambientais, através da utilização de inóculos adequados. As indústrias serão cada vez mais pressionadas a procurar alternativas de processamento para os seus resíduos nocivos, visando à transformação destes em substâncias úteis ou, no mínimo, mais amigáveis ao meio ambiente e à saúde. A resposta muitas vezes poderá vir da micotecnologia (STAMETS, P. The medicinal mushroom forest/

Mycorestoration. In: Mycelium running: how mushrooms can help save the world. pp.33-120, Ten Speed Press, 2005); (SOCCOL, C. R.; VANDENBERGUE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; DECHECHI, E.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Bioremediation: an important alternative for soil and industrial wastes clean-up. Indian Journal of Experimental Biology 41: 1030-1045, Nova Deli, 2003).

[020] Algumas outras aplicações possíveis são a utilização de fungos para controle biológico de pragas e o uso de fungos ectomicorrízicos como inoculantes. Ambas aproveitam relações ecológicas naturais: parasitismo e simbiose, respectivamente. Habilidades metabólicas muito específicas dos fungos podem ser exploradas para a biotransformação de moléculas. Novos esteróides já estão sendo produzidos desta forma. Esteróides tradicionais são adicionados ao meio de cultivo e a versão modificada das moléculas é extraída ao fim do processo. As modificações provocadas pelas enzimas fúngicas precisariam de um grande número de etapas para serem realizadas de maneira totalmente sintética (MOORE, D. Fungi in medicine- antibiotics and other pharmaceuticals. In: Slayers, saviors, servants and sex. An exposé of kingdom fungi. 2(5):1-7. Springer-Verlag, Nova York, 2001).

[021] O número de espécies de fungos atualmente disponível para a pesquisa nos bancos de germoplasma ao redor do mundo é bastante grande. Estima-se que mais de 1.600.000 cepas de microrganismos, incluindo mais de 500.000 linhagens de fungos sejam mantidas no mundo inteiro, atualmente, graças ao trabalho de mais de 6.000 pessoas. O Brasil é um dos países que mantém o maior número de coleções de linhagens de microrganismos. De acordo com o World Federation for Culture Collections (WFCC), existem pelo menos 60 instituições que dispõem de bancos de germoplasma microbiano no Brasil, mantendo aproximadamente 150.000 cepas de microrganismos

(WFCC- World Federation for Culture Collections. The culture collection in this world. WDCM Statistics. Acessado em: <http://wdcm.nig.ac.jp/statistics.html>. 2011).

### **Potencial Biotecnológico de fungos**

[022] Diversos produtos obtidos a partir de fungos se destacam por suas aplicações na área farmacêutica. O exemplo mais clássico é a penicilina, produzida por fungos do gênero *Penicillium*, descoberta em 1928 e amplamente utilizada até os dias atuais. Uma série de outros antibióticos também foi descoberta em fungos, como por exemplo: a cefalosporina, o ácido fusídico e a griseofulvina. Macromicetos também têm sido considerados quanto à produção de antibióticos (OLIVEIRA-SOUZA, C. M. C.; SOCCOL, C. R.; LEIFA, F.; PARADA, J. L.; DELINSKI G. Atividade antimicrobiana dos caldos da fermentação submersa de *Lentinus edodes*. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos- Anais SINAFERM, p.1-8, 2007); (MOORE, D.; Fungi in medicine- antibiotics and other pharmaceuticals. In: Slayers, saviors, servants and sex. An exposé of kingdom fungi. 2(5): 1-7. Springer-Verlag, Nova York, 2001).

Existem muitas outras importantes substâncias de aplicação medicinal produzidas por fungos. A ciclosporina é um imunossupressor, que inibe a rejeição de órgãos transplantados. A gliotoxina é uma substância imunomoduladora, também útil no pós-operatório do transplante de órgãos. A mevinolina é um agente hipocolesterolêmico, cujos derivados pravastatina, lovastatina e sinvastatina constituem as substâncias ativas principais de medicamentos que renderam bilhões de dólares nos anos 90 (**US 6,372,462**); (MOORE, D. Fungi in medicine- antibiotics and other pharmaceuticals. In: Slayers, saviors, servants and sex. An exposé of kingdom fungi. 2(5): 1-7. Springer-Verlag, Nova York, 2001).

[023] As substâncias de aplicação farmacológica mais importantes derivadas de macromicetos são provavelmente uma série de polissacarídeos com ação antitumoral indireta, derivados de várias espécies, incluindo *Lentinula edodes*, *Schizophyllum commune*, *Grifola frondosa* e *Ganoderma lucidum*. Sugere-se que estes polissacarídeos modulam o sistema imunológico, favorecendo o combate a tumores, aumentando a resistência a infecções e controlando reações alérgicas. Produtos como cápsulas, xaropes, pós e ampolas injetáveis são correntemente receitados e ministrados paralelamente à quimioterapia e radioterapia em alguns países asiáticos (**US 7,682,615**); (RUBEL, R.; DALLA SANTA, H. S.; FERNANDES, L. C.; FILHO, J. H. C. L.; FIGUEIREDO, B. C.; DI BERNARDI, R.; MORENO, A. N.; LEIFA, F.; SOCCOL, C. R. High immunomodulatory and preventive effects against Sarcoma 180 in mice fed with ling zhi or reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphylophoromycetideae) mycelium. International Journal of Medicinal Mushrooms 10: 37-48, 2008); (CHANG, S.-T.; MSHIGENI, K. E. Mushrooms and human health: their growing significance as potent dietary supplements. University of Namibia. Namibia, 2001).

[024] Outras atividades medicinais detectadas, através da aplicação de metodologias científicas, em substâncias derivadas de macromicetos incluem: atividade antioxidante, hipocolesterolêmica, hipotensiva, hepatoprotetora, antimicrobiana, antiparasitária e mesmo antiviral (SOCCOL, C. R.; DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; VITOLA, F. M. D.; LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. Mushrooms - a promising source to produce pharmaceutical and nutraceutical bioproducts. In: Current topics on bioprocesses in food industry (ed. Koutinas, A.; Pandey, A.; Larrouche, C.), v. 2, Asiatech, 2008); (RUBEL, R.; DALLA SANTA, H. S.; LIMA FILHO, J. H. C.; LEIFA, F.; VITOLA, F. M. D.; SOCCOL, C. R. Diet supplemented with *Ganoderma lucidum* shown preventive effect against development of Sarcoma 180 in mice. In: XVI Simpósio Nacional

de Bioprocessos. Anais SINAIFERM 2007. GRAFFIT, CD. p.1-11, Curitiba, 2007); (RUBEL, R.; DALLA SANTA, H. S.; LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Hypolipidic action on mice after intaking feed supplemented with *Ganoderma lucidum*. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil. Anais: EMBRAPA Documentos, 116: 190. Brasília, 2004); (CHANG, S.-T.; MSHIGENI, K. E.; Mushrooms and human health: their growing significance as potent dietary supplements. University of Namibia. Namibia, 2001).

[025] No Brasil, apenas produtos derivados de *Agaricus brasiliensis* (sin. *A. subrufescens*), conhecido como "cogumelo-do-sol", são popularmente empregados para diversas finalidades medicinais. Trata-se de uma espécie nativa do interior do estado de São Paulo, levada ao Japão nos anos 70 para ser estudada. Algumas atividades farmacológicas foram detectadas em experimentos científicos com esta espécie. Destas, podem ser destacadas: atividade imunomoduladora e antitumoral (LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J. L.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and Characterization of the Exopolysaccharides Produced by *Agaricus brasiliensis* in Submerged Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, 151: 283-294, 2008); (ALMEIDA J. M.; SOCCOL, C. R.; RUBEL, R.; DALLA-SANTA, O. R.; DALLA SANTA H. S. Seleção de cepas e estudos de diferentes parâmetros na produção de biomassa e extração de exo e intra polissacarídeos de *Agaricus brasiliensis*. In: IX Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Anais IX ERSCTA. p. 01-04, UFPR, Curitiba, 2007); (DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Hypocholesterolemic activity of *Agaricus blazei* in mice. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil. Anais: EMBRAPA Documentos, 116, p.193, Brasília, 2004); (DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.;

LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Anti-tumoral effect of supplemented feed with *Agaricus blazei* on Sarcoma 180-bearing mice. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, Anais: EMBRAPA Documentos, 116: 193-194, Brasília, 2004); (LEIFA, F.; SOCCOL, A.T.; GERMANO, S.L.; PANDEY, A.; RAU, R.; PEDROSO, A.L.; SOCCOL, C.R. Production of extra-celular polyssaccharides by *Agaricus blazei* Murrill in submerged fermentation and antitumor effect. Int. J. Medicinal Mushrooms 4: 39-45, 2002).

[026]O grupo do pesquisador Carlos Ricardo Soccol realizou trabalhos pioneiros nesta importante área tecnológica. Foi um dos primeiros no Brasil a avaliar o potencial de resíduos agroindustriais como substrato para diversos bioprocessos, inclusive o cultivo de macromicetos (LEIFA, F.; PANDEY, A. & SOCCOL, C. R. In: Proceedings, 3rd International conference on mushroom biology and mushroom products, Sydney, Australia, pp.293-311, 1999); (BEAUX, M. R.; SOCCOL, C. R. Cultivo do fungo comestível *Lentinula edodes* em resíduos agroindustriais do Paraná através do uso de fermentação no estado sólido. Boletim do CEPPA, 14(1), 1996); (TONIAL, T. M.; SOCCOL, C. R.; RAMOS, L. P.; CHIARELLO, M. D. Produção de biomassa e metabólitos por *Volvariella volvacea* em fermentação submersa a partir de refugo de batata e mandioca. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), 14(2): 205-216, Curitiba, 1996). Contribuiu em muitas áreas da micotecnologia, incluindo a produção de metabólitos como ácido láctico e ácido cítrico, produção de enzimas, fármacos, biocombustíveis, nutracêuticos, antibióticos, biopigmentos, bioaromas, tratamento de efluentes, biorremediação, dentre outras aplicações (**PI0221003887192**); (SOCCOL, C. R.; DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; VITOLA, F. M. D.; LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. Mushrooms- a promising source to produce pharmaceutical and

nutraceutical bioproducts. In: Current topics on bioprocesses in food industry (ed. Koutinas, A.; Pandey, A.; Larrouche, C.), v. 2, Asiatech, 2008); (SOCCOL, C. R.; VANDENBERGUE, L. P. S.; WOICIECHOWSKI, A. L.; DECHECHI, E.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Bioremediation: an important alternative for soil and industrial wastes clean-up. Indian Journal of Experimental Biology, 41: 1030-1045, Nova Deli, 2003).

Alguns dos trabalhos mais importantes deste grupo foram:

[027]Estudo da ação antitumoral *in vivo* de polissacarídeos produzidos pelo cultivo micelial submerso de *Agaricus brasiliensis* (LEIFA, F. Production of extra-cellular polyssaccharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state culture and its antitumor effect. 111 p. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, UFPR, Curitiba, 2003); (LEIFA, F.; SOCCOL, A.T.; GERMANO, S.L.; PANDEY, A; RAU, R.; PEDROSO, A.L.; SOCCOL, C.R. Production of extra-celular polyssacaharides by *Agaricus blazei* Murrill in submerged fermentation and antitumor effect. Int. J. Medicinal Mushrooms 4: 39-45, 2002). Utilização de diversos resíduos agroindustriais como substrato para o cultivo de diversas espécies de macromicetos (LEIFA, F.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; PAN, H. Production of mushrooms. In: Advances in Fermentation Technology. (Org.: PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C.-G.), AsiaTech Publisher,INC, v. 1, p. 445-46, Nova Deli, 2008); (SOCCOL, C. R.; LEIFA, F.; Coffee residues for shiitake cultivation. In: Mushroom grower's handbook. 1(2): 110-113, MUSHWORLD, Seul, 2005).

[028]Avaliação de uma série de parâmetros associados a propriedades farmacológicas das espécies *Ganoderma lucidum* e *Agaricus brasiliensis*, incluindo: atividade antitumoral *in vivo*, atividade hipocolesterolêmica (dentre outras alterações no perfil lipídico) e imunomodulação. Citometria de fluxo foi utilizada para quantificar alterações nas principais populações de linfócitos e no perfil de citocinas produzidas em camundongos alimentados com cereais

fermentados pelo micélio dos macrofungos citados. Foram detectadas atividades farmacológicas significativas em todas as áreas pesquisadas. As metodologias implantadas serão úteis na prospecção de substâncias em macromicetos nativos (DALLA SANTA H. S.; SOUSA, N. J.; PITTNER E.; DALLA SANTA, O. R.; SOCCOL, C. R. Controle Biológico de Pragas de *Ilex paraguariensis* (A.St.-Hil) com Fungo *Beauveria* sp.; Floresta (UFPR. Impresso), 39: 67-76, 2009); (DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Hypocholesterolemic activity of *Agaricus blazei* in mice. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil. Anais: EMBRAPA Documentos, 116,p.193, Brasília, 2004); (DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Anti-tumoral effect of supplemented feed with *Agaricus blazei* on Sarcoma 180-bearing mice. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, Anais: EMBRAPA Documentos, 116: 193-194, Brasília, 2004); (RUBEL, R; DALLA SANTA, H. S.; LEIFA, L.; LORQUIN, J.; LIMA FILHO, J. H. C.; FIGUEIREDO, B. C.; URBEN, A. F.; SOCCOL, C. R. Immunestimulating activity of supplemented feed with *Ganoderma lucidum* on Sarcoma 180-bearing mice. In: II Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil, Anais: EMBRAPA Documentos 116, p.191, Brasília, 2004); (SOCCOL, C. R.; RUBEL, R.; SANTA, H. S. D.; LEIFA, F. Produção de exopolissacarídeos por *Agaricus brasiliensis* e *Ganoderma lucidum* em cultura submersa e avaliação da ação antitumoral em animais. In: Second International Symposium on Mushrooms in Brazil. Anais II SICOG. EMBRAPA 1: 165-169, Brasília, 2004). Estudos relativos à produção de enzimas por diversos fungos, especialmente deuteromicetos. Uma enzima de interesse, cuja produção vem sendo otimizada nos laboratórios da UFPR é a fitase, útil no processamento de rações, por promover maior absorção de nutrientes, especialmente fósforo, pelos animais (SPIER, M. R.; LETTI, L. A.

J.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. A simplified model for *A. niger* FS3 growth during phytase formation in solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52: 151-158, 2009); (SPIER, M. R.; GREINER, R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Phytase production using citric pulp and other residues of the agro-industry in SSF by fungal isolates. *Food Technology and Biotechnology* 46: 178-182, 2008); (SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; RODRIGUEZ-LEON, D. E.; ARAKAKI, A.; SCHEIDT, G. N.; SOCCOL, C. R. Comparison of phytase production by a new fungus isolated strain in different types of bioreactor. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. *Anais SINAFERM 2007*. p. 1-9, Curitiba, 2007). Outras enzimas fúngicas, com importantes atividades catalíticas, pesquisadas no laboratório incluem xilanases, amilases e proteases (MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; HAMINIUK C. W. I.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of xylanase produced by SSF with *Aspergillus niger*, using sugar cane bagasse and soybean meal as substrate. In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos. *Anais SINAFERM 2007*, p. 1-13, Curitiba, 2007); (SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGUE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Production and characterization of amylases by *Aspergillus niger* under solid-state fermentation using agroindustrial products. *International Journal of Food Engineering*, 2: 1-19, 2006); (SOCCOL, C. R.; KRIEGER, N.; VANDENBERGUE, L. P. S.; LEBEAULT, J. M. Production of proteolytic enzymes by filamentous fungi in solid state fermentation. In: 3º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Rio de Janeiro, 1997). Outra linha de pesquisa do grupo constitui o estudo do potencial antioxidante e antitumoral de extratos obtidos a partir do cultivo micelial submerso de linhagens combinadas de macromicetos (**PI0221003887192**).

[029] O laboratório de bioprocessos mantém um banco de cepas de macromicetos com aproximadamente uma centena de linhagens de mais de 80 diferentes espécies, aproximadamente 20 isoladas da

Mata Atlântica. Os micélios são mantidos por repique periódico e refrigeração a 4°C. Outras técnicas para preservação por longos períodos estão sendo testadas, como liofilização e criopreservação em nitrogênio líquido e freezer -80°C. A fabricação de fármacos utilizando fungos demonstra, portanto, grande potencial. Especialmente no caso de medicamentos obtidos a partir de macromicetos, a afirmação é confirmada pelas vendas mundiais estimadas em mais de \$10 bilhões de dólares por ano. Além do mais, estas vendas tendem ao crescimento desde 2003, quando foram lançados medicamentos cosméticos feitos com shiitakes. Antes da expansão da tecnologia, fungos eram cultivados em meio líquido, principalmente para estudos sobre a fisiologia (Johnson & Johnson Consumer Companies, Inc. Discover the Science of Active Naturals, Natural shiitake, 2005. Acessado em: <http://www.aveeno.com/active-naturals-shiitake> 2011).

### **Diversidade macrofúngica regional**

[030] A maioria das espécies de macrofungos da Floresta Ombrófila Mista é saprófita. Um número relativamente menor de espécies é facultativa ou obrigatoriamente ectomicorrízica. Há ainda espécies que são parasitas de plantas, artrópodes, nematódeos e mesmo de outras espécies de fungos (MEIJER, A. A. R. Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-Paraná. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Florestas. Colombo, 2008).

[031] Os fungos decompositores de madeira podem ser classificados como podridão branca ou podridão marrom. Os fungos da podridão branca são capazes de produzir enzimas para decompor tanto celulose e hemicelulose como lignina. Os fungos da podridão marrom sintetizam enzimas que degradam seletivamente celulose e hemicelulose, mas não lignina (PANDEY, K. K.; PITMAN, A. J. FTIR studies of

the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 52: 151-160, 2003). Um pequeno número de espécies de fungos da podridão marrom e um grande número de espécies da podridão branca são encontrados na Mata de Araucária (MEIJER, A. A. R. Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-Paraná. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Florestas. Colombo, 2008).

[032] Apenas em tecidos do pinheiro-do-paraná foram encontradas pelo menos 135 espécies de macrofungos (118 no estado do Paraná) (MEIJER, A. A. R. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal* 68: 1-55, 2006). Tais fungos podem ser interessantes do ponto de vista tecnológico. Com a aplicação da micotecnologia, resíduos da agroindústria e da indústria madeireira podem ser convertidos em bioprodutos de alto valor agregado, que vão desde cogumelos comestíveis e medicinais até etanol, antibióticos, antitumorais (SELEGHIM, P.; POLIKARPOV, I. Desafios para transformar conceitos em realidade. In: *Scientific American Brasil* 87: 32-37, Dossiê Biocombustível, 2009); (SOCCOL, C. R.; DALLA SANTA, H. S.; RUBEL, R.; VITOLA, F. M. D.; LEIFA, F.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T. Mushrooms- a promising source to produce pharmaceutical and nutraceutical bioproducts. In: *Current topics on bioprocesses in food industry* (ed. Koutinas, A.; Pandey, A.; Larroche, C.), v. 2, Asiatech, 2008); (STAMETS, P. The medicinal mushroom forest/ Mycorestoration. In: *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*. pp.33-120, Ten Speed Press, 2005) e compostos antiparasitários, como é o caso da presente patente.

[033] Não é simples estimar a diversidade fúngica na Mata Atlântica. É possível que existam 8.400 espécies de fungos na Floresta Ombrófila Mista e estima-se que existam pelo menos 2.000 espécies de

macrofungos no estado do Paraná. Apenas 976 destas espécies foram descritas em trabalhos científicos e não mais que algumas dezenas foram pesquisadas em busca de aplicações tecnológicas (MEIJER, A. A. R. Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-Paraná. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Florestas. Colombo, 2008).

### **Exploração da biodiversidade macrofúngica na Mata Atlântica**

[034] Um número relativamente pequeno de pesquisadores esteve e está envolvido com o estudo da biodiversidade fúngica da Mata Atlântica. Os primeiros registros da coleta de macrofungos nesta região datam do século XVIII, porém apenas começaram a ser mais bem documentadas a partir do século XIX. O primeiro fungo coletado no Brasil, que se tem registro, foi um exemplar de *Pycnoporus sanguineus*, coletado pelo francês Philibert Commerson, próximo à baía de Guanabara, em 1767 (FIDALGO, O. A história da micologia brasileira: I. Brasil colônia. Revista Brasileira de História da Ciência, v.- nº2, 1985).

[035] Dentre os botânicos estrangeiros que chegaram ao Brasil a partir de 1816, alguns coletaram e descreveram macrofungos, porém apenas um pequeno número de espécies nas primeiras décadas de trabalho. Destacam-se os pioneiros K. F. P. Von Martius (alemão), C. G. Beaugré (francês), W. J. Burchell (britânico), H. A. Weddell (francês), H. W. von Fernsee (austríaco) e A. F. M. Glaziou (francês). Em 1828, instalou-se na Bahia, o micólogo suíço J. S. Blanchet, que dentre outras realizações, coletou o material tipo de *Lentinula boryana*, espécie popularmente conhecida como “shiitake americano” (MATA, J. L.; PETERSEN, R. H.; HUGHES, K. W. The genus *Lentinula* in the Americas. Mycologia 93(6): 1102-1112, 2001).

[036] A coleta de macrofungos na Mata Atlântica começou a se intensificar a partir da segunda metade do século XIX e início do século

XX. Em 1877, Berkeley & Cooke publicaram uma lista de todos os macrofungos conhecidos até então. O espanhol J.I. Puiggari, que chegou ao Brasil também em 1877, coletou muitos macrofungos na fronteira entre os estados de São Paulo e Paraná, de 1881 a 1889. Outros coletores que contribuíram significativamente nesta fase foram C.A.W. Schwacke (alemão), A. Puttemans (Belga), e especialmente os alemães F.A.G.J. Möller e E.H.G. Ule. O material usualmente era enviado a micólogos, no exterior, para descrição e classificação. Esses micólogos estrangeiros foram: J.P.F.C. Montaigne (francês; 1784-1866), J.-H. Leveillé (francês; 1796-1870), M.J. Berkeley (britânico; 1803-1889), P.C. Hennings (alemão; 1841-1908), C.L. Spegazzini (italiano; 1858-1926) e o próprio Möller (1860-1922). Outros pesquisadores coletaram macrofungos em território brasileiro no século XX, porém não na Floresta Atlântica, mas principalmente na Floresta Amazônica e algumas regiões do Rio Grande do Sul (MEIJER, A. A. R. Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-Paraná. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Florestas. Colombo, 2008).

