República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102019018037-4 A2

(22) Data do Depósito: 29/08/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 09/03/2021

(54) Título: PROCESSO PARA ROMPIMENTO DE ESPOROS DE GANODERMA LUCIDUM E OBTENÇÃO DE PRODUTOS PARA CONSERVAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS E ESPERMATOZOIDES

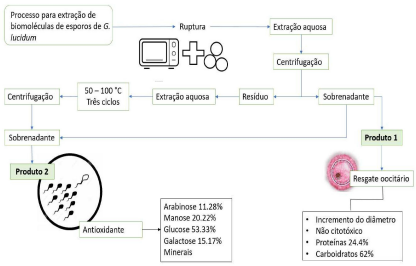
(51) Int. Cl.: A01N 1/02.

(52) CPC: A01N 1/0205.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA.

(72) Inventor(es): CARLOS RICARDO SOCCOL; DIANA CAROLINA SAAVEDRA PLAZAS; MIGUEL DANIEL NOSEDA; VANETE THOMAZ SOCCOL; SUSAN GRACE KARP.

(57) Resumo: PROCESSO PARA ROMPIMENTO DE ESPOROS DE Ganoderma lucidum E OBTENÇÃO DE PRODUTOS PARA CONSERVAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS E ESPERMATOZOIDES. Esta invenção descreve um processo de ruptura de esporos de Ganoderma lucidum e a obtenção de dois produtos para conservação in vitro de oócitos (produto 1) e espermatozoides (produto 2). Os produtos 1 e 2 possuem aplicação em cultivo in vitro de células reprodutivas, na conservação por criopreservação e vitrificação e no descongelamento como diluentes protegendo vários parâmetros reprodutivos como viabilidade celular, morfologia e maturação. O processo para obtenção dos bioativos compreende as etapas de rompimento dos esporos por cisalhamento e micro-ondas, extração em solução aquosa, centrifugação e conservação por liofilização. O produto 1 estimula o resgate de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano e o produto 2 incrementa a viabilidade e preserva o DNA em espermatozoides. Os produtos reivindicados na presente invenção não apresentam citotoxicidade e foram avaliados em ensaios de cultivo in vitro. As aplicações estão relacionadas com o melhoramento e a conservação das células reprodutivas em cultivos in vitro.



PROCESSO PARA ROMPIMENTO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* E OBTENÇÃO DE PRODUTOS PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS E ESPERMATOZOIDES

Campo da Invenção

[001] A presente invenção trata do desenvolvimento de um processo para ruptura de esporos de *Ganoderma lucidum* usando esferas de aço/crômio e micro-ondas e, a extração de biomoléculas. Na primeira etapa obtém-se o produto 1 para ser usado no resgate de folículos pré-antrais de tecido ovariano. Na segunda etapa do processo obtém-se o produto 2 com ação antioxidante *in vitro* de espermatozoides. Os dois produtos têm aplicabilidade na área de resgate e conservação de células reprodutivas de animais e humanos com melhoramento nos diferentes parâmetros das células reprodutivas, permitindo resgatar maior número de folículos pré-antrais e preservar a qualidade do sêmen.

Histórico da Invenção

[002] As taxas de fecundidade humana no Brasil diminuíram entre 2000 e 2015, de 2,4 para 1,8 filhos por mulher, segundo dados coletados no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2013. Esse fenômeno também se reflete nas estatísticas globais, onde as taxas de fecundidade global estão declinando, com destaque para os países da Europa Ocidental, onde a população pode diminuir drasticamente nos próximos 50 anos (CIA, 2018).

[003] Entre as causas do declínio da fecundidade estão o aumento da idade para ter filhos e a maior disponibilidade de contraceptivos (CIA, 2018). A diminuição da fecundidade vem acompanhada da infertilidade, que nos últimos anos, atingiu cerca de 30% dos casais. Cada mulher nasce com 2 milhões de folículos primordiais (células reprodutivas), cerca de 99,9% dessas células serão eliminadas por

mecanismos de apoptose ativados por processos fisiológicos durante a foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2009). No entanto, diferentes doenças autoimunes e inflamatórias aceleram a perda da reserva folicular no ovário com a consequente perda de fertilidade (FRANKS et al., 2015; ORSI et al., 2017). Nos homens, as mesmas doenças que afetam as mulheres produzem no sêmen uma má qualidade dos parâmetros seminais (motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização), afetando a capacidade de fertilização e produzindo embriões sem a capacidade de completar o seu desenvolvimento (GUERRIERO et al., 2014; HOMA et al., 2015).

[004] Vários laboratórios ao redor do mundo investigam o desenvolvimento de novas metodologias *in vitro* que possam resgatar um maior número de folículos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2009) e que possam preservar a qualidade do sêmen (VICTOR et al., 2000). Da mesma forma, o uso de antioxidantes para tratar doenças e a manutenção do sistema antioxidante em culturas celulares *in vitro* são investigados. Por exemplo, o ácido ascórbico (vitamina C) é o antioxidante mais utilizado para proteger as células reprodutivas contrachoque endotóxico (VICTOR et al., 2000), dislipidemias e drogas que afetam a qualidade seminal (LEITE et al., 2017). Em machos bovinos (touros), estas drogas, melhoram a concentração e motilidade dos espermatozoides (LUCK et al., 1995). Da mesma forma, os parâmetros seminais ideais do ácido ascórbico após ciclos de congelamento/descongelamento (WAGNER et al., 2017).