[037] Otero & Cook (OTERO, J. I.; COOK, M. T. A bibliography of mycology and phytopathology of Central and South America, Mexico and the West Indies. Journal of the Agricultural University, 21: 249-486, Puerto Rico, 1937) publicaram uma bibliografia de toda a literatura micológica existente na América do Sul e América Central até então. Desde essa época muitos micólogos estrangeiros coletaram macromicetos na Mata Atlântica. Os mais importantes foram R. Singer (alemão; 1906-1994) e E.J.H. Corner (britânico; 1906-1996). Mesmo a pequena porção argentina da Mata Atlântica recebeu importantes micólogos estrangeiros, incluindo o próprio R. Singer, além dos taxonomistas argentinos J.E. Wright e M. Rajchenberg (WRIGHT, J. E.;

ALBERTÓ, E. Hongos. Guia de la region pampeana. v. I (Hongos con laminillas). Ed. L.O.L.A., Buenos Aires, 2002).

[038] Cientistas brasileiros começaram a colaborar nos estudos da microbiota da Mata Atlântica apenas no início do século vinte. Os principais representantes dessa fase são A.P. Viégas (1906-1986) e A.C. Batista (1916-1967). Pesquisadores do Instituto de Botânica (SP), fundado em 1938, também realizaram importantes estudos sobre macromicetos coletados na Mata Atlântica e diversos assuntos relacionados à micologia. A.R. Teixeira (1918-2003), M.E.P. Kauffmann-Fidalgo (1928-1970), O. Fidalgo (1928-) e J.S. Furtado (1934-) foram os cientistas do Instituto de Botânica que mais desenvolveram pesquisa na área de macromicetos (FIDALGO, O. Introdução à história da micologia brasileira. *Rickia*, 3: 1-44, 1968).

[039] O pesquisador que mais se destaca atualmente na descrição e classificação de espécies de macrofungos nas florestas de pinheiro-do-Paraná é o holandês André de Meijer. Ele tem realizado um extenso trabalho na região desde 1979 (MEIJER, A. A. R. Mycological work in the Brazilian state of Paraná. *Nova Hedwigia* 72: 105-159, 2001). A lista mais completa de espécies de macrofungos do Paraná já publicada é de sua autoria (MEIJER, A. A. R. Preliminary list of the macromycetes from the Brazilian state of Paraná. *Boletim do Museu Botânico Municipal* 68: 1-55, 2006). Publicou recentemente um livro, pela editora da Empresa Brasileira de Tecnologia Agropecuária (EMBRAPA), contendo descrições detalhadas e ilustrações de cem espécies notáveis (MEIJER, A. A. R. *Macrofungos notáveis das florestas de pinheiro-do-Paraná*. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Florestas. Colombo, 2008). A Lista de Espécies da Flora Brasileira cita diversas vezes o seu trabalho.

[040] Mesmo com todo o trabalho citado, restam muitas espécies de macromicetos ainda não descritas cientificamente nesta região da

Mata Atlântica. Muitas mais ainda por serem isoladas, cultivadas e estudadas. Temos à disposição uma enorme biblioteca química e genética, constituída por inúmeras espécies de organismos com inimagináveis capacidades metabólicas e imensurável potencial biotecnológico.

### **O gênero *Perenniporia***

[041] Classificação: Fungi, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Polyporales, Polyporaceae, *Perenniporia*. *Perenniporia* Murrill 1942 é um gênero de fungo cosmopolita, abrangente, que foi largamente expandido nas últimas décadas, como consequência de múltiplas adições de novas espécies, ou da transferência de taxa existentes. No presente, pelo menos 77 espécies são descritas como pertencentes a este gênero, incluindo algumas espécies neotropicais (DECOCK, C.; RYVARDEN, L. *Perenniporiella* gen. nov. segregated from *Perenniporia*, including a key to neotropical *Perenniporia* species with pileate basidiomes. *Mycology Research*, 107(1):93–103, 2003); (DAI, Y.-C.; NIEMELÄ, T.; KINNUNEN, J. The polypore genera *Abundisporus* and *Perenniporia* (Basidiomycota) in China, with notes on *Haploporus*. *Annales Botanici Fennici* 39: 169-182, 2002).

[042] De acordo com a definição moderna o gênero apresenta estrutura de hifas di ou trimítica, com grampos nas hifas generativas. Os basidiósporos apresentam paredes lisas e espessas, sendo globosos a elipsóides, hialinos a amarelados e freqüentemente truncados. As hifas vegetativas e esporos apresentam-se dextrinóides em um grau variável. Os fungos deste gênero pertencem ao grupo dos causadores da chamada “podridão branca” da madeira (DAI, Y.-C.; NIEMELÄ, T.; KINNUNEN, J. The polypore genera *Abundisporus* and *Perenniporia* (Basidiomycota) in China, with notes on *Haploporus*. *Annales Botanici Fennici* 39: 169-182, 2002). Os basidiomas são perenes, ressupinados a

pileados, com píleo liso, ocráceo a preto com a maturação (GERBER, A.L.; NEVES, M.A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 22(2): 185-193, 1999).

[043] A espécie tipo, *Polyporus medulla-panis* (Jaqu.: Fr.), foi selecionada por Cooke em 1953 (RYVARDEN, L.; *Genera of polypores - Nomenclature and taxonomy*. Fungiflora, Oslo, 1991). Estudos como (RYVARDEN, L. African polypores – a review. *Belgian Journal of Botany*. 131: 150-155, 1998) e (PARMASTO, E.; HALLENBERG, N. The genus *Abundisporus* (Hymenomycetes, Basidiomycotina). *Karstenia* 40: 129-138, 2000) discutem a dificuldade de separar os gêneros *Abundisporus*, *Loweporus* e *Perenniporia*. Refere-se ao gênero *Perenniporia sensu lato* como incluindo os gêneros *Abundisporus* e *Loweporus*.

[044] O artigo publicado por (BOLDIN, J.; MUGNIER, J. ; CANALES, R. *Taxonomie moleculaire des Aphylophorales*. *Mycotaxon* 66: 445-491, 1998) apresenta estudos sobre o grupo dos Aphylophorales, aplicando técnicas de biologia molecular. A comparação de seqüências da região ITS do DNA de 360 espécies levou ao reconhecimento de 12 ordens: Atheliales, Botryobasidiales, Fomitopsidales, Hericiales, Hymenochaetales, Hyphodermatales, Lachnocladiales, Perenniporiales, Phanerochaetales, Phlebiales, Podoscyphales e Trametales.

[045] Segundo (DAI, Y.-C.; NIEMELÄ, T.; KINNUNEN, J. The polypore genera *Abundisporus* and *Perenniporia* (Basidiomycota) in China, with notes on *Haploporus*. *Annales Botanici Fennici* 39: 169-182, 2002) foram ressaltadas as características: coloração dos esporos e reação com Azul de Algodão. Os esporos de espécies do gênero *Perenniporia* são hialinos e cianófilos. As hifas vegetativas das espécies também são cianófilas.

[046] As espécies deste gênero estão altamente dispersas pelo mundo. Espécimens de diversas espécies foram encontrados no

Uruguai, Cuba, Porto Rico, África, Itália, Costa Rica, China, Venezuela, Argentina, Brasil, Paquistão, Antilhas Francesas, Ilhas Samoa, Peru, Colômbia, Filipinas, Panamá, Trinidad-Tobago, Java, Marrocos, Nova Zelândia, Sibéria Central, Guiana Francesa, Austrália, Estados Unidos, Canadá, Taiti, Índia, Japão e Coréia (DECOCK, C.; FIGUEROA, S.H. Studies in *Perenniporia Navisporus ortizii*, a synonym of *Perenniporia martius*, and a note on *Navisporus* and *Perenniporia* in Cuba. Cryptogamie, Mycology, 21(3):153-162, 2000); (GERBER, A.L.; NEVES, M.A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. Revista Brasileira de Botânica 22(2): 185-193, 1999).

[047] Em (DAI, Y.-C.; NIEMELÄ, T.; KINNUNEN, J. The polypore genera *Abundisporus* and *Perenniporia* (Basidiomycota) in China, with notes on *Haploporus*. Annales Botanici Fennici 39: 169-182, 2002), estão listadas e descritas 24 espécies do gênero encontradas na China. Estão registradas em (GIBERTONI, T.B. Aphylophorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004) novas ocorrências de quatro espécies do gênero *Perenniporia* na região nordeste do Brasil: *P. aurantiaca*, *P. contraria*, *P. martiusii* e *P. medulla-panis*, nos estados de Alagoas, Paraíba, Pernambuco, Sergipe e Rio Grande do Norte. Este trabalho oferece chaves para identificação das diferentes espécies de *Perenniporia* descritas.

[048] No artigo (GERBER, A.L.; NEVES, M.A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. Revista Brasileira de Botânica 22(2): 185-193, 1999) foram descritas sete espécies do gênero, para a região sul do país, incluindo o primeiro registro da espécie *P. martius* para o estado do Paraná. Pelo menos treze espécies deste gênero foram registradas ao todo para esta região:

<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
<i>P. contraria</i> (Berk. & Curt.) Ryv.	(RYVARDEN, L. Type studies in the Polyporaceae – 20 Species described by G. Bresadola. Mycotaxon 33:303-327, 1988),
<i>P. detrita</i> (Berk.) Ryv.	(RYVARDEN, L. Type studies in the Polyporaceae - 16 Species described by J. M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. Mycotaxon 20: 329-363, 1984).
<i>P. glaucopora</i> (Lloyd)Ryv.	(JESUS, M.A. Contribution to the knowledge of wood-rotting fungi in Brazil. II. Checklist of fungi from Maracá Island, Rondônia State. Mycotaxon 57:323-329. 1996).
<i>P. inflexibilis</i> (Berk.)Ryv.	(RYVARDEN, L. Type studies in the Polyporaceae - 16 Species described by J. M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. Mycotaxon 20:329-363, 1984),
<i>P. martius</i> (Berk.) Ryv.	(RYVARDEN, L. Type studies in the Polyporaceae - 16 Species described by J. M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. Mycotaxon 20: 329-363, 1984).
<i>P. medulla-panis</i> (Jacq.: Fr.) Donk	(RYVARDEN, L. Type studies in the Polyporaceae - 16 Species described by J. M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. Mycotaxon 20: 329-363, 1984)

	<p>(RAJCHENBERG, M.; MEIJER, A.A.R. New and noteworthy <i>Polypores</i> from Paraná and São Paulo States, Brazil. <i>Mycotaxon</i> 38:173-185. 1990)</p> <p>(LOGUERCIO-LEITE, C.; GERBER, A.L. Non-pileate <i>Polypores</i> on Santa Catarina Island, SC, Brazil. <i>Mycotaxon</i> 64:285-301, 1997)</p>
<i>P. neofulva</i> (Lloyd) Ryv.	<p>(RYVARDEN, L.; Type studies in the Polyporaceae - 22. Species described by C. G. Lloyd in <i>Polyporus</i>. <i>Mycotaxon</i> 38:83-102, 1990)</p> <p>(GUGLIOTTA, A.; CAPELARI, M. Polyporaceae from Ilha do Cardoso, SP, Brazil. <i>Mycotaxon</i> 56: 107-113; 1995)</p>
<i>P. ochroleuca</i> (Berk.) Ryv.	<p>(RYVARDEN, L.; Type studies in the Polyporaceae - 16 Species described by J. M. Berkeley, either alone or with other mycologists from 1856 to 1886. <i>Mycotaxon</i> 20:329-363, 1984)</p>
<i>P. ohiensis</i> (Berk.) Ryv.	<p>(LOGUERCIO-LEITE, C.; WRIGHT, J.E. Contribution to a biogeographical study of the austro-american xylophilous polypores (Aphylophorales) from Santa Catarina Island, SC, Brazil. <i>Mycotaxon</i> 41: 161-166, 1991).</p>
<i>P. piperis</i> (Rick) Rajch.	<p>(RAJCHENBERG, M. Type studies of Polyporaceae (Aphylophorales) described by J. Rick. <i>Nordic Journal of</i></p>

	<p>Botany 7:553-568, 1987).</p> <p>(SILVEIRA, R.M.B.; GUERRERO, R.T. Aphylophorales poliporóides (Basidiomycetes) no Parque Nacional de Aparados da Serra, Rio Grande do Sul. Boletim do Instituto de Biociência - UFRGS 48:1-127, 1991)</p> <p>(LOGUERCIO-LEITE, C.; WRIGHT, J.E. Contribution to a biogeographical study of the austro-american xylophilous polypores (Aphylophorales) from Santa Catarina Island, SC, Brazil. Mycotaxon 41:161-166, 1991),</p>
<i>P. sinuosa</i> Ryv.	(RYVARDEN, L. New and noteworthy polypores from tropical America. Mycotaxon 28: 525-541; 1987).
<i>P. stipitata</i> Ryv.	(RYVARDEN, L.; New and noteworthy polypores from tropical America. Mycotaxon 28:525-541; 1987).
	(LOGUERCIO-LEITE, C.; WRIGHT, J.E. Contribution to a biogeographical study of the austro-american xylophilous polypores (Aphylophorales) from Santa Catarina Island, SC, Brazil. Mycotaxon 41:161-166, 1991).
<i>P. tephropora</i> (Mont.) Ryv.	(WRIGHT, J.E. <i>Loweporus</i> , a new genus of pore fungi. Memoirs of The New York Botanical Garden 28: 225-231, 1976).

***Perenniporia martiusii* (Berkeley) Ryvarden 1972**

[049] A espécie originalmente classificada e nomeada como *Polyporus martius*, por Hooke, em 1956, foi reclassificada e renomeada como *Perenniporia martius* por Ryvarden, em 1972. Ocorrências desta espécie foram registradas em diversos pontos do território brasileiro, incluindo os estados: Bahia (GÓES-NETO, A. Polypore diversity in the state of Bahia, Brazil: a historical review. *Mycotaxon* 72: 43-56, 1999), Paraná (RYVARDEN, L.; MEIJER, A. A. R. Studies in neotropical polypores 14. New species from the state of Paraná, Brazil. *Synopsis Fungorum* 15: 34-69; 2002), Rio Grande do Sul (GROPOSO, C.; LOGUERCIO-LEITE, C. Fungos poliporóides xilófilos (Basidiomycetes) da Reserva Biológica Tancredo Neves, Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, sér. bot.*, 57(1): 39-59, 2002), São Paulo (TEIXEIRA, A.R. Himenomicetos brasileiros IV. *Bragantia* 8: 75-80. 1948), Santa Catarina (GERBER, A.L.; NEVES, M.A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 22(2): 185-193, 1999), Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (GIBERTONI, T.B. Aphyllorphorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004); (GIBERTONI, T.B.; SANTOS, P.J.P.; CAVALCANTI, M.A.Q. Ecological aspects of *Aphyllorphorales* in the Atlantic rain forest in northeast Brazil. *Fungal Diversity* 25: 49-67, 2007). Ocorpos de frutificação de *P. martiusii* foram encontrados em madeira de dicotiledôneas. Alguns em árvores vivas e alguns em madeira em decomposição (GIBERTONI, T.B. Aphyllorphorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004); (GIBERTONI, T.B.; SANTOS, P.J.P.; CAVALCANTI, M.A.Q. Ecological aspects of *Aphyllorphorales* in the Atlantic rain forest in northeast Brazil. *Fungal Diversity* 25: 49-67, 2007).

[050] Os corpos de frutificação da espécie *P. martiusii* apresentam píleo com uma superfície escura e glabrosa, com textura semelhante à de madeira, com uma margem branca e coriácea. A região escura do píleo apresenta sulcos e faixas de cor ligeiramente mais amarelada ou acinzentada no sentido concêntrico. O córtex pilear, de cor preta, se estende por 2mm de espessura. A superfície dos poros (himênio) apresenta coloração entre o creme (quase branco) e marrom amarelado claro. Os poros são circulares (aproximadamente 4 a 6 por milímetro). Os tubos podem ter até 6cm de profundidade, estratificados em camadas de até 8mm, sendo as camadas mais jovens de coloração mais clara.

[051] Os basidiósporos de *P. martiusii* são lisos e lacrimóides: contorno aproximadamente elíptico e uma das extremidades abruptamente afilada; com paredes grossas, diâmetros entre 6,5 e 9,0 $\mu$ m; hialinos e variavelmente dextrinóides. As hifas generativas, hialinas, apresentam paredes finas e grampos de conexão. As hifas conectivas, hialinas, apresentam paredes grossas. As hifas esqueléticas, hialinas, apresentam paredes grossas. Todas as hifas apresentam paredes com espessura entre 1,0 e 2,7 $\mu$ m, são fortemente dextrinóides e apresentam coloração hialina a amarelada em KOH. Características que permitem diferenciar *P. martiusii* de outras espécies do mesmo gênero são: o formato lacrimóide dos esporos e a alta dureza e densidade dos basidiomas após secagem (outras espécies se apresentam mais macias e leves) (GERBER, A.L.; NEVES, M.A.; LOGUERCIO-LEITE, C. Some species of *Perenniporia* Murrill (Poriales, Basidiomycotina) from Southern Brazil. Revista Brasileira de Botânica 22(2): 185-193, 1999); (GIBERTONI, T.B. Aphylophorales (Basidiomycotina) em áreas de Mata Atlântica do nordeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004).

### **Aplicações tecnológicas de espécies do gênero *Perenniporia***

[052] *P. fraxinophila* é um agente de decomposição da madeira, que parasita árvores vivas. Apesar de, usualmente, não matarem as plantas hospedeiras, as infecções reduzem seu ritmo de crescimento e as torna mais frágeis e susceptíveis às condições ambientais (LESICA, P.; ATTHOWE, H.E.; DUGAN, F.M. Incidence of *Perenniporia fraxinophila* and its effects on green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) woodlands in eastern Montana, USA. *Forest Ecology and Management* 182:153–159, 2003). O micélio desta espécie tem sido cultivado e estudado para a produção de metaloproteases, úteis para aplicações terapêuticas contra doenças cardiovasculares (KIM, J.-S.; KIM, J.-E., CHOI, B.-S.; PARK, S.-E.; SAPKOTA, K.; KIM, S.; LEE, H.-H.; KIM, C.-S.; PARK, Y.; KIM, M.-K.; KIM, Y.-S.; KIM, S.-J. Purification and characterization of fibrinolytic metaloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia. *Mycological Research*, in press, 2008).

[053] *Perenniporia medulla-panis* foi estudada para a produção de compostos redutores de ferro, úteis para a degradação de materiais lignocelulósicos, como os efluentes do processo de branqueamento do papel (ARANTES, V.; MILAGRES, A.M.F. Evaluation of different carbon sources for production of iron-reducing compounds by *Wolfiporia cocos* and *Perenniporia medulla-panis*. *Process Biochemistry* 41:887–891, 2006).

[054] No trabalho (SANTOS, M. M.; AMAZONAS, M. A. L. A.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Seleção de Macrofungos Produtores de Lipases e Proteases. In: XIV Simpósio nacional de Fermentações – SINAFERM, Florianópolis-SC, 2003) foi identificada uma cepa da espécie *P. martiusii* como produtora de proteases.

Seis terpenóides, derivados de perenniporiol, foram extraídos com benzeno, do micélio cultivado de *Perenniporia ochroleuca*, e caracterizados (INO, C.; HIROTANI, M.; FURUYA, T. Two perenniporiol derivatives, lanostane-type triterpenoids, from the cultured mycelia of

*Perenniporia* Phytochemistry 23 (12), 2885-2888, 1984); (HIROTANI, M.; INO, C.; FURUYA, T.; SHIROT, M. Perenniporiol derivatives six triterpenoids from the cultured mycelia of *Perenniporia* Phytochemistry 23(5), 1129-1134, 1984).

### **Estado da técnica**

#### **Problemas no tratamento de Leishmanioses**

[055] A principal opção no combate de leishmanioses são os medicamentos sintéticos. Entretanto, se não apropriadamente empregados em conjunto com diagnóstico adequado, a doença resulta em elevadas taxas de morbidade e letalidade. Casos de leishmaniose visceral, por exemplo, levam a 60 mil óbitos por ano no mundo, pois a maioria dos casos não são diagnosticados ou o são tardiamente.

[056] Apesar de úteis, os tratamentos atuais apresentam uma série de problemas. São caros e algumas vezes causam elevada toxicidade. Ainda incluem restrições tais como efeitos colaterais diversos, variável eficácia de recuperação e possível seleção de parasitas resistentes à medicação (CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. Current Pharmaceutical Design, 8:319– 42, 2002).

[057] As primeiras evidências de eficácia no tratamento contra leishmaniose utilizaram um composto antimônio trivalente, o tartarato de antimônio e potássio, também denominado tártaro emético. O fato foi primeiramente descrito em 1912 pelo brasileiro Gaspar Vianna, que relatou melhorias no tratamento da leishmaniose tegumentar americana (VIANNA, G. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar por injeções intravenosas de Tártaro Emético. IN: 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, 4., 1912, Anais do 7º Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia, 426- 428, 1912.). Em 1915, foram relatados tratamentos eficazes também para casos de manifestação clínica de

leishmaniose visceral (Di CHRISTINA, G.; CARONIA, G. BULL. Soc. Pathol. Exot., 8, 63. 1915).

[058] O medicamento inicial causava intolerância gastrintestinal e efeitos cardiotóxicos. Em vista disto foi logo substituído por tratamentos com antimoniais pentavalentes, minimizando-se os quadros de efeitos colaterais agudos. Antimoniais pentavalentes foram aplicados pela primeira vez contra *Leishmania* há quase 90 anos e permanecem até hoje como a primeira escolha terapêutica. A primeira formulação com antimonial pentavalente foi a uréia estibamina, desenvolvida na Índia em 1922 por Bramachari (BRAHMACHARI, U. N. Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part I., 1922. Indian Journal of Medical Research 89:492-522, 1989) , que obteve um derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt difundiu o uso de gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Solustibosan (Bayer) ou Pentostam (Glaxo Wellcome) (RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. Química Nova, SP, 26(4), 2003).

[059] Na ocasião da Segunda Guerra Mundial, na França, o fármaco antimoniato de meglumina (antimoniato de N-metil glucamina) – comercialmente denominado Glucantime – foi fabricado sinteticamente pela empresa Rhône-Poulenc-Rohrer. Surgiu como alternativa aos medicamentos produzidos em outros países. Um dos processos de sua síntese química envolve a dissolução lenta de antimônio pentavalente na forma de ácido antimônico ou  $\text{KSb}(\text{OH})_6$  em N-metil-glucamina (NMG) a 60-70°C por 2 horas, seguida de precipitação por acetona gelada. Isto resulta no antimônio pentavalente complexado em várias formas químicas com a N-metil-glucamina e fórmula geral  $\text{Sb}_n\text{NMG}_{n+1}$  e  $\text{Sb}_n\text{NMG}_n$  (DEMICHELLI, C.; FIGUEIREDO, T.L.; CARVALHO, S.; SINESTERRA, R.D.; LOPES, J.C.D.;

FREZARD, F. Physico-chemical characterization of meglumine antimoniate. *BioMetals*, 12: 63-66, 1999).

[060] Esquemas de administração ininterruptos são imprescindíveis no tratamento de leishmanioses. Altas dosagens diárias das drogas antimoniais são necessárias, normalmente aplicadas por via parenteral intramuscular ou endovenosa. Estes esquemas são consideravelmente tóxicos, embora mais de 80% do antimônio administrado seja excretado por via renal dentro de 24 horas de forma inalterada (NAVA, A.; ROMAN, S.S. Efeito do antimoniato de meglumina sobre a performance reprodutiva de camundongos prenhes. *Vivências*. 1:201-12; 2006). O antimônio acumula-se principalmente no fígado, baço e rins, pois possui grande afinidade por tecidos e órgãos vascularizados (FELICETTI, S.A.; THOMAS R.G.; McCLELLAN R.O. Metabolism of two valence states of inhaled antimony in hamsters. *Am Ind Hyg Assoc J*. 35:292-300, 1974); (SAMPAIO, R.N.; PAULA, C.D.; SAMPAIO, J.H.; FURTADO, R.S.; LEAL, P.P.; ROSA, T.T. et al. The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 30:457-63; 1997). Isto favorece efeitos colaterais com sintomas típicos de intoxicação crônica por antimônio (REES, P. H.; KESTING, M. I.; KAGER, P. A.; HOCKMEYER, W. T. *Lancet* 2, 226; 1980); (MARSDEN, P.D.; SAMPAIO R.N.; CARVALHO E.M.; VEIGA J.P.; COSTA J.L.; LLANOS- CUENTAS E.A. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine*; 34, 710-3; 1985). Assim sendo, não se deve ultrapassar o limite de 850 mg de antimônio administrado ao dia, segundo preconiza a OMS (WHO - World Health Organization, Research on leishmaniasis. Acessado em: <http://www.who.int/leishmaniasis/> 2011).

[061] Até o presente não se tem certeza do mecanismo de ação da quimioterapia com antimônio pentavalente. Hipóteses de que as

vias metabólicas de beta-oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito sofrem interferência do antimônio trivalente; forma para qual o antimônio pentavalente é convertido após sua administração. O desequilíbrio gerado leva a uma depleção dos níveis de ATP intracelular, resultando na morte do parasito (BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CUBRÍA, C.; ORDÓÑEZ, D. *General Pharmacology* 30, 435, 1998); (ROBERTS, W.L.; MCMURRAY, W. J.; RAINEY, P. M. *Antimicrob. Agents Chemother* 42, 1076, 1998).

[062] Alguns novos medicamentos de segunda escolha tornaram-se disponíveis na última década. Formulações foram padronizadas e registradas para ensaios clínicos e, em alguns países, até mesmo para utilização (SVS / MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde - Brasil. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana – Diagnóstico Clínico e Diferencial*. 1ª ed. Brasília, 2006); (SVS / MS - Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Fundação Nacional de Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2.ed. Brasília, 2007). Os resultados da combinação destas novas terapias com antimoniais pentavalentes são promissores, mas variam conforme cada caso. Apesar de ativos no tratamento de diversas formas de leishmaniose, esses fármacos não têm uso generalizado. Nenhum apresenta um bom índice terapêutico associado a uma baixa toxicidade. Além disso, apresentam altos custos, facilidade de desenvolvimento de resistência clínica, e possivelmente, contribuição para aumentar a incidência de co-infecções (MITROPOULOS, P.; PETE, K.; KONIDAS D.O.; DURKIN-KONIDAS, M. *New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment*. Review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63:2, 2010); (SVS / MS - Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional De DST e AIDS. *Manual de Recomendações para Diagnóstico, Tratamento e Acompanhamento*

da Co-infecção Leishmania-HIV. Série A. Normas e Manuais Técnicos, 2004).

[063] Destacam-se entre os medicamentos representantes de segunda linha: anfotericina B, pentamidina, miltefosine e paromomicina. A anfotericina B forma complexos com esteróis substituídos, causando poros que alteram o equilíbrio de íons, o que desencadeia a morte de *Leishmania*. Contudo, é um fármaco altamente nefrotóxico. Necessita administração parenteral lenta ao longo de quatro horas, muitas vezes resultando em graves reações agudas (HERWALDT B. L. Leishmaniasis - seminar. The Lancet 354: October 2, 1999). Várias formulações coloidais e lipossomais foram desenvolvidas e são um avanço na minimização de efeitos colaterais, como por exemplo, o AmBisome. No entanto são economicamente inviáveis para a população comprometida (DAVIS, A.J.; MURRAY, H.W.; HANDMAN, E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. Trends in Parasitology, 20: 73-76, 2004).

[064] Pentamidina, uma diamidina catiônica, age na mitocôndria. É usada contra os parasitas resistentes a antimoniais. Porém, em 25% dos casos, os parasitos tornam-se resistentes também a este fármaco (JHA, T.K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. Indian J Med Res 123: 389-398, 2006.). Além disso, o paciente necessita de acompanhamento clínico durante o tratamento.

Miltefosine, pertencente ao grupo de alquilfosfocolinas, é o primeiro medicamento oral disponível no tratamento de leishmanioses. Em estudos experimentais apresentou alta eficiência, mesmo sem refrigeração. Por outro lado, esta droga possui custo limitante, não pode ser administrada durante a gravidez e ocasiona problemas gastrointestinais (PALUMBO, E. Oral Miltefosine Treatment in Children With Visceral Leishmaniasis: a Brief Review. The Brazilian Journal of Infectious Diseases 12(1):2-4, 2008).

[065] Por fim, a Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, está na última fase de ensaios clínicos. Normalmente serve de apoio a outros tratamentos. Utiliza-se formulação parenteral contra leishmaniose visceral; tópica ou parenteral contra a forma tegumentar (JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRETT, P.; MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in leishmania donovani. *Molecular & Biochemical Parasitology* doi:10.1016/j.molbiopara.2008.12.007).

### **Compostos Anti-Leishmania em patentes anteriores à presente invenção**

[066] O documento de patente **US 4,209,519** refere-se a um método de tratamento de leishmanioses que inclui uma etapa de administração parenteral ou oral de um derivado lepidine ou sais destes compostos. O método compreende fornecer uma quantidade eficaz da composição leishmanicida a um animal infectado. Mais especificamente, se relaciona com a administração de derivados de 8-amino-6-metoxi-lepidine. O autor cita a importância das cadeias alquila para atividade dos compostos. O trabalho anterior foi complementado por Werbel et al. (1987) no documento de patente **US 4,659,708**, que propôs novas substituições eficientes para aumento de ação leishmanicida. Neste trabalho, derivados de 8-quinolinamine demonstraram atividade extraordinária. De acordo com esta invenção, é possível fazer substituições com parafinas de 10 ou mais carbonos; alquilas linear ou de cadeia ramificada; grupos arila mononucleares, como fenila, fenila substituída com grupos alquila, alcóxi, aralkoxy, amino, alquilamino, hidróxi ou hidrogênio; e grupos heterocíclicos como grupos piridil ou naftil.

[067] O documento de patente **US 4,594,241** se refere a uma formulação farmacêutica melhorada, com novas formas de lipossomas contendo antimônio. Preocupa-se principalmente com o processo de preparação e com a eficiência de incorporação do antimônio.

Descobriram que um controle cuidadoso da relação entre antimônio, conteúdo lipídico das paredes do lipossoma e composição da fase aquosa externa favorece a produção de grandes quantidades de fármaco leishmanicida encapsulado, além de aumentar estabilidade de armazenamento.

[068] O documento de patente **US 5,541,196** estuda uma composição farmacêutica para o tratamento da leishmaniose, que compreende como princípio ativo pelo menos um composto do grupo das quinolinas e derivados.

[069] A invenção da patente **US 5,663,155** refere-se a composições compreendendo um derivado de adenosina deaminase e um inibidor para a prevenção e tratamento de infecções parasitárias.

[070] O documento de patente **US 6,403,576** evidenciou novas composições antifúngicas e antiparasitárias identificando os mecanismos bioquímicos dos fármacos sobre a síntese de lipídios, metabolismo e excreção dos parasitos.

[071] O principal objetivo da invenção **BRPI0902841-2 A2** trata de composições contendo um composto químico da família das chalconas encapsulada em lipossomas voltada para produção de um medicamento antiparasitário.

[072] No documento de patente **BRPI0800947A2**, Rabello et al. (2009) purificaram dois metabólitos leishmanicidas a partir do micélio do fungo *Cochliobolus sp.* O cultivo foi realizado somente em placas de Petri, contendo Agar extrato de malte. O processo de produção utilizou pelo menos 160 placas de 90mm de diâmetro. A extração foi realizada com acetato de etila, rendendo um total de 2,04g de extrato bruto. A quantidade de extrato obtida foi satisfatória para realizar fracionamento.

[073] O presente documento, de maneira diferente, propõe processos de cultivo micelial em equipamentos adequados para

escalas industriais. As cepas, parâmetros de cultivo e processos de purificação aqui descritos foram combinados de maneira inédita e não óbvia, gerando produtos que constituem alternativas tecnológicas economicamente viáveis e que se mostraram até mesmo mais eficazes que medicamentos atualmente disponíveis, em testes preliminares.

### **Patentes prévias envolvendo fungos do gênero *Perenniporia***

[074] Os documentos **US 4,447,531** e **US 4,431,733** defendem o processo de conversão de dextrose em frutose, por enzimas glucose-isomerases, produzidas por fungos de diversos gêneros, incluindo *Perenniporia*, em particular a espécie *P. compacta*. Os mesmos autores também patentearam as próprias enzimas e a obtenção de frutose a partir de amido liquefeito, utilizando enzimas produzidas pelos mesmos fungos.

[075] Em **US 4,605,619** foi patenteado o processo de obtenção de frutose a partir de amido, utilizando alfa-amilases e glucose-isomerases produzidas por fungos de alguns gêneros, incluindo *Perenniporia*, em particular a espécie *P. compacta*. As espécies do gênero *Perenniporia* foram incluídas na lista de fungos cultiváveis utilizando o processo de cultivo patenteado no documento **US 5,123,203**.

[076] Nos documentos de patente **US 5,750,005** e **US 6,402,887** foram patenteados processos de biopolpação envolvendo a aplicação da espécie *P. medulla-panis*.

[077] Van Barneveld (**WO 01/19940 A1**) patenteou processos de compostagem que empregam diversas espécies de fungos, incluindo *P. tephropora*. Esta mesma espécie foi utilizada na patente **WO2004/029017 A1**, como modelo de fungo de “podridão branca” em testes de atividade fungicida, para comprovar a eficácia de compostos quaternários de amônio. Os fungos do gênero *Perenniporia* também são

apontados na patente **WO2005/089156 A2** como patógenos vegetais de importância econômica.

[078] A aplicação de três espécies do gênero *Perenniporia* para a detoxificação e descoloração de resíduos líquidos foi patenteada em **WO 03/035561 A2**. Estas espécies são: *P. medulla-panis*, *P. ochroleuca* e *P. tephropora*.

[079] Uma lectina imunoestimulante, extraída do cogumelo *Perenniporia fraxinea* (sin. *Fomitella fraxinea*) foi patenteada em **US 7,438,915** para aplicação em galinhas, para aumentar a resistência dos animais à coccidiose.

[080] No pedido de patente **US 2009/0005340** foram requeridos processos envolvendo o cultivo submerso de basidiomicetos, incluindo espécies do gênero *Perenniporia*, para obtenção de diversas classes de substâncias ativas para variadas aplicações na área de saúde. O mesmo inventor patenteou também processos para produção de nutracêuticos e kits de medicamentos anticancer a partir do cultivo submerso do micélio de basidiomicetos, incluindo algumas espécies do gênero *Perenniporia* (**US 2009/0143280** e **US 2010/0086647**).

[081] *Perenniporia subacida* e *P. tephrosia* estão listadas como úteis na fabricação de biodiesel em processos patenteados recentemente (**US 7,824,453**).

[082] *Perenniporia* é citado ainda como um dos gêneros de fungos com aplicação no tratamento de resíduos sólidos na patente **WO2010/055093 A1**.

### **Fermentação Submersa**

[083] Os métodos de cultivo de macromicetos em meio de cultura líquido são notoriamente conhecidos e divulgados. Um amplo espectro de produtos obtidos a partir de fungos, com propriedades alimentícias,

terapêuticas e cosméticas, já foram produzidos por Processos de Fermentação Submersa.

[084] O trabalho inicial mais importante nesta área foi o de Treschow (TRESCHOW, C. Nutrition of the cultivated mushroom, Dansk Bot. Ark. 11, 1–180, 1944), que tratou sobre a nutrição de *Agaricus bisporus*. Além de revisar trabalhos anteriores, descobriu uma série de compostos necessários para crescimento de micélio em meio líquido, sugerindo certas fontes fundamentais de carbono, aminoácidos, minerais e oligoelementos.

[085] Também utilizando meio líquido, Ghosh & Sengupta estudaram as necessidades nutricionais de *Volvariella volvacea* (GHOSH, A.K. and SENGUPTA, S. Studies on biochemistry of higher fungi. I. Submerged growth of *Volvariella volvacea* in synthetic medium, J. Food Sci. Technol., 14, 6–9, 1977). Recomendaram o uso de aminoácidos ao invés de sais inorgânicos de amônio nos processos de decomposição de celulose, indicando a asparagina como melhor fonte de nitrogênio.

[086] Alguns trabalhos, como o de Ingold, analisaram precisamente a fisiologia de fungos macromicetos. Para isso, utilizaram meios líquidos de composição definida em fermentação submersa, desenvolvendo ainda mais a técnica. O crescimento dos fungos foi avaliado por meio do peso seco (INGOLD, C.T. The Biology of Mucor and Its Allies, Edward Arnold, London, 1978).

[087] Leatham relatou a obtenção de frutificação a partir de estoques dicarióticos de *Lentinula edodes* em um meio quimicamente definido após de 45 dias da inoculação (LEATHAM, G.F.A. Chemically defined medium for the fruiting of *Lentinus edodes*, Mycologia, 75: 905–908, 1983).

[088] Em 1951, H. Humfeld, E. Aeschlimann & J. R. Hoffman (**US 2,542,031**), patentearam o biorreator clássico para cultivo submerso, no qual se pode realizar culturas com agitação e aeração forçadas. O

dispositivo tem montagem de uma tampa acoplada sobre um tanque fechado, dando suporte ao eixo de agitação, entradas e conexões.

[089] Desde então vários processos foram descritos e fizeram utilização deste invento, incluindo o cultivo micelial submerso de macromicetos. Isto é exemplificado nas patentes **US 2,693,665**, **US 2,761,246**, **US 2,850,841** e **US 6,490,824**.

[090] No atual estado da arte, entre uma infinidade de composições, um meio de cultura líquido tipicamente utilizado contém por litro: 50 g de sacarose, 10 g de nitrato de amônio, 5 g de fosfato de sódio, 2 g de sulfato de magnésio e 0,2 g de sulfato ferro, como descrito em **US 6,490,824**.

[091] O documento de patente **US 2,693,665** fornece processos para o crescimento do micélio de cogumelos em condições de aeração e fermentação submersa. Tem como objeto de invenção utilizar um meio de cultura composto por resíduos agrícolas, principalmente resíduos cítricos, de pera ou de aspargos. O processo descrito refere-se ao uso destes resíduos, materiais de pouco valor agregado na indústria de processamento de alimentos, para obtenção de micélio fúngico para aplicação em gêneros alimentícios.

[092] O documento de patente **US 2,761,246** tem como objeto de invenção a produção de micélio de cogumelos comestíveis da família *Helvellaceae*, principalmente do gênero *Morchella*. Fornece métodos de cultivo em meio líquido em condição aeróbica. Recomenda uma vasta gama de substratos e nutrientes de baixo custo, com tolerância a altas concentrações ou contaminações. Particularmente usa melaço, resíduos de alcachofra e meios totalmente sintéticos com sais de amônio. De acordo com a invenção, o próprio cogumelo é capaz de sintetizar compostos promotores de seu crescimento, como as vitaminas. Além disso, o produto final deve ter aroma, sabor e textura de alta qualidade.

[093] O documento de patente **US 2,850,841** refere-se ao crescimento aeróbio de micélio de cogumelos comestíveis em um substrato líquido para obtenção de um produto alimentício em forma compactada. A invenção inclui a obtenção de um produto comestível feito com o micélio do cogumelo crescido em condições aeróbicas submersas. Este produto tem sabor e aroma agradáveis, similares ao do corpo de frutificação. Além disso, fornece métodos de rápido crescimento de micélio, em quantidades abundantes, a um custo relativamente baixo, especialmente vantajoso comercialmente.

[094] O documento de patente **US 2,928,210** revela um processo para a produção de micélio de cogumelos comestíveis compreendendo um meio de cultura líquido contendo *sulfite liquor* e resíduos com baixo teor de dióxido de enxofre como fonte de carbono. Ainda reivindica a adição de alguns resíduos como fontes de nitrogênio e fósforo. Durante o processo, o inóculo é adicionado ao meio de cultivo descoberto pela invenção, permanecendo sob condições controladas de temperatura, pH e aeração até o final do crescimento.

[095] O documento de patente **US 3,086,320** faz uso do leite como um complemento de fermentação para o crescimento de fungos em fermentação submersa. Desta forma conseguiu expandir o uso da tecnologia para o crescimento de fungos do filo Eumicofita e Ficomicetos e das classes Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. Até a época, o leite natural nunca havia sido usado como fonte de proteína para essa finalidade.

[096] O documento de patente **US 6,372,964** é dirigido ao cultivo de Basidiomicetos superiores do gênero *Pleurotus* em cultura submersa para servirem como alimentos funcionais. As particularidades do processo incluem período de incubação mais curto que o tempo de frutificação. Além disso, os rendimentos de compostos, tais como

proteína, aminoácidos e vitaminas foram maiores que o corpo de frutificação padrão.

[097] O documento de patente **US 6,490,824** diz respeito a um novo e eficiente método de cultivo de um fungo basidiomiceto em um meio de cultura líquido. Particularmente, refere-se a um método para cultivar um fungo comestível como *Agaricus blazei* Murill, *Cortinellus shuitake*, *Lyophyllum aggregatum*, *Pleurotus ostreatus* e similares. O objetivo principal foi obter agregados do fungo em meio líquido, de vários tamanhos, acarretado pela adição de materiais insolúveis em água que servem como suporte de crescimento do micélio.

[098] O documento de patente **US 7,635,492** fornece métodos de preparação de diversos gêneros alimentícios com fragmentos de micélio seco de cogumelos comestíveis. Reivindica métodos de utilização dessas formulações para promoção de bem-estar. Fornece, para isso, um método de preparação de uma suspensão de fungos comestíveis, o qual inclui o processamento da mistura de fungos comestíveis em meio aquoso e redução de tamanho dos fragmentos.

### **Fermentação no Estado Sólido**

[099] Pode se definir Fermentação no Estado Sólido (FES) como um conjunto de técnicas utilizadas para cultivar microrganismos em substratos sólidos umedecidos, na ausência, ou quase-ausência de água livre. Os sistemas de FES são trifásicos: além do substrato sólido umedecido, é necessário o contato das células com uma fase gasosa.

[100] Os organismos mais adaptados a este tipo de meio incluem fungos filamentosos e leveduras. Podem ser realizadas fermentações naturais (sem um controle preciso sobre a composição da microbiota) ou utilizando culturas puras. Diversos processos produtivos, empregando FES, vêm sendo utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais, como por exemplo, na silagem, compostagem e na fabricação de

pães, queijo, tempeh e fermentados de soja, como shoyu e misô. Porém, apenas com estudos realizados no século XX, sobre as exigências nutricionais de microrganismos e o desenvolvimento da microbiologia, tem sido possível dar uma abordagem científica aos métodos de cultivo no estado sólido (PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Introduction. In: Current Developments in Solid-State Fermentation. Ed.: Pandey, A.; Soccol, C.R. & Larroche, C.; Springer, pp.3-12, 2008); (STYER, J. F. Nutrition of the cultivated mushroom. American Journal of Botany 17(10):983-994, 1930).

[101] Apenas mais recentemente, desenvolvimentos tecnológicos sistemáticos têm sido realizados na área de FES, gerando aplicações industriais importantes, incluindo o tratamento de resíduos, o enriquecimento de materiais para a alimentação animal, a produção de cogumelos, e a obtenção de uma série de compostos de alto valor agregado, como biocombustíveis, enzimas, antibióticos, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários biologicamente ativos (SINGHANIA, R.R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 44(1): 13-18, 2009); (SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal 13: 205-218, 2003); (PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEÓN, J. A.; NIGAM, P. Production of Organic Acids by Solid-state Fermentation. In: Solid-state Fermentation in Biotechnology – Fundamentals and Applications. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc., pp.113-126, 2001).

[102] O documento de patente **US 7,754,653** descreve a produção de biopesticidas por fermentação no estado sólido. O documento **US 6,667,066** diz respeito a uma preparação enzimática obtida por fermentação no estado sólido. A patente **US 6,927,047** propõe a produção de ácido micofenólico por FES. Outros documentos de

patente que envolvem fermentação no estado sólido incluem: produção de goma xantana a partir de resíduos de batata (**US 7,727,747**), produção de ácido giberélico (**US 7,846,699**) e produção de ácido metileno-succínico a partir de bagaço de cana (**US 6,171,831**). Técnicas e parâmetros de cultivo para diversas espécies de microrganismos estão disponíveis em livros e artigos. Algumas destas tecnologias foram inclusive patenteadas. A patente **US 2,005,365**, de 1935, foi concedida para inóculo de cogumelos ("spawn") em forma de pellets, descrevendo a produção de inóculos com grãos, serragem velha, palha inutilizada, madeira apodrecida, capim e folhas deterioradas. Desde então, os pedidos de patentes nessa área têm aumentado bastante. Exemplos são as patentes **US 4,637,163**; **US 4,646,466** e **US 4,833,821**, que tratam de técnicas para a produção de cogumelos comestíveis.

[103] Diversos materiais orgânicos podem ser utilizados como substrato para FES, incluindo resíduos industriais, agroindustriais e urbanos, tais como palhas, bagaços, cascas, farelos, esterco, serragem, cepilho, papel e papelão, dentre muitos outros. Alguns exemplos são: bagaços de cana, mandioca, uva e maçã; palhas, grãos e farelos de trigo, milho, arroz e sorgo; palha de diversos tipos de capim; esterco de bovinos e de aves; cascas de soja e de batata; serragem e cepilho de pinus e eucalipto.

[104] Diversos documentos de patente dizem respeito a formulações de meios de cultivo sólidos. O documento de patente **US 3,560,190** foi concedido, em 1971 para formulações de substratos sólidos, à base de serragem e resíduos da produção de algodão e óleo de algodão, para o cultivo de cogumelos. O documento **US 3,940,883** descreve a formulação de meios para o cultivo de cogumelos, à base de serragem e farelos de trigo e arroz. A patente **US 4,127,964** protege uma formulação específica, à base de esterco, para a produção de

substrato compostado para o cultivo de cogumelos. A patente **US 3,942,969** propõe a utilização de proteína desnaturada e óleos, como suplementos para o cultivo de cogumelos.

[105] O documento de patente **US 4,512,103** descreve a utilização de suportes sólidos, inertes ou não (como tijolo e telhas moídas ou cepilho) embebidos em meios líquidos nutritivos para o cultivo de fungos, incluindo cogumelos. O documento de patente **US 7,043,874** estende esta tecnologia, propondo a utilização de resíduos da indústria de óleo de oliva, empregando perlita como suporte. A patente **US 4,333,757** descreve uma técnica semelhante, utilizando materiais lignocelulósicos como suporte.

[106] Algumas vantagens da FES sobre a fermentação submersa são: risco reduzido de contaminação bacteriana e maior concentração final de produtos, devido à ausência de água livre. Por outro lado, existem dificuldades técnicas significativas inerentes à FES, como: homogeneização e manutenção da temperatura, umidade e concentração de gases no substrato, devido aos padrões de transferência de massa e energia, característicos deste tipo de processo. Pequenas variações na umidade afetam significativamente o crescimento de microrganismos na FES: o excesso de água livre impede a difusão de oxigênio e favorece a anaerobiose; por outro lado, a falta de umidade impede que os microrganismos secretem as enzimas necessárias para a digestão dos substratos, originalmente insolúveis. Outra dificuldade consiste na transferência de materiais sólidos, como inóculo, substrato e produtos fermentados, de maneira a evitar contaminações (meios líquidos são facilmente bombeados através de tubulações) (PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. General considerations about Solid-state fermentation processes. In: Current Developments in Solid-State Fermentation. Ed.: Pandey, A.; Soccol, C.R. & Larroche, C.; Springer, pp.13-25, 2008); (DURAND, A. Bioreactor designs

for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:113-125, 2003).

[107] Em sistemas estáticos, a dispersão de calor e a difusão de gases podem constituir problemas. Podem ser formados gradientes de temperatura e de concentração de gases ao longo do reator, proporcionando condições de cultivo que se afastam do ideal em diversos pontos do leito. Recursos empregados para solucionar os problemas de transferência de massa e calor incluem: agitação intermitente; aeração forçada, com ar adequadamente umidificado e aquecido ou resfriado e trocadores de calor (DURAND, A. *Bioreactor designs for solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal* 13:113-125, 2003); (RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 127–135, 2003). No cultivo de fungos filamentosos, a agitação deve ser realizada em intervalos não muito curtos, para evitar o cisalhamento excessivo das hifas; e não muito longos, para evitar o crescimento de micélio entre as partículas sólidas. Usualmente, estes biorreatores operam em batelada, muitas vezes incluindo sistemas para esterilização do substrato e processamento do produto, *in situ*, para evitar contaminações.

[108] Sensores de temperatura, umidade e de concentração de gases ( $O_2$  e  $CO_2$ ) podem ser instalados para monitorar variáveis de estado e controlar variáveis de processo, como as taxas de aeração, aquecimento, umidificação e a frequência de agitação. Algumas outras análises são difíceis de implantar em sistemas *on-line*, como: quantificação da biomassa microbiana, identificação da biomassa e quantificação de substratos e produtos (RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; RODRIGUEZ, D. E. Kinetics in Solid-state Fermentation. In: *Current Developments in Solid-State Fermentation*. Ed.: Pandey, A.; Soccol, C.R. & Larroche, C.; Springer, pp.48-73, 2008). Por isso

também é desejável um sistema para coleta de amostras do biorreator, para as análises *off-line*.

[109] Alguns desenhos de biorreatores para FES vêm sendo desenvolvidos e patenteados, assim como processos e produtos decorrentes destas tecnologias. Admite-se, porém, ainda serem possíveis e necessárias melhorias nestes equipamentos, especialmente para grandes escalas. Pesquisadores estão buscando elucidar os princípios físicos e químicos envolvidos, para viabilizar estratégias mais eficientes de projeto e operação para estes equipamentos (RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; KARANTH, N.G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13:127–135, 2003).

[110] Os modelos mais freqüentes de biorreatores para cultivo no estado sólido podem ser classificados, basicamente em: estáticos ou agitados, com aeração forçada ou não, podendo aerar e agitar de maneira contínua ou intermitente. O modelo mais antigo, porém ainda bastante utilizado, é tradicionalmente utilizado para a fabricação de shoyu. Neste sistema, prateleiras recebem camadas de substrato inoculado e são mantidas em salas climatizadas. Devido à dificuldade de se manter condições assépticas em grandes salas de cultivo, sacos de polipropileno podem ser utilizados para manter a esterilidade do substrato ao longo do processo. O documento de patente **US 4,311,477** sugere um modelo de sacos plásticos especialmente desenhados para FES.

[111] Foram desenvolvidos também, reatores fechados e esterilizáveis, contendo prateleiras, dispendo de aeração forçada e trocadores de calor. Os reatores agitados, usualmente consistem de tambores rotatórios. Por enquanto, relativamente poucos desenvolvimentos foram realizados para biorreatores em condições estéreis, o que limita os desenvolvimentos nas áreas de alimentos e

fármacos (DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*,13: 113-125, 2003).

[112] Muitas das dificuldades técnicas para grandes escalas foram solucionadas no modelo de reator denominado Zymotis, um reator estático compartimentado, com sistemas para controle de temperatura, umidade e aeração (ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M.; PREBOIS, J. P.; LONSANE, B. K. Zymotis: a large-scale solid-state fermenter. Design and evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42: 37-52, 1993). Os documentos de patente **US 6,197,573** e **US 6,664,095** propõem um biorreator para FES em condições estéreis, denominado Plafractor<sup>®</sup>. Este equipamento apresenta estrutura modular e controles de temperatura, umidade e concentração de gases. A esterilização dos substratos e a extração de produtos são realizadas no interior do próprio biorreator. A patente **US 6,958,110** sugere um modelo específico de biorreator para biopolpação. Em **US 7,476,534** encontramos um modelo de prateleiras.

[113] Dado o progresso atual na área de FES, muitos produtos biotecnológicos que estão em fase piloto podem se tornar economicamente viáveis em grande escala muito em breve. No âmbito da presente patente, a produção de substâncias com ação antiparasitária, a partir do cultivo do micélio de macromicetos pode ser realizada tanto utilizando meios líquidos (fermentação submersa), como meios sólidos (fermentação no estado sólido). As duas abordagens são complementares, permitindo o processamento de uma grande variedade de substratos, para a obtenção de substâncias farmacológicas de grande valor.

### **Sumário da invenção**

[114] A presente invenção trata de composições para inibir a multiplicação de parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* ou prevenir as infecções causadas pelo protozoário e processos para a

produção das mesmas por cultura de micélios macrofúngicos em biorreator. A redução na multiplicação e viabilidade do parasito foi confirmado experimentalmente, pela inibição dos mesmos, em maior percentual que quando confrontados com produtos usados atualmente.

[1154] O principal objetivo desta invenção é produzir uma COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA leishmanicida segundo os processos e etapas aqui descritos. Para a fabricação de tal composição, é indicado que a cultura de micélio do fungo seja de alguma espécie do gênero *Perenniporia*, preferencialmente *Perenniporia martusii*.

[116] O primeiro objeto desta invenção trata da produção de COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA leishmanicida, o qual compreenda extrato de micélio de *Perenniporia martusii* ou extrato de sobrenadante de caldo fermentado liofilizado, que é útil para o tratamento de leishmaniose do ser humano ou animais.

[117] O segundo objeto trata dos processos de preparação e produção em biorreator de micélio fúngico em meio líquido pelo processo de fermentação submersa e em meio sólido pelo processo de fermentação em estado sólido.

[118] O terceiro objeto desta invenção trata do uso das referidas composições farmacêuticas para o combate das leishmanioses em animais mamíferos, incluindo humanos.

[119] Em resumo, esta invenção busca por inovação em processos de fabricação de fármacos especialmente para o caso de parasitoses negligenciadas, como as leishmanioses, para as quais não há investimento em pesquisa, sobretudo na inovação de processos industriais.

### **Listagem de Figuras**

[120] A seguir, faz-se referência aos desenhos anexos ao texto para melhor compreensão dos exemplos e concretizações apresentados, nos quais:

[121] A **Figura 1** trata de um gráfico que expressa os resultados de atividade inibitória de 12 extratos fúngicos obtidos a partir do caldo de fermentação de 8 diferentes espécies de macromicetos sobre a proliferação de protozoários da espécie *Leishmania infantum* alcaliado pelo método da timidina radiomarcada. No eixo **y** está representada a intensidade de emissão radioativa, proporcional à intensidade de proliferação de parasitos em cada uma das amostras analisadas. Quanto menor o valor medido, maior a atividade inibitória do extrato testado contra o parasito. O controle positivo consistiu de Glucantime (300mg/mL), medicamento habitualmente usado no tratamento da doença em humanos, o controle negativo consistiu de protozoários cultivados em meio LIT modificado, contendo timidina radiomarcada, porém na ausência de extratos de macromicetos.

[122] A **figura 2** é um gráfico que apresenta os resultados de atividade inibitória do parasito por sete extratos mais ativos avaliados pelo método da timidina radiomarcada sobre a proliferação de protozoários da espécie *L. infantum*. O eixo **y** representa a percentagem de atividade antiproliferativa de cada um dos extratos em relação ao controle positivo, Glucantime (300mg/mL).

[122] Nas **Figuras 1 e 2** foi adotado um código de duas letras para designar cada uma das espécies de macrofungos testadas: *Pleurotus djamor* (PD), *P. calvescens* (PC), *Lycoperdon marginatum* (LM), *Perenniporia martiusii* (PM), *Plectania sp.* (PL), *Ganoderma australe* (GA), *Ganoderma stipitatum* (GS) e *Oudemansiella canarii* (OC). Nestas figuras, a sigla Eac se refere a substâncias extraídas com acetona, a partir do caldo de fermentação submersa de macromicetos.

[123] A **figura 3 A** mostra os resultados dos ensaios das composições farmacêuticas contra parasitas da espécie *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/FR/71/LEM75). Exibe o número de promastigotas por mL (eixo **y** esquerda) e absorvância (eixo **y** direita), resultados respectivos do método Parasitológico e do método do MTT. Asterisco: diferença significativa com  $p < 0,05$  quando comparado com o respectivo controle negativo (C-, não tratado). Fármaco referência: Glucantime (G, 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). Composições farmacêuticas, 1000  $\mu\text{g/mL}$ : Xdcm – extrato diclorometano a partir de biomassa; Xsup – extrato aquoso a partir de biomassa; Xinf – extrato clorofórmico a partir de biomassa; Xac - extrato acetona a partir de biomassa; Sdcm – extrato diclorometano a partir de caldo de fermentação; Sac - extrato acetona a partir de caldo de fermentação.

[124] A **figura 3B** resume os valores de inibição das composições farmacêuticas em relação ao controle negativo (não tratado), contra as espécies *Leishmania braziliensis*, *L. infantum* e *L. amazonensis*. A presença de asterisco significa que o resultado é estatisticamente diferente do respectivo controle em um nível de significância  $p < 0,05$ . Os valores utilizados são referentes a experimentos realizados em triplicada com pelo menos duas repetições independentes.

[125] A **figura 4** representa a inibição de formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* internalizadas em macrófagos. Comparações são feitas em relação ao controle na ausência da composição farmacêutica. **Tratamentos:** composição farmacêutica obtida a partir de biomassa de *Perenniporia martiusii* processada, extraída com clorofórmio (Xinf, 1000  $\mu\text{g/mL}$ ); Composição Farmacêutica obtida a partir de caldo de fermentação de *Perenniporia martiusii* processada, extraída com diclorometano (Sdcm, 1000  $\mu\text{g/mL}$ ); Composição Farmacêutica obtida a partir de biomassa de *Perenniporia martiusii* processada, extraída com diclorometano (Xdcm, 1000  $\mu\text{g/mL}$ ); Fármaco

referência (Glucantime, 2000 µg/mL). A presença de asterisco significa que o resultado é estatisticamente diferente do respectivo controle em um nível de significância  $p < 0,05$ .

[126] A **figura 5** é um quadro com fotomicrografias da contagem de promastigotas de *L. braziliensis* sobreviventes após 48 horas tratamento das formas amastigotas internalizadas em macrófagos. Contagem de promastigotas realizada após sete dias de incubação em meio para diferenciação. Foto superior esquerda: controle negativo (não tratado). Foto superior direita: Composição Farmacêutica obtida a partir de biomassa de *Perenniporia martiusii* processada, extraída com clorofórmio ( $X_{inf}$ , 1000 µg/mL). Foto inferior esquerda: Fármaco referência (Glucantime, 2000 µg/mL). Foto inferior direita: Composição Farmacêutica obtida a partir de caldo de fermentação de *Perenniporia martiusii* processada, extraída com diclorometano ( $S_{dcm}$ , 1000 µg/mL).

[127] A **figura 6** mostra os resultados dos ensaios das composições farmacêuticas contra parasitas da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300). Exibe o número de promastigotas por mL (eixo **y** esquerda) e absorbância (eixo **y** direita), resultados respectivos do método Parasitológico e do método do MTT. Asterisco: diferença significativa com  $p < 0,05$  quando comparado com o respectivo controle negativo (C-, não tratado). Fármaco referência: Glucantime (G, 2000 µg/mL). Composições farmacêuticas, 1000 µg/mL:  $X_{dcm}$  – extrato diclorometano a partir de biomassa;  $X_{sup}$  – extrato aquoso a partir de biomassa;  $X_{inf}$  – extrato clorofórmico a partir de biomassa;  $X_{ac}$  - extrato acetona a partir de biomassa;  $S_{dcm}$  – extrato diclorometano a partir de caldo de fermentação;  $S_{ac}$  - extrato acetona a partir de caldo de fermentação.

[128] A **Figura 7** é um esboço diagramático das etapas de produção de uma composição antiparasitária adotando o processo de cultivo de micélios macrofúngicos em biorreator por **fermentação**

**submersa.** De acordo com a invenção, a composição é leishmanicida. A numeração refere-se a **1:** sistema de compressor de ar; **2:** rotâmetro e indicador de fluxo de ar; **3:** filtro de ar estéril; **4:** Recipiente com inóculo; **5:** soluções diversas (ácidos, bases, antiespumantes, etc.); **6:** bomba dosadora; **7:** estoque de meio de cultura estéril; **8:** trocador de calor; **9:** linha de vapor; **10:** Biorreator para cultivo líquido; **11:** dispersor de ar; **12:** eixo de agitação mecânico (M: motor); **13:** dreno do biorreator; **14:** condensador; **15:** válvula de segurança; **16:** Tanque de espera resfriado; **17:** filtro; **18:** centrífuga; **19:** biomassa; **20:** caldo; **21:** secador; **22:** triturador; **23:** extrator e/ ou coluna de cromatografia; **24:** solvente; **25:** esterilização por filtração; **26:** evaporador; **27:** misturador; **28:** excipientes; **29:** instrumentação; **30:** controlador programável e ( - : transferência de material; ---: linha de ar comprimido; -///- sinais eletromagnéticos).

[129] A **Figura 8** é um esboço diagramático das etapas necessárias para produção de uma composição antiparasitária adotando o processo de cultivo de micélios macrofúngicos em biorreator **por fermentação no estado sólido.** De acordo com a invenção, a composição é leishmanicida. A numeração refere-se a **1:** sistema de compressor de ar; **2:** rotâmetro e indicador de fluxo de ar; **3:** filtro de ar estéril; **4:** Recipiente com inóculo líquido; **5:** recipiente com inóculo principal em estado sólido; **6:** linha de vapor; **7:** soluções diversas (ácidos, bases, antiespumantes, etc.); **8:** bomba dosadora; **9:** reservatório de solução de umidificação ou complementação; **10:** Biorreator principal para fermentação no estado sólido; **11:** dispersor de ar; **12:** eixo de agitação mecânico (M: motor); **13:** dispersor de umidade; **14:** secador; **15:** triturador; **16:** extrator e/ ou coluna de cromatografia; **17:** solvente orgânico; **18:** esterilização por filtração; **19:** evaporador; **20:** misturador; **21:** excipientes; **22:** instrumentação; **23:** controlador

programável; **24**: condensador ( – : transferência de material; ---: linha de ar comprimido; -///- sinais eletromagnéticos).

[130] **A figura 9** mostra a cinética do processo de fermentação submersa em biorreator de bancada com capacidade de 14 litros. Os dados são representativos de quatro repetições independentes, executadas em batelada. No eixo y encontram-se as variáveis de estado analisadas ao longo do tempo (eixo x).

[131] **A figura 10** mostra o fluxograma e os rendimentos de cada etapa de processo de produção de uma composição farmacêutica leishmanicida. Os números representam as seguintes operações: 1- filtração; concentração, secagem e trituração; 2- extração, esterilização por filtração; 3- extração, esterilização por filtração; 4- cromatografia de adsorção, reagrupamento, esterilização por filtração. As letras de A a F representam as frações obtidas.

### **Descrição detalhada da Invenção:**

[132] A presente invenção inova em fornecer a preparação e produção de substâncias bioativas com ação leishmanicidas, superando desvantagens do atual estado da técnica. Destaca-se dos demais métodos porque emprega processos biotecnológicos em biorreator, facilitando a produção em grande escala e em menor período de tempo.

[133] A maioria dos estudos e patentes referidos no estado da arte faz menção a processos de produção de fungos para fins alimentícios ou tão somente a métodos de tratamento com determinada composição biologicamente ativa. Além disso, muitos desses procedimentos são demorados e complexos, exigindo um tempo de oito semanas ou mais. Isso reflete no custo relativamente elevado.

[134] Nenhuma referência anterior a esta invenção proporcionou processos e etapas para produção de uma composição leishmanicida

como aqui descrito. Tanto quanto se sabe, as matérias-primas e os processos empregados nunca foram usados para essa finalidade no campo da fermentação industrial. Medicamentos usados no tratamento de leishmanioses são basicamente fabricados sinteticamente.

[135] O cultivo em biorreator é uma alternativa tecnológica vantajosa, pois o produto final não é resultante de síntese química. A produção de fármacos sintéticos muitas vezes tem etapas delicadas, às vezes em condições perigosas, e inclui o uso de algumas matérias-primas que geram subprodutos tóxicos ao fim do processo. Além disso, nem todos os compostos naturais bioativos podem ser completamente sintetizados por via química. Um grande número de compostos têm estruturas complexas, que são muito difíceis e caras de serem sintetizadas em escala industrial. Processos que envolvam síntese biológica, como os desta invenção, não apresentam esta restrição. Tais tipos de processos são cada vez mais requeridos, uma vez que empregam matérias-primas renováveis e ocorrem em condições brandas e controladas.

[136] Neste contexto, a presente invenção apresenta um processo de produção mais econômico e prático, escalonável para indústria. Assim, outra finalidade da presente invenção é proporcionar composições menos tóxicas, mais efetivas. Deste modo, busca disseminar a acessibilidade auxiliem no controle de leishmanioses.

[137] A determinação de atividade das composições farmacêuticas foi realizada por bioensaios *in vitro* contra parasitos do gênero *Leishmaniaspp*. Nos bioensaios, os produtos resultantes ,dos processos de fermentação no estado sólido ou submerso(descrito posterior a fase de viabilidade do processo),foram diluídos na proporção adequada para se chegar à concentração final estabelecida.

[138] Os exemplos desta invenção servem para comprovar que os produtos resultantes de fermentação em biorreator e etapas posteriores são efetivos na produção de uma composição farmacêutica com atividade leishmanicida.

[139] Para comprovar a eficácia das substâncias foram utilizados quatro protocolos distintos, cada um destes com um fundamento diferente, independente dos demais na quantificação de atividade.

Foram realizados os seguintes tipos de bioensaios:

1. Parasitológico com contagem de parasitos vivos em câmara de Neubauer;
2. Determinação de viabilidade do parasito por quantificação da atividade mitocondrial por ensaio de metabolização do Sal Tetrazolium (MTT);
3. Quantificação de incorporação de Timidina marcada ao DNA por cintilografia;
4. Determinação de atividade anti-amastigota por contagem de parasitos viáveis.

[140] Os ensaios realizados com os extratos foram estatisticamente válidos e significativamente diferentes em relação aos controles sem tratamento. Muitas vezes, inclusive, o tratamento com os extratos foi superior à atividade da droga padrão para tratamento (o Glucantime). Dentro destas circunstâncias, os resultados obtidos comprovam que os passos dos processos propostos são eficazes para produção de uma composição farmacêutica leishmanicida.

A COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA resultante destes processos pode ser utilizada na prevenção e no controle da LV, LTA e da leishmaniose mucocutânea(LMC).

[140] Na sequência, a presente invenção é explicada em pormenor com base nos exemplos experimentais. Estes exemplos

demonstram eficácia dos processos na produção de uma composição leishmanicida. Além disso, são concebidos apenas para explicar esta invenção em detalhes. O fato de que essa invenção não se limita aos exemplos experimentais a seguir serão óbvias para quem tem um conhecimento comum no campo ao qual pertence esta invenção. O âmbito de aplicação técnica da presente invenção, no entanto, não será limitado a estes exemplos.

### **Exemplo 1 – Triagem de macromicetos para a produção de substâncias com atividade leishmanicida pelo método da timidina radiomarcada**

#### A) Quantificação da redução da proliferação celular pelo método da timidina radiomarcada

[141] Para avaliar a atividade de extratos do caldo de cultivo submerso de macromicetos contra parasitos do gênero *Leishmania*, o método da timidina radiomarcada (método conhecido do estado da arte - (ROCHE APPLIED SCIENCE. Cell proliferation/viability assay methods. Methods for studying cell proliferation and viability in cell populations In: Apoptosis, Cell Death, and Cell Proliferation Manual. 85-85, 2008)) foi adaptado, conforme descrito a seguir.

#### B) Cultivo micelial submerso e elaboração de extratos

[142] Em etapas preliminares do experimento, doze diferentes espécies de macromicetos, coletadas no estado do Paraná, foram identificadas, isoladas e cultivadas em meio líquido. De cada caldo de cultivo foram elaborados cinco diferentes extratos. Estes foram testados contra três espécies de protozoários do *L. enriettii*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. A partir deste experimento inicial, foram selecionados 12 dos 60 extratos, para serem avaliados pelo método da timidina radiomarcada.

[143] Para a produção dos doze extratos selecionados, foram cultivadas oito diferentes espécies de macrofungos: *Pleurotus djamor*, *P. calvescens*, *Lycoperdon marginatum*, *Perenniporia martiusii*, *Plectania*

sp., *Ganoderma australe*, *Ganoderma stipitatum* e *Oudemansiella canarii*. O meio de cultivo utilizado consistiu de: glucose (10 g/L), extrato de levedura (4 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,06 g/L) e  $\text{MgSO}_4$  (0,06 g/L), pH 6,0, autoclavado por 15 minutos. Os cultivos foram realizados em frascos Erlen-Meyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio, e inoculados, com fragmentos de micélios, de culturas puras previamente preparadas em placas de Petri contendo meio BDA. Os frascos foram incubados em agitador orbital ("shaker") a 120 rpm e 30°C por 30 dias.

[144] Após a recuperação do caldo de cultivo, por filtração à vácuo, este foi processado por dois diferentes métodos: concentração e extração com acetona. A concentração foi conduzida em rotoevaporador a 75°C até redução a 50% do volume inicial. A extração seguiu etapas descritas por Falkenberg (FALKENBERG, M. B.; Quinonas. In: Farmacognosia. Da planta ao medicamento. 5ª ed., Ed. UFSC/ UFRGS, pp. 657-683, 2003), para a recuperação de quinonas. Após filtração e concentração, conforme o método já descrito, quatro volumes de acetona foram adicionados aos caldos concentrados. Estes foram então armazenados em congelador (-2°C) por 24 horas, para precipitação de impurezas e, posteriormente eliminadas por centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. Após a extração, a acetona foi totalmente evaporada em câmara de exaustão, com o auxílio de uma chapa de aquecimento elétrica.

[145] O pH dos extratos foi ajustado para  $7.0 \pm 0.5$  com HCl e NaOH. Após o ajuste de pH, cada extrato foi filtrado em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  para esterilização. Esta filtração foi conduzida em câmara de fluxo laminar. Os extratos foram armazenados em freezer (-2°C) até a sua utilização.

C) Avaliação da atividade leishmanicida de extratos obtidos a partir do caldo de fermentação submersa do micélio de macromicetos, pelo método da timidina radiomarcada

[146] Promastigotas de *Leishmania infantum* foram cultivados em estufasa 23°C em garrafas de Roux, em meio Liver linfusion (LIT) modificado. Amostras foram coletadas periodicamente, para monitorar a concentração e a atividade dos parasitos. A contagem foi realizada em câmara de Thoma.

[147] Quando a concentração de parasitos atingiu a faixa de  $10^6\sim 10^7$  (parasitas/mL), as culturas foram diluídas com o respectivo meio de cultura até a faixa de  $10^5\sim 10^6$  (parasitas/mL). As culturas, adequadamente diluídas, foram distribuídas em microplacas de 96 poços, 100  $\mu$ L por poço. Então, 100  $\mu$ L de cada extrato foram adicionados a cada poço da placa (em triplicata). Controles positivo e negativo e um branco também foram adicionados. O controle positivo consistiu de 100  $\mu$ L Glucantime (300mg/mL) no lugar do extrato de macromiceto. O controle negativo consistiu de 100  $\mu$ L do meio de cultura respectivo, ao invés do extrato. O branco consistiu de 200  $\mu$ L de meio de cultivo apenas, sem parasitos e sem a adição de extratos de macromicetos. Cada poço recebeu 20  $\mu$ L de timidina radiomarcada, numa concentração de 0,1  $\mu$ Ci, diluída no meio de cultivo dos parasitos. Foi utilizada timidina marcada com carbono 14 ( $^{14}$ C). 20  $\mu$ L de cada solução radiomarcada foram armazenados como um controle de leitura.

[148] As placas foram incubadas em estufa por 40 horas a 23°C. Após a incubação, os protozoários foram recuperados de cada poço e transferidos para uma membrana filtrante, com o auxílio de um coletor de células ("cell harvester"). Os pedaços de papel filtro, contendo os parasitos foram transferidos para tubos, contendo 3 mL de solução de cintilação. A intensidade de emissão radioativa de cada amostra foi determinada em um leitor de cintilação (cintilador). Os resultados foram comparados por ANOVA de uma via e diferenças entre as amostras e os controles foram determinadas através do pós-teste de Multi

Comparação de Dunnett para níveis de significância de 1 e 5%. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 3.0.

[149] Os resultados deste experimento estão expressos nas **Figuras 1 e 2**. O extrato concentrado de *P. martiusii* exibiu mais atividade que o controle positivo para um nível de significância de  $P < 0,01$ . O extrato concentrado de *Plectania* sp. também foi mais ativo que o controle positivo, para um nível de significância de 5%. Os extratos concentrados de *P. calvescens* e *G. stipitatum* foram estatisticamente tão ativos quanto Glucantime 300 mg/mL para um nível de significância de 5%. Nenhum dos extratos de acetona apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo para  $P < 0,05$ . O valor médio de CPM para sete dos extratos testados foi menor que aquela do controle positivo. Os resultados mais expressivos de inibição foram observados para os extratos concentrados obtidos a partir do cultivo micelial submerso de *P. martiusii* e *Plectania* sp. Estes extratos foram 47 e 33%, respectivamente, mais ativos que o medicamento Glucantime® 300 mg/mL.

#### **EXEMPLO 2 – Bioensaios aplicando a composição leishmanicida contra *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. amazonensis***

[150] Este exemplo se refere a confrontos experimentais da composição leishmanicida contra *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/00/LTB300), *L. (L.) infantum* (MHOM/FR/71/LEM75) e *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269). Foram realizados dois métodos independentes para avaliação de atividade: o Parasitológico e o de Viabilidade por MTT((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). As espécies utilizadas são os principais agentes etiológicos das principais manifestações clínicas de leishmaniose, incluindo leishmaniose cutânea difusa, visceral e mucocutânea.

#### A) Método Parasitológico

[151] O método parasitológico é a técnica de certeza que usa estágio promastigota do gênero *Leishmania*. O procedimento se realiza *in vitro* em meios de cultura bifásicos, compostos por uma fase sólida com nutrientes e outra líquida para crescimento das formas flageladas.

O encontro entre amostra e parasito ocorreu na fase líquida de meios de cultura Nicole Nevy McNeal -NNN (Nicolle, C. Culture do parasite du bouton d'Orient. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences 146:842–843, 1908), que são compostos por Agar (16 g/L); Cloreto de Sódio (9 g/L); e sangue de coelho (10%).

[152] Para padronização dos experimentos foram utilizados promastigotas da fase final de crescimento exponencial, em concentração inicial ajustada para  $2 \times 10^6$  *Leishmania* por mL, incubados a 23°C por 72 horas de confronto.

[153] O volume total de reação na fase líquida foi de 500 µL, consistindo em alíquotas de 100 µL de solução de *Leishmania*, 100 µL de amostra e 300 µL de solução de cloreto de sódio 0,9% estéril. A solubilização das amostras foi feita em DMSO 5% em solução de cloreto de sódio 0,9%. Para as amostras, as concentrações foram especificadas conforme cada caso. A alíquota de amostra foi substituída por solução fisiológica DMSO 5% nos controles negativos (não tratados) ou por antimoniato de meglumina em DMSO 5% (Glucantime) nos controles positivos.

[154] A concentração final de Glucantime foi de 2000 µg/mL, correspondente a 540 µg/mL de antimônio ativo, padrão de referência no tratamento de leishmanioses.

[155] A concentração final de teste foi de 1000 µg/mL no caso dos seguintes extratos primários de material de *Perenniporia martiusii* produzido em biorreator:

$X_{dcm}$  – extrato diclorometano a partir de biomassa;

$X_{sup}$  – extrato aquoso a partir de biomassa;

$X_{inf}$  – extrato clorofórmico a partir de biomassa;

$X_{ac}$  - extrato acetona a partir de biomassa;

$S_{dcm}$  – extrato diclorometano a partir de caldo de fermentação;

$S_{ac}$  - extrato acetona a partir de caldo de fermentação.

No caso da fração D, obtida a partir do fracionamento de extrato diclorometano a partir de caldo de fermentação ( $S_{dcm}$ ), as concentrações variaram entre 125  $\mu\text{g/mL}$  a 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

Ao final do período de incubação, o número de promastigotas por mL foi contado com a ajuda de uma câmara de Neubauer (BOECO - Alemanha, com duas câmaras) e lamínula ultra-plana. Todas as amostras foram homogeneizadas antes da leitura. Quando havia aglomeração dos flagelados foi utilizada uma seringa com agulha fina para a separação dos parasitos. Para contar o número total de parasitos vivos, primeiro foram realizadas diluições (1:2, 1:4 ou 1:8) em solução esterilizada (tampão fosfatopH 7,2, formaldeído 2%, azul de Evans 0,1%). Esta solubilização foi feita a fim de reforçar o contraste, facilitando a quantificação do número total.

Em cada repetição de amostra foi realizada a contagem direta do número de promastigotas em microscópio ótico com auxílio de um contador estatístico, observando-se pelo menos 50 campos. Para o cálculo de promastigotas / mL foram considerados o fator diluição em cada caso e o volume da câmara de contagem fornecido pelo fabricante.

B) Método MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

A metodologia do MTT foi empregada com objetivo de verificar quantitativamente a viabilidade do parasito após diferentes tratamentos. O fundamento analítico utilizado neste exemplo foi a

quantificação de atividade metabólica de parasitos viáveis por ensaio colorimétrico. Aplicou-se o método *in vitro* com sal tetrazólio MTT (3-(4,5-dimetil-2-il)-2,5-brometo difeniltetrazolium) (Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65 (1-2): 55–63, 1983).

Este método tem sido utilizado com sucesso para determinação de atividade leishmanicida de vários fármacos em diversas referências (KIDERLEN, A.F.; KAYE, P.M. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cyto- toxicity against *Leishmania* parasites. *J Immunol Methods* 127: 11-17, 1978); (DUTTA A., BANDYOPADHYAY S., MANDAL C., CHATTERJEE M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International* 54: 119–122, 2005); (PALIT P. AND NAHID ALI. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61: 1120–1124, 2008). Exclusivamente determina-se a atividade de células viáveis, pois sais de tetrazólio são quimicamente reduzidos a sal insolúvel de formazan apenas por células metabolicamente ativas.

As espécies de *Leishmania* foram pré-cultivadas a 23°C até o final da fase logarítmica em garrafas contendo meio RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino (Gibco), com pH ajustado para 7,2. O crescimento foi quantificado em câmara de contagem. O material foi centrifugado, o meio de cultura antigo foi descartado e os parasitos sedimentados foram ressuspensos em meio de cultura novo até concentração desejada. A preparação e esterilização das amostras foi realizada de acordo com o Exemplo 1, mas não se limitando a ele. Ao final da distribuição aleatória de alíquotas nos ensaios, a concentração inicial de *Leishmania* foi de  $2 \times 10^6$  por mL. A

concentração de amostra foi de 1000 µg/mL para extratos primários, ou outra diversa quando especificado. O confronto entre parasita e fármaco teve volume total de ensaio de 1000 µL, sendo 100 µL correspondentes a alíquota de amostra e 900 µL a meio de cultivo com *Leishmania*.

O ensaio foi finalizado após 72 horas de incubação a 23°C. Descartou-se o sobrenadante após centrifugação e adicionou-se reagente MTT (5 mg/mL) em solução tamponada com fosfato (pH 7,2). Os parasitas foram ressuspensos para metabolização do MTT, que ocorreu durante um período estabelecido de 4 horas.

A reação ocorre a partir do sal tetrazólio MTT que é amarelo e solúvel em solução aquosa. O produto metabolizado, um sal formazan, é insolúvel em solução aquosa. Este foi separado e solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO), apresentando cor roxa. A quantidade de formazan foi avaliada pela leitura de absorbância em um leitor de microplacas (BioRad 570 nm). A intensidade de cor resultante é diretamente proporcional à atividade metabólica de parasitas viáveis.

Os resultados dos bioensaios pelo método Parasitológico e pelo método do MTT estão apresentados nas **Figuras 3A e 3B**, respectivamente, para *L. braziliensis* e *L. infantum*; as espécies com maior inibição pelas composições obtidas. Nos gráficos estão expressos os resultados de contagem (eixo **y** esquerda) e de absorbância após formação de sal formazan (eixo **y** direita). Os resultados que foram estatisticamente validados, diferentes do controle negativo (não tratado) receberam um asterisco, representando um nível de significância de 5% por comparação multivariada. Para *L. infantum* o método parasitológico mostrou que os extratos com maior atividade foram D250, D500, D1000, D2000 e Sdcm. Para *L. braziliensis* dentre os extratos testados o extrato com atividade foram D250, D500, D1000, D2000 e Sdcm, sendo que D2000 foi o que mostrou melhor resultado.

### **EXEMPLO 3 – Preparação de uma composição farmacêutica leishmanicida**

Este é um exemplo que trata da elaboração de uma COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA a partir de produtos resultantes de fermentação em biorreator. Ao término da fermentação submersa, o material foi submetido à filtração em papel Wathman 1, resultando em biomassa e caldo de fermentação. Em seguida o volume de caldo foi centrifugado para remoção completa de biomassa. Em média, o rendimento de material a cada 10 litros de meio de cultura foi de 109 gramas de micélio (base seca) e 20 gramas de caldo liofilizado.

A biomassa foi congelada e liofilizada a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante um período de três dias. O caldo de fermentação foi concentrado por evaporação a vácuo em baixa temperatura ( $35^{\circ}\text{C}$ ), removendo-se 37,5% de teor de líquido. Depois disso foi congelado com espessura de 8 mm em bandejas e liofilizado a menos  $40^{\circ}\text{C}$  por seis dias. O material, já seco, foi ralado manualmente, atingindo granulometria menor que Mesh 80.

Extrações com os seguintes solventes orgânicos foram realizadas: acetona, diclorometano e clorofórmio. A quantificação dos compostos foi feita usando uma balança analítica, podendo-se quantificar os rendimentos.

Uma das principais amostras ativas correspondeu à extração do caldo liofilizado com diclorometano ( $S_{\text{dcm}}$ ). Para fracionamento, 256 mg deste extrato foram aplicados ao topo de uma coluna de cromatografia (45x5 cm). Esta estava devidamente preenchida com sílica gel (Vetec, Mesh 60-240).

A fase móvel aplicada foi de polaridade crescente de solventes. O fracionamento ocorreu pelo princípio de adsorção, resultando em 225 frações. A taxa de eluição da coluna foi de 1 mL por minuto, utilizando-se os seguintes solventes: éter de petróleo, acetato de etila,

etanol e água destilada. Antes da aplicação da amostra, a sílica foi ativada em mufla a 550°C por 24 horas.

Para obtenção de uma composição leishmanicida três etapas foram realizadas. A primeira consistiu em evaporar o solvente da fase móvel, restando apenas os compostos separados. A segunda etapa consistiu no reagrupamento das frações em amostras semelhantes (A; B; C; D; E; F). Isto foi realizado de acordo com os deslocamentos analisados por cromatografia em camada delgada. Os seguintes valores de Rf foram obtidos: A - 0,6 a 0,7; B - 0,5 a 0,6; C - 0,2 a 0,4; D - 0,8; E - 0,1 a 0,2; F - 0 a 0,1.

As 225 frações foram reunidas em seis grupos, os quais foram testados para composição farmacêutica da presente invenção. A terceira etapa consistiu na solubilização dos grupos em solução fisiológica, ajuste de pH para  $7.2 \pm 0.5$  e esterilização individual por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ . Esta filtração foi conduzida em condições assépticas. O material resultante dos processos é a composição farmacêutica leishmanicida, a qual foi armazenada em freezer até a sua utilização.

A **Figura 4** representa o cálculo das inibições (diferença em relação ao total sem tratamento) para as três espécies de *Leishmania* testadas. Os ensaios tratados tiveram quantidade final de parasitos menor que os controles não tratados. O índice calculado de inibição em relação ao controle não tratado demonstrou a maior inibição de 50% para a fração D, obtida a partir da preparação do extrato de caldo de fermentação de *Perenniporia martusii* extraído com diclorometano.

Demonstra-se uma redução da concentração-dependente de tratamento com extratos de caldo e biomassa. Os dados apresentados em pontos ou intervalos são as médias e o desvio padrão de triplicatas a partir de dois experimentos independentes.

**EXEMPLO 4 – Bioensaios aplicando a composição leishmanicida contra formas amastigotas de *L.braziliensis***

Este experimento teve por objetivo verificar a quantidade total de amastigotas viáveis internalizados em macrófagos.

Células residentes peritoneais foram coletadas de camundongos BALB / c esemeadas em fundo de placas de 24 poços para cultura de tecidos (TFP). As células não-aderentes foram removidas após 2 horas a 37°C em incubadora de CO<sub>2</sub> (5%) e macrófagos aderentes que se fixaram foram incubadas durante doze horas em meio RPMI 1640 suplementados com 10% SFB (Gibco) (v/v), nas mesmas condições, como descrito acima (NOLETO, G.R.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, M.B.M. Effects of a lichen galactomannan and its vanadyl(IV) complex on peritoneal macrophages and leishmanicidal activity. *Molecular and Cellular Biochemistry* 233: 73–83, 2002); (MARCOLINO, M.M.K. Avaliação de Atividade leishmanicida in vitro de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e naturalmente sulfatados. Dissertação Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular - Universidade Federal do Paraná 2010).

Promastigotas do cultivo *in vitro* foram retirados e lavados em PBS, então adicionados aos macrófagos aderidos em razão parasito:células de 5: 1. Após 12 horas a 34 ° C em 5% de CO<sub>2</sub>, os parasitos livres foram removidos por lavagens repetidas. Novo meio de cultura foi adicionado e as culturas foram incubadas com tratamento das composições farmacêuticas na concentração de 1000 µg / mL em condições descritas anteriormente por um período adicional de 72 horas.

O meio de cultura foi descartado e acrescentou-se 400 µL de solução fisiológica. Em seguida os macrófagos aderentes foram raspados da superfície usando uma haste metálica esterilizada com ponta não-afiada. A raspagem foi realizada de forma padronizada,

obedecendo duas vezes o seguinte ciclo: dez vezes da esquerda para a direita, dez vezes de cima para baixo, dez vezes sudoeste-nordeste, dez vezes noroeste-sudeste e mais duas vezes raspagem circular.

Para a quantificação de sobrevivência de amastigotas dentro de macrófagos, o material raspado em solução salina foi colocado em contato com meio Tobbie Evans, que é um dos melhores meios padronizados para fins de diagnóstico e transformação de volta da fase amastigotas em promastigotas.

A distribuição homogênea da aderência e da quantidade de macrófagos peritoneais de camundongos e sua infecção com amastigotas internalizados foram evidenciados por microscopia. A eficiência do método de raspagem também ocorreu como esperado. O experimento foi conduzido sob condições ótimas de cultivo para os macrófagos.

O meio foi retirado e lavado duas vezes com PBS pH 7,2 e, portanto, todos os nutrientes extra que poderiam permitir que as diferenças nos resultados de crescimento foram lavadas, deixando apenas o padrão bifásico em meios Tobbie Evans com solução salina.

Após a raspagem e a colheita dos macrófagos, a transformação de *Leishmania* de volta para as formas promastigotas demorou aproximadamente sete dias de incubação no meio Tobbie Evans, a 24°C. O número total de promastigotas foi contado em Câmara de Neubauer.

Nas Figuras 5 e 6 as formas promastigotas confrontadas aos extratos. As diferenças foram observadas em cada repetição, em quantidade total final, demonstrando atividade de Glucantime em 2000 µg/mL, extrato diclorometano a partir de caldo de fermentação ( $S_{dcm}$ ) e a extrato clorofórmico a partir de biomassa ( $X_{inf}$ ) em 1000 µg/mL.

**EXEMPLO 5 – Processo de produção de composição farmacêutica leishmanicida envolvendo Fermentação Submersa em Biorreator**

O fungo *Perenniporia martiusii*, pertencente à família Polyporaceae, foi escolhido e utilizado nas experimentações a seguir. De acordo com o exemplo 1, o extrato deste macromiceto apresentou a melhor atividade leishmanicida, dentre as espécies avaliadas.

A) Manutenção e cultivo de *Perenniporia martiusii*

Os micélios são mantidos por repique periódico (subcultura) em ágar batata dextrosado (BDA) e refrigeração a 4°C. Em paralelo, estão sendo mantidos a -80°C, seguindo o protocolo descrito por Homolka, Lisa & Nerud (HOMOLKA, L.; LISÁ, L.; NERUD, F. Basidiomycete cultures on perlite survive successfully repeated freezing and thawing in cryovials without subculturing. *Journal of Microbiological Methods* 69: 529-532, 2007).

Esta espécie apresenta fácil cultivo e crescimento relativamente rápido (entre 0,3 e 0,7 cm/s de crescimento radial, a 27°C em BDA). Os micélios foram cultivados em uma ampla faixa de temperatura (15~35°C, com ponto ótimo em torno de 27°C) e uma grande diversidade de substratos orgânicos. Apresentaram coloração inicial branca e após consolidação do crescimento, em placas de Petri, se expostos a certo grau de luminosidade, formam regiões de coloração preta. Pode ocorrer a formação de pequenos basidiomas na superfície da placa após consolidação do crescimento micelial. Quando cultivados em meio líquido, sob agitação, os micélios formam pellets de diâmetro variável. Se cultivados sem agitação, formam uma camada na superfície do meio, e pequenos basidiomas podem se formar sobre esta camada.

Este fungo também pode ser cultivado em substratos à base de grãos, como milho e trigo ou à base de cepilho de madeiras como

eucalipto ou pinus, suplementado com farelo de trigo e  $\text{CaCO}_3$ . Resíduos agroindustriais como palhas e bagaços, adequadamente suplementados, também se mostraram eficientes para serem utilizados como substrato para o cultivo desta espécie. Após o completo crescimento micelial, em meios sólidos, pequenas frutificações puderam ser induzidas, expondo o substrato miceliado à iluminação circadiana suave e um pouco de ventilação (diminuição da concentração de  $\text{CO}_2$ ).

#### B) Cultivo de micélio para preparo de inóculo

Culturas estoque foram mantidas e subculturas foram realizadas normalmente a cada quatorze dias. O inóculo de micélio foi preparado pela transferência de culturas frescas que apresentassem crescimento uniforme. Foram recolhidos discos de 1  $\text{cm}^2$  de Agar com micélio crescido com o auxílio de um tubo de metal esterilizado. O material foi então transferido para frascos contendo meio líquido.

Na primeira etapa da preparação do inóculo, as culturas puras foram cultivadas em meio líquido relatado por Fan Leifa (FAN, L. Production of extra-cellular polysaccharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Processos Tecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 30-50p, 2002), constituído por glicose, 20 g/L; extrato de levedura, 3 g/L; extrato de malte, 1 g/L; fosfato dibásico de sódio, 0,1 g/L; sulfato de magnésio 0,1 g/L e cloreto de cálcio 0,02 g/L.

A solução do meio de cultura teve pH ajustado entre 4,5 e 8,0. A efetiva distribuição e homogeneização do micélio foi mantida a fim de permitir que o inóculo crescesse distribuído.

O cultivo foi feito sob agitação em frascos Erlenmeyer (250 – 500 mL), incubados em agitador rotativo a uma velocidade de 120 rpm. Com agitação menor, o micélio tende a obstruir ou crescer formando

agregados. Após cinco dias de agitação à temperatura 30°C, a cultura foi suficientemente desenvolvida para transferência para a fase seguinte de preparação de inóculo. Na segunda etapa, uma unidade maior, com mais volume de meio de cultura foi utilizada. Procedeu-se então a transferência do inóculo preparado para o biorreator.

### C) Cultivo de micélio de fungo em biorreator

No processo de fermentação submersa, um vaso de biorreator cilíndrico pressurizável com capacidade de 14 litros foi carregado com 10 litros de meio de cultura líquido. Um meio foi preparado como se segue: 200 g de glicose, 30 g de extrato de levedura e 10 g de extrato de malte dissolvidos em dez litros de água deionizada e suplementados com 1,2 g de fosfato dibásico de sódio, 1,2 g de sulfato de magnésio, 0,2 g de cloreto de cálcio. O material foi homogeneamente misturado até obtenção de concentrações adequadas.

O reator com o meio de cultivo foi esterilizado por vapor úmido a 121°C por 30 minutos. Em seguida foi resfriado e teve o pH inicial ajustado em 6,1 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou NaOH esterilizados. O ar pressurizado foi introduzido no fermentador pelo fundo a uma taxa de um volume de ar por minuto por litro de cultura. A agitação foi mantida em 250 rpm com eixo de agitação do tipo hélice.

Um inóculo de 30 g (calculado em base seca) de micélio fúngico foi transferido por pressão positiva para o biorreator de bancada para fermentação submersa. O cultivo prosseguiu por um período de 120 horas a 28°C. A amostragem foi realizada a cada 12 horas.

O resultado da cinética fermentação, representada pelo consumo de glicose, formação de biomassa e proteína solúvel, além das variações de oxigênio dissolvido (dO<sub>2</sub>) e pH estão representados na **Figura 7**.

O rendimento da reação (Y<sub>x/s</sub>) de biomassa (X) a partir de substrato (S) foi de 0,43 gramas de biomassa por grama de glicose, com

consumo de 94% da glicose para o crescimento e manutenção (Figura 7).

A fermentação submersa foi escolhida neste exemplo porque converteu todo o açúcar disponível para a biomassa e produto em apenas 48 horas, um período de tempo relativamente curto. Em cultura líquida o fungo apresentou formação distribuída de micélio, sem afetar as características de fluxo quando sob agitação contínua.

#### **EXEMPLO 6 – Processo de produção de composição farmacêutica leishmanicida envolvendo Fermentação no Estado Sólido**

Outra via para a produção de compostos macrofúngicos com atividade leishmanicida é a fermentação no estado sólido. Assim como no exemplo 2, o fungo *Perenniporia martiusii* foi escolhido, pois de acordo com o exemplo 1, o extrato deste macromiceto apresentou a melhor atividade leishmanicida dentre as espécies de macromicetos avaliadas.

##### A) Manutenção do fungo

Culturas estoque foram mantidas em meio sólido de Batata Dextrose Agar (BDA), contidas em tubos de ensaio (inclinados) ou em placas de Petri. Subculturas foram realizadas pela transferência de pedaços de micélio depois que este mudasse de cor branca para marrom-acinzentada, normalmente a cada quatorze dias. Uma segunda fonte estoque foi mantida por meio da inoculação em substrato constituído de grão de milho e carbonato de cálcio (0,2%). A cepa foi incubada a 28°C e após crescimento foi preservada e estocada a 4°C por período de até três meses.

##### B) Cultivo de micélio de fungo em meio líquido para preparo de inóculo

O inóculo de micélio foi preparado pela transferência de culturas frescas que apresentassem crescimento uniforme. Recolham-se discos

de 1 cm<sup>2</sup> de Agar com micélio crescido por sete dias com o auxílio de um tubo de metal esterilizado. Neste experimento o meio líquido utilizado foi o relatado por Fan Leifa (FAN, L. Production of extra-cellular polyssacharide from *Agaricus blazei* by submerged and solid state fermentation and its antitumor effect. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Processos Tecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 30-50p, 2002), constituído por Glicose, Extrato de Levedura, Extrato de malte, Fosfato de sódio dibásico, Sulfato de Magnésio e Cloreto de cálcio. O cultivo foi feito sob agitação em meio líquido em frascos Erlenmeyer (250 mL – 500 mL), incubados em shaker (120 rpm, 28°C) por 5 dias.

#### C) Preparo de inóculo sólido

Também denominado popularmente como "semente" ou "spawn", o inóculo para fermentação sólida foi preparado, no presente exemplo, utilizando grãos de milho como substrato principal. Os grãos foram cozidos, sua umidade foi ajustada para próximo de 70% e 1% de carbonato de cálcio (em relação à massa seca de grãos) foi adicionado. A mistura foi acondicionada em sacos de polipropileno com filtros adaptados. O substrato empacotado foi autoclavado a 121°C por 40 minutos. Após resfriar à temperatura ambiente, os pacotes foram inoculados com culturas de micélio em meio líquido, preparadas conforme descrito no item anterior. Os pacotes inoculados foram incubados a 25°C por 30 dias até a completa miceliação.

#### D) Fermentação no estado sólido em sacos de polipropileno

O substrato de produção escolhido para o presente exemplo consistiu de cepilho de eucalipto, suplementado com 20% de farelo de trigo e 1% de carbonato de cálcio. Foi adicionada água, ajustando a umidade para aproximadamente 70% e a mistura foi acondicionada em sacos de polipropileno com filtros adaptados. O substrato empacotado foi autoclavado a 121°C por 40 minutos. Após resfriar à

temperatura ambiente, os pacotes receberam inóculo sólido ("semente", "spawn") em uma taxa de inoculação de aproximadamente 10%. Os pacotes inoculados foram incubados a 25°C por 30 dias, até a completa miceliação do substrato.

#### E) Fermentação no estado sólido em biorreator

O processo descrito neste item está ilustrado na figura 8. Conforme o item anterior, o substrato de produção escolhido consistiu de cepilho de eucalipto, suplementado com 20% de farelo de trigo e 1% de CaCO<sub>3</sub>. Foi adicionada água, ajustando a umidade para aproximadamente 70% e a mistura foi acondicionada em um biorreator do tipo tambor rotatório. O substrato foi autoclavado *in situ*, a 121°C por 40 minutos. Após resfriar à temperatura ambiente, o reator recebeu inóculo líquido, em condições assépticas, transferido por pressão positiva em uma taxa de inoculação de aproximadamente 10%. O reator operou a 25°C por 30 dias, com rotação intermitente (1 minuto de rotação 5 rpm a cada meia hora) e umidade controlada em aproximadamente 70%, até a completa miceliação do substrato.

Os itens apresentados a seguir descrevem as etapas dos processos propostos, em forma de fluxogramas, na presente invenção estão representados nas **Figuras 8 e 9**. Respectivamente, esquematizam processos que envolvem a tecnologia de fermentação submersa e a tecnologia de fermentação no estado sólido. A seguir será detalhada a série de etapas destes processos, desde a preparação inicial das matérias-primas até a obtenção final de uma composição com ação leishmanicida.

A etapa fundamental dos processos compreende a cultura de micélios macrofúngicos em biorreator; fornecendo condições apropriadas para o cultivo. Ao final, procedimentos específicos de processamento de micélio e substratos fermentados devem ser incluídos para melhorar a qualidade e facilitar manuseio do produto acabado.

O início do processo consiste no acondicionamento de fontes de carbono, nitrogênio e sais inorgânicos no compartimento do biorreator. O tipo de compartimento depende do tipo de fermentação a ser realizada. No caso de fermentação submersa, os nutrientes são dissolvidos em meio líquido, o qual pode ser depositado em biorreatores clássicos, tais como tanque agitado, coluna de bolhas e airlift, ou em biorreatores não convencionais. No caso de fermentação em estado sólido, corresponde à distribuição de substratos sólidos e suficiente umidade em reatores clássicos do tipo bandeja ou tambores rotativos.

Tal COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA inclui, particularmente, produtos de processos fermentativos industriais de cultivo micelial de fungos, os quais são produzidos em biorreator por fermentação submersa e ou por fermentação em estado sólido. Ao final dos processos de fermentação submersa, dois produtos genéricos são obtidos: micélio macrofúngico e parte extracelular do meio líquido de fermentação. Respectivamente, essas fontes de matéria-prima serão doravante denominadas biomassa e caldo. No caso dos processos no estado sólido, o produto de fermentação consiste de substrato sólido miceliado, devido à dificuldade de separar o micélio do substrato ao fim do processo.

Estes produtos serão convertidos em PRODUTOS SEMI-ELABORADOS, os quais após processamento servirão como INSUMO FARMACÊUTICO (Lei nº 5.991/73 Art. 4º, Item III. Decreto 79.094/77 Art. 3º IV e Lei nº 11.951 de 24 de junho de 2009. Brasil).

As características das matérias-primas utilizadas na preparação do meio de cultura são de fundamental importância na qualidade do produto final. Em alguns casos é necessário efetuar ajustes, principalmente em relação às quantidades de substrato presentes, que podem estar em deficiência ou excesso. Às vezes a matéria-prima não está em conformidade para uso e necessita passar por tratamentos

prévios. Vários tipos de adequação podem ser incluídos a critério do operador. Entre as opções, muitas são corriqueiramente utilizadas como ajuste da granulometria, maceração, filtração, homogeneização, resfriamento, aquecimento, esterilização, complementação nutricional, diluição, ajuste de pH, hidrólises ácidas, hidrólises básicas e tratamentos enzimáticos.

O sucesso de um bioprocesso depende de fermentações produtivas e da manutenção somente das espécies de microrganismos inoculadas a cultura (monocultura). O procedimento de eliminação de contaminantes pode ser feito tanto por filtração ou destruição por calor. Antes da adição do inóculo é essencial esterilizar o meio de cultura e os equipamentos a serem utilizados durante o processo. Para evitar a contaminação pode ser acrescentada uma ou mais etapas de esterilização.

Um procedimento clássico de esterilização é o de submeter o meio de cultura e o biorreator ao processo de esterilização em autoclave. Qualquer outro método equivalente, todavia, pode ser aplicado. A passagem direta de vapor através do meio de cultura, pelos equipamentos e pelo vaso de fermentação, por exemplo, é igualmente eficiente. Uma alternativa possível é realizar procedimentos de pasteurização, ou repetindo-se o processo após certo intervalo de tempo, a fim de eliminar esporos latentes não desativados numa primeira vez por tindalização. Para realização de fermentação em estado sólido, uma baixa atividade de água favorece o processo com poucas contaminações bacterianas.

No método descrito de fermentação submersa, o meio foi preparado, inserido em um reator BIOFLO 110 (New Brunswick) e foi então esterilizado em autoclave a 121°C por um período de trinta minutos. Para a fermentação no estado sólido, o substrato foi

esterilizado a 121°C por 40 minutos e transferido para o interior do reator esterilizado.

Logo após resfriar o meio de cultura pós-esterilização será adicionado o inóculo. O micélio acrescentado é suavemente agitado por vários dias até o final do crescimento. De acordo com a força de agitação, diversos agregados de micélio se formam em vários diâmetros; principalmente em forma globular. Tais agregados se estabelecem em virtude do material polissacarídico formado na superfície do micélio, o qual age como um aderente.

Após o resfriamento dos meios líquidos até a temperatura de 28°C, o pH pode ser ajustado para 6,1 com ácido fosfórico e hidróxido de sódio esterilizados.

O inóculo deve ser previamente preparado em outro recipiente. A finalidade é obter uma quantidade inicial suficiente para dar início à fermentação. A preparação do inóculo deve começar com culturas puras de uma espécie de cogumelo escolhido. Diversas linhagens de macromicetos, incluindo duas da espécie *P. martiusii* foram isoladas de espécimes coletados de regiões da Mata Atlântica paranaense pelo próprio grupo.

A preparação de tais culturas é conhecida e compreendida por todos aqueles aptos no estado da arte. Na presente invenção, novas culturas foram iniciadas tanto por esporos como por fragmentos de basidiocarpos. Foi experimentalmente determinado que as seguintes espécies são particularmente desejáveis e adaptadas para o processo adiante descrito: *Pleurotus djamor*, *P. calvescens*, *Lycoperdon marginatum*, *Perenniporia martiusii*, *Plectania sp.*, *Ganoderma australe*, *Ganoderma stipitatum* e *Oudemansiella canarii*. Destas espécies, a mais desejável para a realização desta invenção foi *P. martiusii*.

A preparação de um inóculo conforme a presente invenção proporciona uma operação em dois estágios. O primeiro é a

transferência asséptica de micélio macrofúngico crescido em placas de Petri para um frasco contendo meio de cultura líquido. O segundo é a transferência para um frasco maior com maior volume de meio líquido. Nos dois estágios o material é incubado em temperatura ótima, sob agitação constante. No caso de cultivos no estado sólido, pode ser utilizado inóculo sólido, também conhecido como “semente” ou “spawn”, usualmente preparado com grãos de cereais esterilizados e inoculados com culturas puras de macromicetos.

O processo de transferência de inóculo pode ocorrer de várias maneiras. Inóculos produzidos em meios líquidos podem, por exemplo, ser adicionados por pressão positiva. Conecta-se uma linha de ar comprimido a um filtro de ar com capacidade de reter partículas maiores que 0,22  $\mu\text{m}$ . Esta linha de entrada de ar pressurizado deve estar conectada a um recipiente que contenha o inóculo (figs. 8.4 e 9.4). Então se aplica pressão suficiente para impelir o inóculo por outra tubulação vinculada ao recipiente, como uma cânula ou mangueira. Desta forma o inóculo é encaminhado em condições assépticas até o vaso principal do biorreator, juntando-se ao meio de cultivo esterilizado.

Por medidas de segurança, todos os recipientes devem ser dimensionados para suportar pressão maior que a de trabalho. Além disso, devem suportar a esterilização prévia, levando em consideração o vácuo criado durante resfriamento. Igualmente, linhas, válvulas e conexões devem suportar tais condições. Uma saída de ventilação sempre deve ser considerada.

Em alguns casos o recipiente deve estar adaptado às condições de cultivo, principalmente quando se tratar de grandes volumes de inóculo. Se trabalhar com pequenos volumes, pode ser feita a transferência manual do inóculo para este recipiente, desde que em condições assépticas, como por exemplo, dentro de um fluxo laminar.

No processo de fermentação, a cultura pode ser realizada de forma contínua se o meio de cultura é retirado em fluxo contínuo, enquanto meio novo é introduzido ao fermentador na mesma taxa (fig. 8.7). Contudo, processos em batelada são igualmente eficazes, desde que a formulação aquosa preparada seja adequada.

O controle direto do processo pode ser feito com auxílio de sistemas clássicos (conhecidos do estado da técnica) de controle de temperatura (figs 8.8), pH (figs. 8.5 e 9.7), aeração (figs. 8.1, 8.2, 8.3, 8.11, 9.1, 9.2, 9.3 e 9.11) e agitação (figs. 8.12 e 9.12). Os controles podem utilizar instrumentação variada, desde que suportem as condições de esterilização e cultivo.

Se possível, a temperatura deve ser monitorada e mantida constante durante todo o experimento utilizando um sistema automatizado de controle. Trocadores de calor convencionais já satisfazem essa exigência.

Outro fator a ser considerado é a aeração. Ela deve suprir as necessidades aeróbias do cultivo de micélio macrofúngico. A aeração é feita por injeção de ar comprimido ou ar enriquecido com oxigênio. A compressão dos gases pode ser feita por um compressor normal, entretanto, obrigatoriamente deve ser esterilizado por filtros apropriados.

Para melhorar a eficiência de transferência de massa de oxigênio para o meio líquido faz-se agitação forçada. Em fermentação submersa a agitação pode ser feita por um eixo mecânico movido por motor ou pela injeção turbulenta de ar. Para meios sólidos, o usual são tambores rotatórios, com agitação lenta e intermitente, para evitar um excesso de danos ao micélio.

A agitação ideal serve para que o micélio se fragmente e não permita aglomeração e aumento de viscosidade que impossibilite a adequada dissolução de oxigênio. A velocidade de rotação deve ser suficiente para homogeneização e dispersão do ar injetado. Entretanto,

não deve proporcionar a perda de capacidade de crescimento. Na agitação mecânica, o micélio pode ser danificado se a velocidade de rotação do eixo for muito elevada. No caso de um agitador do tipo hélice a velocidade deve estar entre 100 e 400 rpm.

Chegando ao fim do processo, a fermentação deve ser descontinuada. Para o rendimento máximo deve-se recolher a cultura no momento em que a glicose se esgote devido à utilização pelo micro-organismo. Este ponto pode ser facilmente verificado pelo pH da cultura que começa a subir devido à autólise do micélio. Um período de tempo suficiente de crescimento, por exemplo, leva 120 horas.

A amostragem da cultura pode ser feita em qualquer momento para verificação de rendimento, o qual é determinado por pesagem após separação do micélio da fase líquida. Da mesma forma pode ser analisada a concentração momentânea de açúcares, proteínas solúveis ou qualquer outro nutriente por metodologias específicas para cada caso. No caso dos meios sólidos, devido à dificuldade de separar o micélio do substrato sólido ao fim do processo, a determinação da biomassa apenas pode ser realizada por metodologias indiretas, como a dosagem de ergosterol (lipídeo produzido pelo fungo) no fermentado.

O produto resultante logo a seguir da fermentação em biorreator não é o mais adequado para ser, adicionado diretamente à COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, proposta na presente invenção. O processamento dos fermentados permite a obtenção de produtos mais eficazes e específicos. Se possível, o material deve ter fácil manuseio para ser de possível quantificação e inclusão na composição, conforme sugerido.

O micélio é recuperado a partir da cultura por filtração ou, preferencialmente, por centrifugação e é, portanto, separado. Este micélio úmido é de preferência lavado com solução tamponada em um pH na faixa de 6-7 para remover o meio de cultura. Ele está pronto

para ser usado como uma matéria-prima para a obtenção de compostos leishmanicidas. No caso dos fermentados sólidos, o micélio não pode ser facilmente separado do meio de cultivo, dessa maneira todo o fermentado deve ser utilizado para os processos extrativos.

Tanto micélios recuperados de fermentação submersa, como fermentados sólidos podem ser desidratados (figs. 8.21 e 9.14) para que se mantenha boa condição de conservação e para isso qualquer uma das técnicas usuais de secagem que não ultrapassem 50 graus Celsius podem ser empregadas. Sugere-se a aplicação do processo de liofilização, no qual o material é congelado e então submetido à vácuo para sublimação da água.

O processo inclui ainda a etapa de aproveitamento do caldo de cultivo fermentado, que é igualmente útil como matéria-prima para composição leishmanicida. Da mesma forma o caldo pode ser desidratado para obtenção de produto com menor grau de umidade.

O processo de redução de tamanho e fragmentação, aqui descrito, de preferência envolve o uso de um aparelho capaz de submeter a mistura a uma força de cisalhamento alta (figs. 8.22 e 9.15). Tal processo de redução de tamanho inclui o uso de uma superfície metálica perfurada com furos dispostos em diagonais para afetar o corte e fragmentação do material processado por raspagem.

Em uma modalidade, o aparelho de redução de tamanho pode incluir um misturador de alto cisalhamento. Em outra modalidade, o aparelho pode incluir um homogeneizador, moinho ou liquidificador. Em geral, o uso de uma superfície metálica perfurada é preferível ao homogeneizador. Em algumas modalidades, o processo de redução de tamanho pode usar dois aparelhos devidamente operados seqüencialmente.

Em algumas situações quando em escala de planta piloto, outro aparelho pode ser usado. As forças de cisalhamento geradas dentro

dos equipamentos de processo devem ser configuradas devidamente para obtenção de redução de tamanho para pelo menos Mesh-80.

Os materiais liofilizados, finamente particulados, de biomassa, caldo ou fermentado sólido, devem ser suspensos em solvente orgânico e mantidos a temperatura ambiente e pressão atmosférica. Sugere-se agitação contínua durante um período de doze horas.

Após extração, o solvente deve ser filtrado para a remoção de sólidos em suspensão. Depois disso deve-se proceder a evaporação do solvente, deixando apenas o resíduo de fundo. Esta etapa pode ser realizada preferencialmente em um evaporador a vácuo do tipo rotativo.

A utilização de solventes orgânicos para extração deve ser feita com material sem a presença de água. Isto permite a extração direta com solvente orgânico sem a presença de emulsões água-solvente. Para melhorar os processos de extração e recuperação, o material pode ser submetido a processos físicos ou químicos conhecidos, tais como o uso de sonicação, homogeneização de células, enzimas líticas, tensoativos, etc. A seguir, o extrato obtido pode ser separado através de uma coluna de adsorção. Por exemplo, pode ser utilizada uma coluna de sílica compactada ou coluna Sephadex (LH20) para o fracionamento (figs. 8.23 e 9.16). Alternativamente, o micélio ou fermentado, podem ser usados diretamente na composição. O material deve ser pesado para determinação da quantidade de aplicação. Posteriormente, os compostos devem ser dissolvidos em solvente apropriado. O uso de dimetilsulfóxido (DMSO) é indicado, desde que a concentração final não chegue a mais de 1%.

As amostras devem ser filtradas assepticamente por membrana 0,22 µm para esterilização sem interferência de calor (figs. 8.25 e 9.18). Nesta fase o extrato está pronto para ser usado em uma composição farmacêutica. Sugere-se que os produtos finais dos processos descritos

anteriormente devem ser armazenados em freezer até o momento de sua utilização.

Os resultados de rendimentos e fluxograma dos processos para preparação de uma composição farmacêutica estão apresentados nas **Figuras 7 e 10**. O material foi processado individualmente até que fossem feitos bioensaios *in vitro* contra formas promastigotas e amastigostas de espécies de *Leishmania*.

Após os dados experimentais realizados e a confirmação da atividade inibitória de multiplicação do parasito a presente invenção as COMPOSIÇÕES FARMACEUTICAS mostraram que pode ser usada *in vivo*, isolada ou associada a algum aditivo, para tratar pacientes humanos infectados ou suspeitos de estarem infectados por *Leishmania*, ou *in vitro* para avaliar o efeito sobre um produto biológico.

Os hospedeiros que podem ser tratados, com a referida composição farmacêutica, incluem mamíferos, (principalmente o ser humano), mas também canídeos, roedores, marsupiais, xenartros (preguiça e tamanduá), eqüídeos e mulas. A eliminação do parasito também pode ser feita diretamente com o tratamento do hospedeiro animal. Isto possibilita eliminar ou prevenir a transmissão para seres humanos a partir de animais domésticos ou selvagens. Como as composições da invenção não são tóxicas em concentrações eficazes podem ser seguramente utilizadas para tratar pacientes humanos. Ressalta-se que a composição final deve necessariamente incluir uma quantidade farmacêuticamente eficaz de algum dos produtos de processo propostos. Conforme a espécie de fungo utilizada durante a fermentação, o material final terá características específicas. No caso do uso de *Perenniporia martiusii* para produção de uma composição leishmanicida, o material final tem aspecto líquido grosso, de cor amarela e odor amadeirado.

De acordo com a presente invenção, o material resultante do processo de produção de caldo e biomassa pode ser utilizado em formulação que aplique excipientes sabidamente empregados na produção de medicamentos como, por exemplo, aerossóis, alcoolatos, alcoolaturas, ampolas, cápsulas, cataplasmas, colutórios, comprimidos, cremes, drágeas, elixires, emulsões, frascos herméticos, géis, linimentos, loções, óvulos, pastas, pastilhas, pensos transdérmicos, pílulas, poções, pomadas, pós, seringas, soluções, supositórios, suspensões, tabletes, tinturas, unguentos e xaropes; os mesmos válidos na Farmacopéia Brasileira, volumes 1 e 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2010.

Os excipientes empregados nesta invenção também podem ser adsorventes, agentes reguladores de pH, conservantes, corantes, diluentes, dimetilsulfóxido, edulcorantes, estabilizantes, flavorizantes, solventes, umectantes, mas não limitados a estes. Preferencialmente, os excipientes empregados são aqueles sabidamente adotados para a produção de medicamentos de uso externo e parenteral.

Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis podem ainda incluir lipossomas, sendo possível empregar os de forma esférica, unilamelar ou multilamelar, compostos por lecitina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol ou esfingomiélna; aplicados como lipossomas convencionais, lipossomas de longa duração, lipossomas sítio-específico ou lipossomas polimórficos.

As composições farmacêuticas, de acordo com a invenção, podem ainda compreender formulações que incluam de um a três outros agentes antiparasitários como ingrediente ativo ou associado, administrados de modo simultâneo, separado ou seqüencial. Desde que seguras e eficazes, as combinações podem incluir antimoniato de meglumina, estibogluconato de sódio, alopurinol, aminosidine, anfotericina B, benzinidazol, diminazeno, eflornitina, fungicidas azólicos

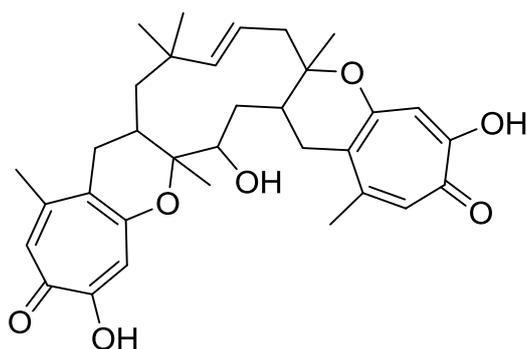
usados como inibidores da biossíntese de esterol, inibidores da adenosilmetionina descarboxilase, melarsoprol, miltefosina, nifurtimox, pafuramidine, paromomicina, pentamidina, plumbagina, sitemaquine, suramina ou uréia estibamina.

Métodos que envolvam combinações de terapias podem seguir protocolos simultâneos, intermitentes ou determinados empiricamente, desde que resulte em efeitos aditivos, logarítmicos ou sinérgicos. Os efeitos de um tratamento bem sucedido incluem a diminuição e regressão de lesões, diminuição e desaparecimento dos sintomas de infecção, morte ou inativação do parasita, redução da carga parasitária ou parasitemia, ou a eliminação completa do parasita. Preferencialmente, o paciente tem recuperação estimada de um a três meses, se possível com parasitemia indetectável ou pelo menos reduzida em 50% após o tratamento.

A parasitemia pode ser determinada a partir de amostras biológicas obtidas do paciente com suspeita de ainda estar infectado. Em culturas adequadas, os parasitos que ainda estejam vivos nas amostras podem se desenvolver e multiplicar. Desta forma, o número de parasitas visualizados é diretamente ou indiretamente contado por microscopia.

## REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO LEISHMANICIDA, caracterizado por compreender o seguinte princípio ativo:



e veículo farmacêuticamente aceitável para administração, caracterizada por compreender, quantidades de 0,1 mg/mL a 2000mg/mL, frações selecionadas a partir do extrato de fermentação de macromicetos e substratos, correspondentes a frações purificadas como fração Xinf, fração D ou fração E, concentradas com terpenos, humulenos, sesquiterpenos, meroterpenóides ou tropolonas dispersos em fase líquida.

2. COMPOSIÇÃO, CONFORME REINVIDICAÇÃO1 caracterizada por macromiceto ser selecionado, preferencialmente *Pereniporia martiussi*.
3. COMPOSIÇÃO, CONFORME REINVIDICAÇÃO1 caracterizada por substratos serem selecionados de glucose, extrato de levedura e extrato de malte cervejeiro lupulado

4. COMPOSIÇÃO, CONFORME REINVIDICAÇÃO1 caracterizada por veículo de administração ser selecionado de cloreto de sódio, DMSO, fosfatos, para administração parenteral.
5. PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COM AÇÃO LEISHMANICIDA caracterizado por compreender uma etapa de fermentação em biorreator, propiciando formação e recuperação de substâncias com atividade leishmanicida, ao conjugar as seguintes etapas sequenciais:
  - a. Processamento de uma “mistura padronizada” de fontes de carbono, de nitrogênio e minerais, dispersos em fase líquida, de forma homogênea ou heterogênea, adicionados de antiespumante, ou ainda, preparados em estado sólido, adicionados de suporte, suplementos e corretores de pH;
  - b. Submeter a “mistura padronizada”, processada em etapa A, à etapa de fermentação operacionalizada em biorreator, na presença de oxigênio, água e diferentes espécies de fungos, preferencialmente basidiomicetos, em que o processo não é associado com o crescimento do microrganismo;
  - c. Elaboração de preparado com atividade leishmanicida através de concentração, processamento físico-químico e recuperação de fração bioativa obtida em etapa A e B, de modo a incorporá-lo em composição farmacêutica.
6. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por realizar em etapa A, esterilização da mistura padronizada, por vapor, em temperatura superior a 121°C; realizar em etapa B, esterilização de biorreatores e equipamentos acessórios, por vapor, em temperatura superior a 121°C; e realizar em etapa C, esterilização

do preparado com atividade leishmanicida por filtração em membrana de porosidade menor que 0,22 µm.

7. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por mistura padronizada incluir fontes de carbono, de nitrogênio, minerais, suporte, suplementos e supressor de espuma, preferencialmente:
  - a. fonte de carbono, numa faixa de concentrações entre 5 a 90 gramas por litro de meio líquido (g/L), compreendendo glucose, sacarose, amido, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;
  - b. suporte, entre 1 a 98% em peso, compreendendo subprodutos e resíduos agroindustriais, farelos, cascas, bagaços, água de cozimento de cereais e tubérculos, palhas, cepilhos, serragens, melaço, borra de café, soro de leite, grãos de cereais, inteiros ou triturados, incluindo trigo, milho, soja, arroz, sorgo, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;
  - c. fonte de nitrogênio, entre 0,5 e 15 g/L, compreendendo extrato de levedura, extrato de malte e peptona, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;
  - d. minerais numa concentração de cada componente, entre 0,001 a 0,6 g/L, compreendendo sais inorgânicos de magnésio, potássio, cálcio, enxofre e fósforo, incluindo sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>), fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;

- e. supressor de espuma, entre 0,01 a 0,5%, compreendendo compostos a base de silicone inertes, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;
  - f. suplementos, entre 0,5 e 2% (m/m), compreendendo carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ou  $\text{CaSO}_4$ , Corretores de pH, hidróxido de sódio, ácido fosfórico e ácido sulfúrico, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes.
8. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por processamento de “mistura padronizada” ocorrer acondicionado em sistema resistente a processos de esterilização por temperatura ou irradiação, compreendendo utilização de recipientes, aparatos auxiliares, filtros, tubos e válvulas e biorreator, preferencialmente com uso de recipientes de vidro, recipientes plásticos, recipientes de metal, biorreatores de bancada, biorreatores piloto, biorreatores industriais, reatores de aço inox, vasos de pressão, tanques, piscinas, sacos plásticos, bandejas, bandejas metálicas, tambores metálicos, mas não se limitando a estes.
9. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por processamento da mistura padronizada ocorrer entre 70°C e 300°C, por um período compreendido entre 10 a 150 minutos, em equipamento pressurizado, preferencialmente por vapor úmido entre 90°C e 150°C ou através da elevação momentânea de temperatura entre 100 e 200°C, por 10 a 600 segundos.
10. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por processamento da mistura padronizada ocorrer acondicionado em recipientes que apresentem sistema de agitação e difusão de ar acoplado, capaz de realizar circulação forçada de ar ou

oxigênio através da mistura padronizada, no qual o sistema de difusão de ar é apto em borbulhar, umidificar, filtrar, aquecer e resfriar o ar que por ele passe, além de controlar a taxa de passagem, preferencialmente entre 0,1 a 10 litros de ar por litro de mistura padronizada a cada minuto (0,1 a 10 v.v.m).

11. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por fermentação de mistura padronizada ocorrer na presença de oxigênio, água e inóculo de micélio fúngico, ser conduzido em cultivo submerso, em biorreator cilíndrico com eixo de agitação do tipo hélice, e preferivelmente o micélio fúngico ser da espécie *Perenniporia martiusii*
12. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por fermentação de mistura padronizada ocorrer na presença de oxigênio, água e inóculo de micélio fúngico, empregar diferentes espécies de fungos, pelo menos uma das espécies de macromiceto; incluindo *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus djamor*, *Pleurotus sajour-caju*, *Pleurotus pulmonarius*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma stipitatum*, *Ganoderma coffeatum*, *Lepista sordida*, *Phaeosphaeria* spp., *Pycnoporus sanguineus*, *Coprinus comatus*, *Hericium herinaceum*, *Flammulina velutipes*, *Volvariella volvacea*, *Hypsizygus marmoreus*, *Tremella fusciformis* e as diversas espécies de cogumelos poliporáceos, incluindo as do gênero *Perenniporia*, como: *P. corticola*, *P. cystidiata*, *P. detrita*, *P. fraxinea*, *P. grammothele*, *P. japonica*, *P. latissima*, *P. maackiae*, *P. martius*, *P. medulla-panis*, *P. minor*, *P. narymica*, *P. ochroleuca*, *P. ohiensis*, *P. rhizomorpha*, *P. straminea*, *P. subacida*, *P. tephropora* e *P. truncatospora*

13.PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por adicionar ao biorreator, entre 0,1% a 40% (em relação mássica) micélio de macromiceto em forma de inóculo, produzido por procedimentos operacionais deliberadamente implementados, compreendendo:

- a. preparação asséptica de inóculo, constituído por micélio úmido, micélio drenado ou micélio seco, preferencialmente utilizando massas miceliais de culturas puras, previamente incubadas a temperatura de 22 a 35°C em meios de cultura líquidos ou sólidos;
- b. utilização de inóculo fúngico previamente preparado por fermentação submersa, em recipientes contendo volumes entre 0,05 e 2 litros de meio de cultivo, mantidos sob agitação entre 60 e 180 rpm em shaker tipo rotativo;
- c. homogeneização, fragmentação e maceração do micélio por meio de aplicação de forças mecânicas cisalhantes médias a altas, com a utilização de qualquer equipamento ou utensílio, como bastão, moinho, haste, peneira, espátula, mas não se limitando a estes; ou por meio do aumento de rotação do eixo de agitação do biorreator;
- d. utilização de técnicas assépticas de transferência durante a incorporação do inóculo macerado à mistura padronizada resultante de processamento;
- e. alimentação de entrada do cultivo por método semi-contínuo, em que de 5% a 50% do volume final da fermentação é mantido como inóculo inicial do cultivo seguinte.

14. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por processamento da mistura padronizada ser segmentado em três etapas consecutivas, em períodos de pelo menos 24 horas, referente a etapa de fermentação operacionalizada em biorreator, compreendendo volume de mistura padronizada cada vez maior, preferencialmente em progressão logarítmica e com uso de recipientes de volume condizentes, inicialmente primeira etapa envolvendo volumes entre um e dez litros.
15. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por operacionalizar fermentação em biorreator, independente da capacidade de volume do biorreator, compreendendo controle de tempo, temperatura, pH (potencial de hidrogênio), oxigênio dissolvido, agitação, aeração e pressurização, preferencialmente por um sistema de controle automatizado e interligado a instrumentos de medição e atuação, regulando:
- a) tempo de cultivo entre 2 a 240h;
  - b) temperatura de cultivo entre 4°C a 50°C;
  - c) agitação contínua ou intermitente, de preferência por eixo de agitação com rotação ajustada entre 50 e 500rpm;
  - d) pH entre 3,5 a 8,5;
  - e) fluxo de aeração do meio de cultura com ar, incluindo ar comprimido em composição natural ou ar enriquecido, com pelo menos 25% em volume de oxigênio;
  - f) oxigênio dissolvido, mantendo o sistema com pelo menos 1% de oxigênio dissolvido disponível;

g) pressão positiva dos biorreatores, com manutenção de pressão absoluta entre 0,101 e 0,5 MPa.

16. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por modificar propositadamente as condições de processamento físico-químico para elaboração de preparado com atividade leishmanicida, durante ou após a fermentação, compreendendo quaisquer combinações das seguintes etapas:

a) indução de mudança de cor do micélio de macromicetos em cultivo, por meio de mudança forçada de pH, preferencialmente entre 3 e 9; ou por exposição da mistura padronizada, na presença de inóculo, à iluminação de luz visível ou iluminação ultravioleta; ou realizando mudança forçada de temperatura, preferencialmente de 28°C para menos 18°C, por um período de uma a 48 horas;

b) repetição de etapas em intervalos regulares;

c) emprego de micélio de fungo produzido em biorreator por processo de fermentação anterior; ou material processado originado da produção em biorreator, incluindo caldo de fermentação ou biomassa;

d) indução de formação de compostos de degradação obtidos a partir de um processo que determine morte celular do micélio durante o processo, de preferência por trituração.

17. PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por elaboração de preparado com atividade leishmanicida adicionalmente compreender quaisquer combinações das seguintes etapas:

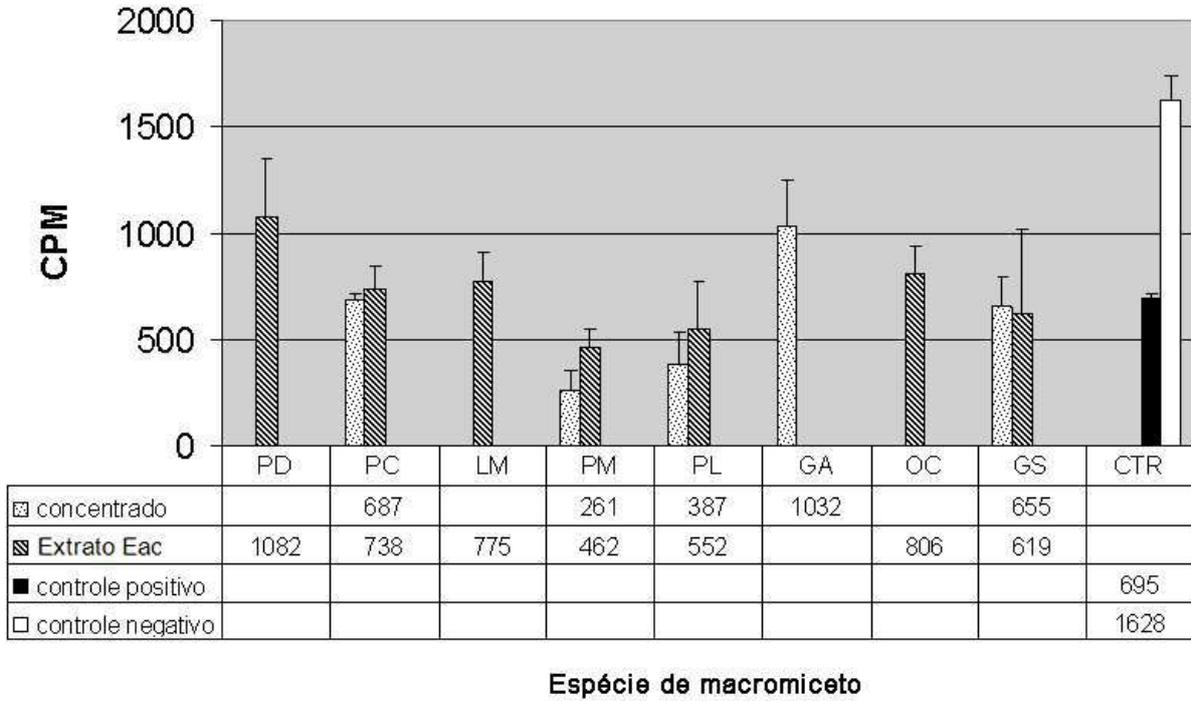
- a) remoção e fragmentação de agregados de micélio de fungo acumulado em partes estagnadas do biorreator, com diminuição de viscosidade global;
- b) fase de separação entre biomassa e caldo de fermentação residual oriundo de mistura padronizada, preferencialmente gravitação forçada, filtração realizada através de uma tela de tecido, filtração convencional ou centrifugação, em quaisquer combinações ou análogos dos mesmos, mas não se restringindo a estes;
- c) secagem de biomassa e do caldo de fermentação residual oriundo de mistura padronizada, preferencialmente pela incubação destes produtos em temperaturas entre -40°C e 18°C, encadeando subsequente exposição a ar desumidificado por pelo menos 24 horas, em baixa pressão e alta circulação de ar; ou secagem por ventilação; ou secagem em estufa; ou secagem por compactação do material úmido; ou secagem por congelamento e liofilização; ou secagem por trituração do material seco até particulado fino;
- d) compactação mecânica do material seco.

18.PROCESSOS, conforme reivindicação 05, caracterizado por elaboração de preparado com atividade leishmanicida adicionalmente compreender quaisquer combinações das seguintes etapas:

- a. processamento com solvente orgânico, formando suspensão heterogênea e mantendo material sob agitação constante, ao abrigo da luz, por período entre 2h a 48h, adicionando uma combinação de solventes, preferencialmente diclorometano, álcool, tetracloreto de carbono, clorofórmio, acetona, água e quaisquer combinações destes;
- b. filtração do material em suspensão por fibras de celulose, preferencialmente com tamanho de poro 11 µm;
- c. concentração do ativo a partir do filtrado, por evaporação a vácuo e evaporação de solvente orgânico com aumento de temperatura até 65°C;
- d. separação do extrato apolar, preferencialmente através de mistura de água, clorofórmio e o produto resultante da concentração do ativo processado com diclorometano, agitação e separação por decantação, resultando em uma fase enriquecida com os compostos mais apolares na fase orgânica;
- e. separação e fracionamento por cromatografia de adsorção com fase móvel de polaridade crescente, incluindo éter de petróleo, acetato de etila, etanol, clorofórmio, metanol, água, ou quaisquer combinações destes;
- f. preparação da composição farmacêutica com solubilização do preparado oriundo do processamento por solventes orgânicos em solução fisiológica ou tamponada.

**Figuras**

**FIGURA 1**



**FIGURA 2**

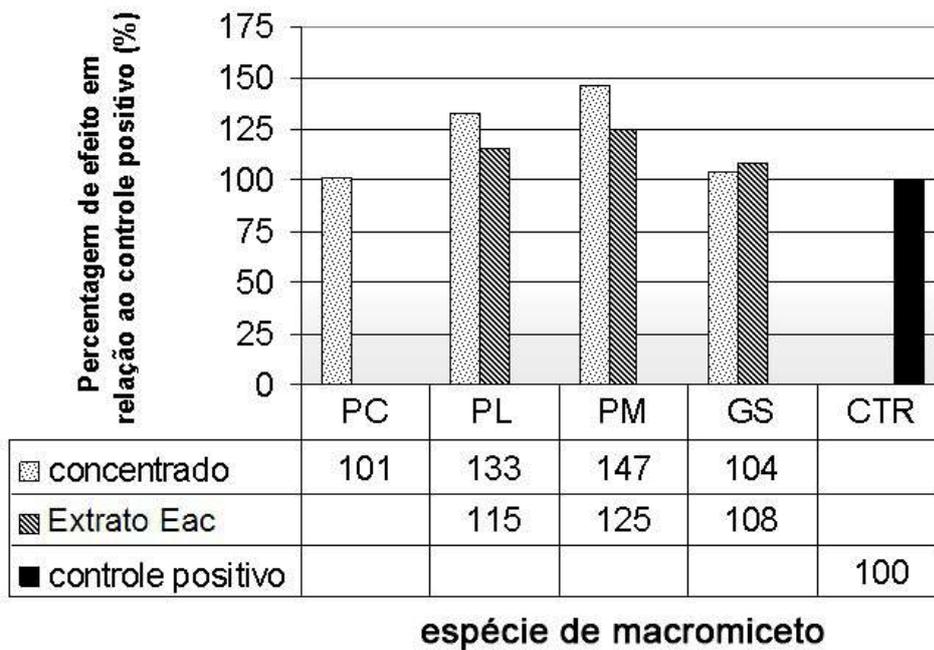


FIGURA 3A

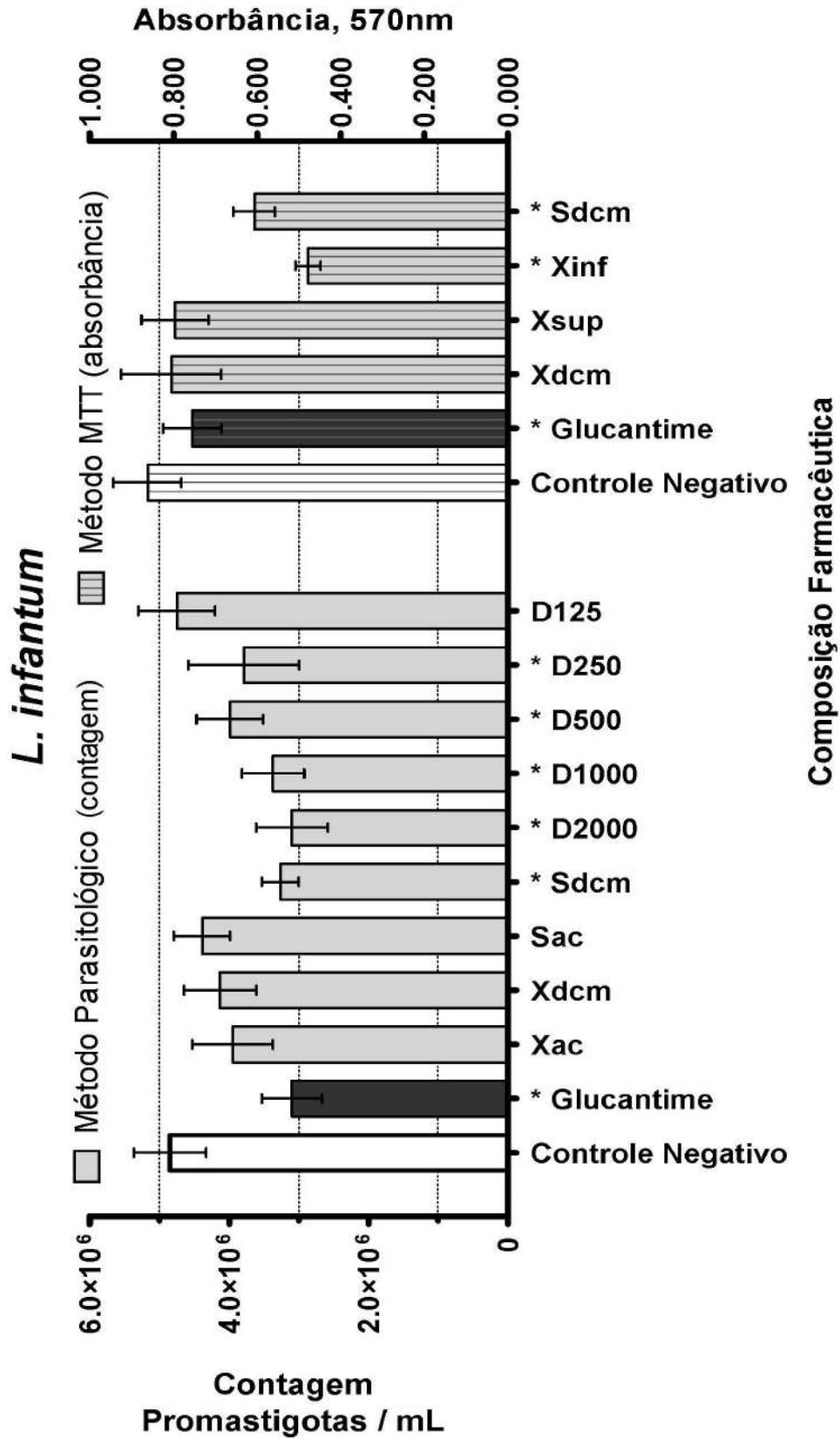


FIGURA 3B

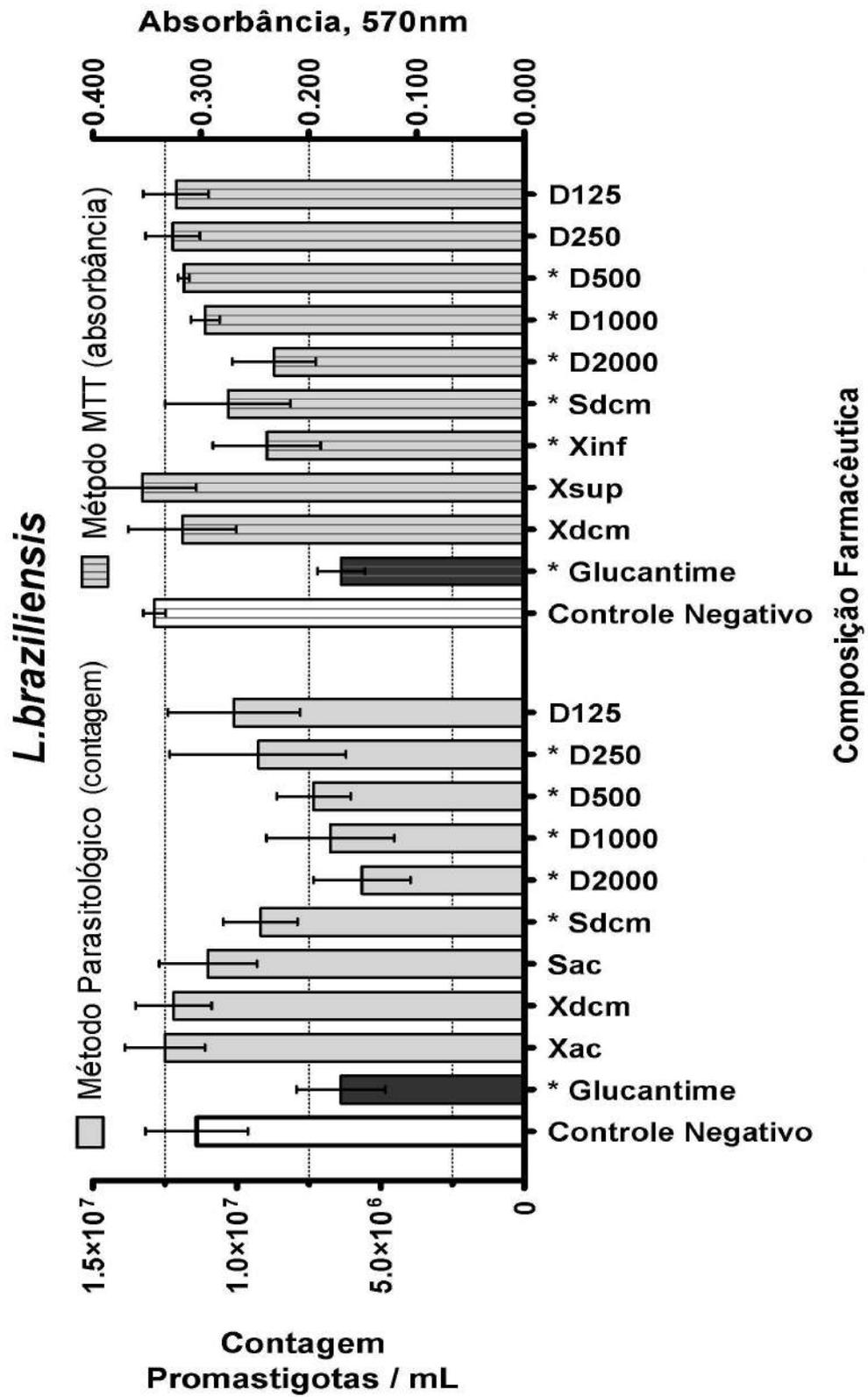
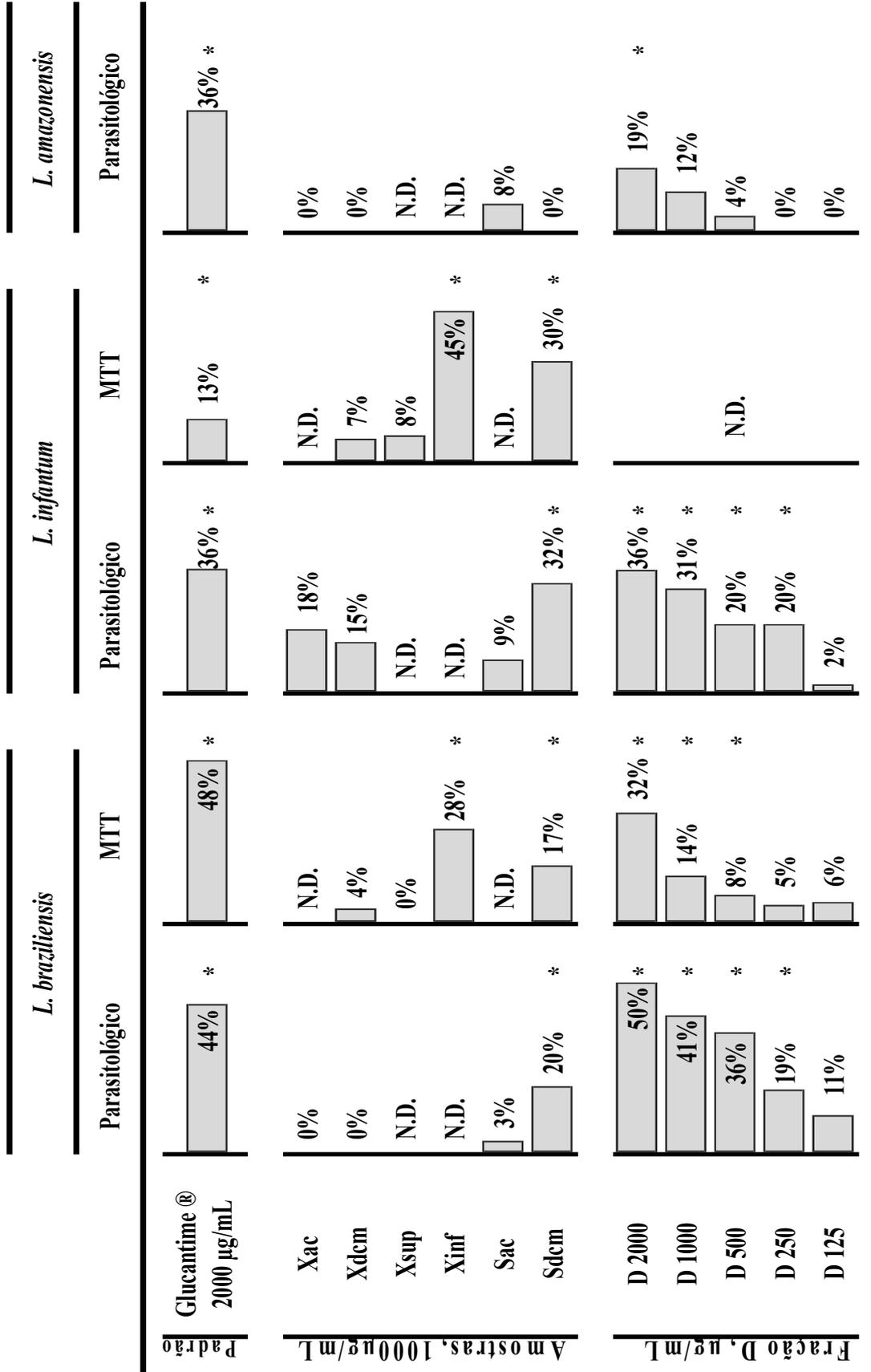
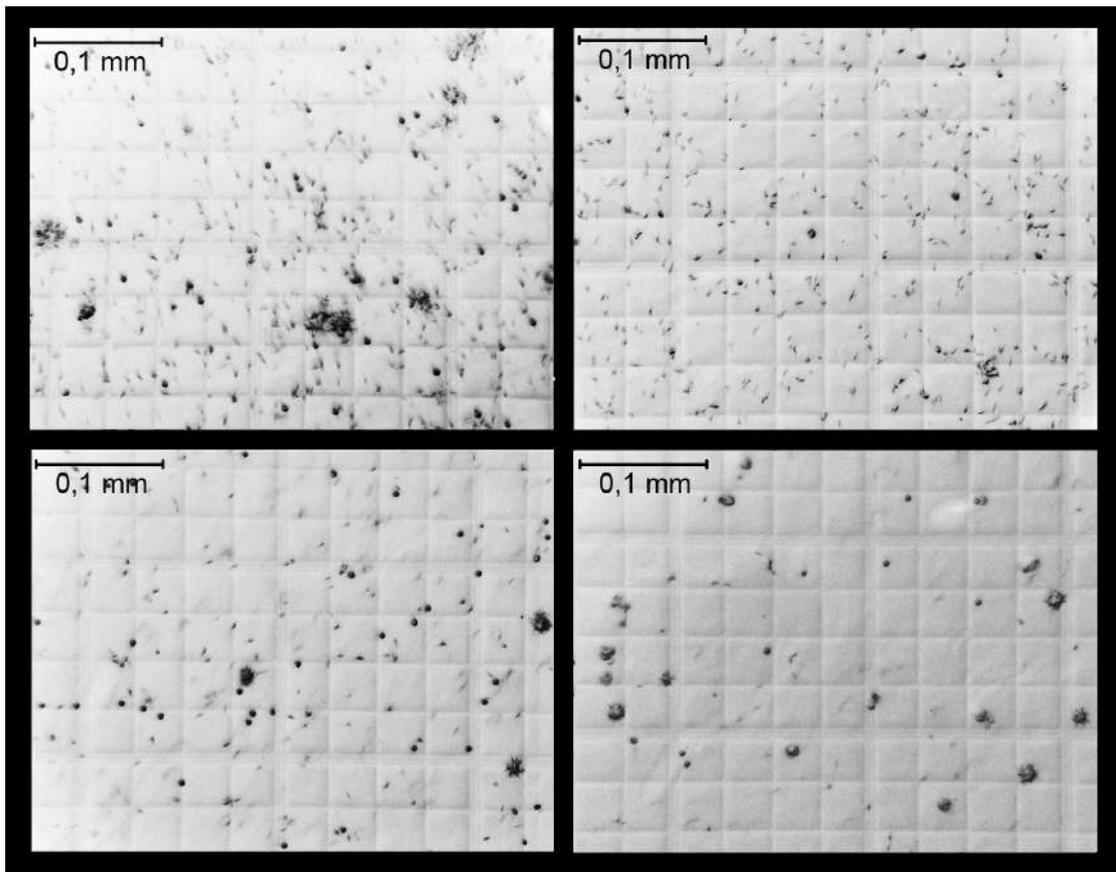


FIGURA 4



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

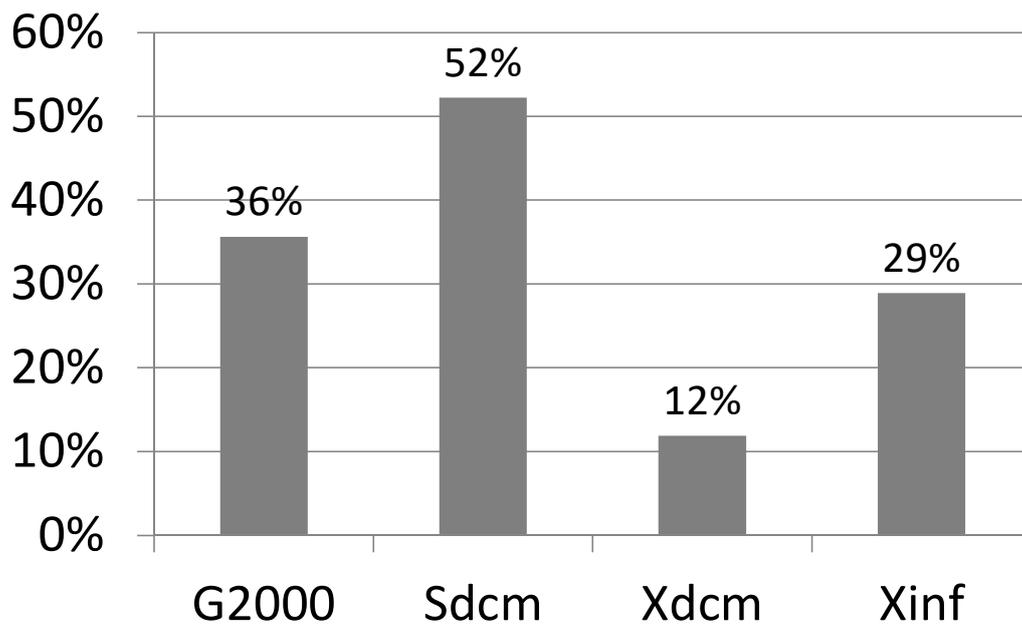


FIGURA 7

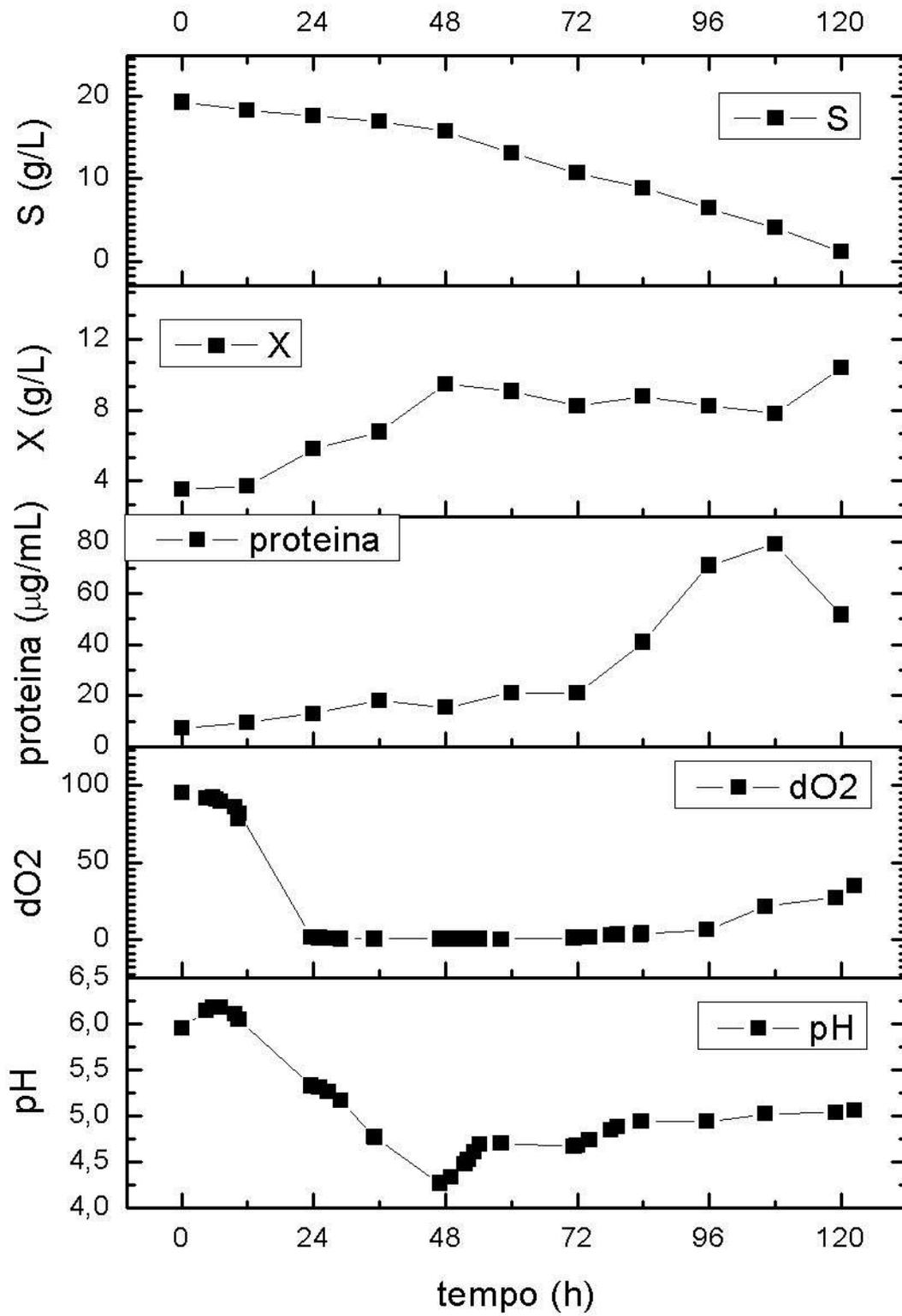


FIGURA 8

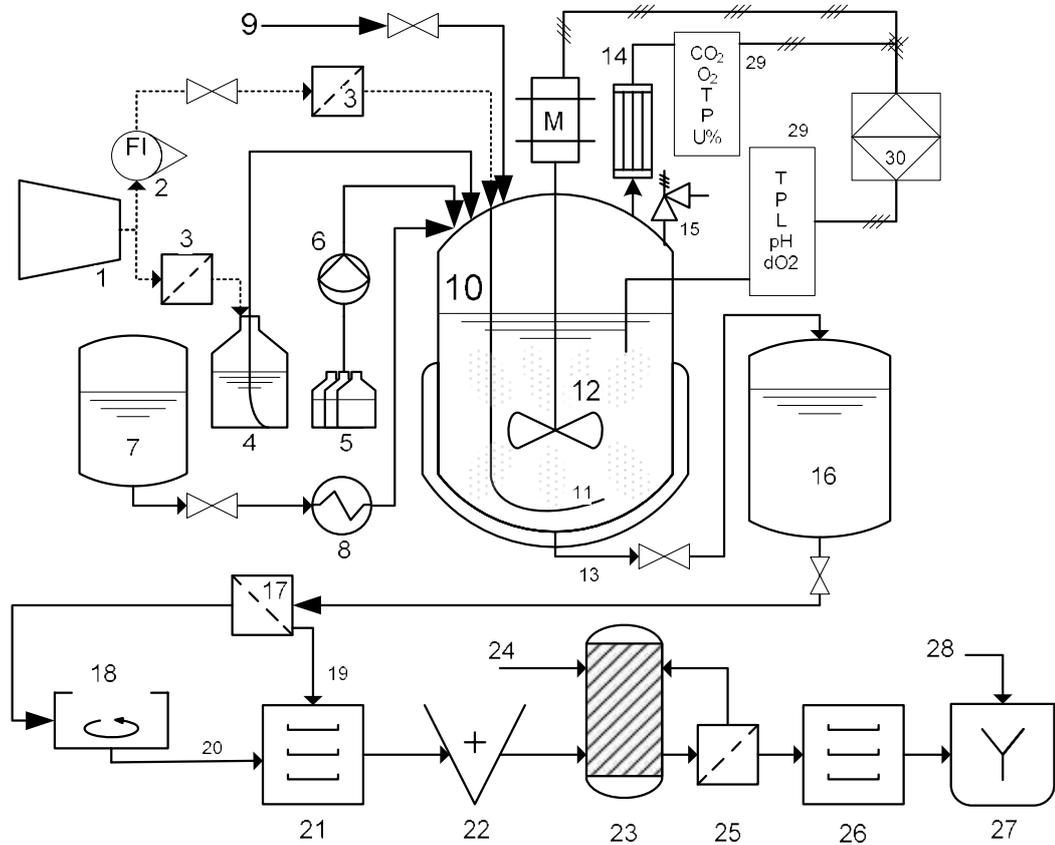


FIGURA 9