[005] Nas mulheres, o ácido ascórbico é utilizado na cultura *in vitro* de folículos pré-antrais com o objetivo de resgatar um maior número de células que podem ser fertilizadas *in vitro* (GIOMETTI, 2003; FIGUEIREDO et al., 2009). Um dos pontos-chave para melhorar o desempenho reprodutivo é a diminuição da produção de radicais livres (AGARWAL et al., 2005; GUERRIERO et al., 2014). Na natureza, os cogumelos

apresentam homopolissacarídeos, hetero-polissacarídeos, proteínas, aminoácidos, glicoproteínas, lípidos e fenóis antioxidantes (BOWMAN; FREE, 2006; SYNYTSYA; NOVAK, 2014). *Ganoderma lucidum* é um cogumelo da família *Ganodermataceae*, amplamente utilizado no tratamento de diferentes doenças (CHENG et al., 2010). Na cultura oriental, os extratos de *G. lucidum* são consumidos em infusões para aumentar a longevidade, prevenir hepatite, bronquite crónica, gastrite e doenças imunitárias (RÍOS-CAÑAVATE LUIS, 2008).

[006] Estudos têm demonstrado a ação dos metabólitos de *G. lucidum* sobre a modulação da resposta imune e seu potencial para inibir as células neoplásicas (PATERSON, 2006). A ação antioxidante do *G. lucidum* pode proteger as células reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo (AGARWAL; ALLAMANENI, 2004). A Ceramida é um mediador lipídico intracelular que responde a vários estímulos, incluindo o estresse. O oxidante H_2O_2 induz um rápido aumento nos níveis de ceramidas devido à hidrólise da esfingomielina (SM). KAO et al., 2012, mostraram que a atividade de β-1,3-glucan pode interferir contra radicais livres. Assim, os autores identificaram β-1,3-glucano de *G. lucidum* como fonte potencial de antioxidantes. Os triterpenos e polissacarídeos de *G. lucidum* também têm atividades benéficas à saúde, pois induzem apoptose em diferentes linhagens celulares de leucemia, linfoma, mieloma e células HL-60 de leucemia mieloblástica aguda (EL-MEKKAWY et al., 1998; ZHU et al., 2012). A atividade antioxidante do *G. lucidum* foi extensivamente documentada por seu alto teor de polissacarídeos e ácidos ganodérmicos, ainda mais presente nos corpos de frutificação do cogumelo (HUIE; DI, 2004; HELENO; BARROS; MARTINS; JOÃO; et al., 2012). No entanto, poucos estudos foram feitos para uso de extrato ou substâncias extraídas de esporos do fungo para uso em recuperação e manutenção de células reprodutivas humanas e animais.

[007] Um dos grandes problemas encontrado foi a dificuldade de romper os esporos. A estrutura dos esporos de *G. lucidum* é diferenciada por poros em sua superfície que podem se fundir com seus vizinhos e tomar contorno circular a ovóide. Os esporos conhecidos como basidiósporos têm uma camada hialina chamada *myxosporium* e uma camada marrom que tem espinhos que se projetam chamados de *exosporium*. Os compostos das paredes dos cogumelos são principalmente quitina, glucanos, mananas e glicoproteínas. A estrutura da parede contém muitos complexos de glucan-quitina e tem sido descrita na literatura vários polissacarídeos e glicoproteínas (BOWMAN; FREE, 2006). A quitina que compõe a parede tem resíduos de N-acetilglicosamina ligados a β-1,4 e, apesar de sua pequena quantidade, é importante para a integridade da parede, pois forma ligações de hidrogênio inter-cadeias que formam microfibras. O glucano contido nas paredes do cogumelo é o polissacarídeo constituinte principal, porque representa 50 a 60% do total.

[008] As proteínas podem constituir 30 a 50% da parede do cogumelo; no caso dos cogumelos filamentosos representam 20 a 30% (BOWMAN; FREE, 2006). Portanto, nos esporos pode ter substâncias de interesse para a conservação de células germinativas e resolver um problema que representa hoje para a reprodução humana, ou de animais de alto valor zootécnico, além de animais em via de extinção.

Estado da Arte

[009] Para contextualizar o estado da arte desta invenção inicialmente a literatura foi consultada na base de dados Pubmed e foram encontrados 185 artigos para os termos: *antioxidant* AND in vitro AND spermatozoa*. Dentre esses artigos, apenas 45 artigos estavam relacionados a estudos de diferentes substâncias para manter parâmetros reprodutivos em espermatozoides, como motilidade,

viabilidade, integridade do DNA e capacidade de fertilização. Para a manutenção da integridade de oócitos ou folículos pré-antrais incluídos no tecido ovariano foram encontrados 30 artigos utilizando os termos: *antioxidant* AND cortical ovarian tissue*, dentre os quais 4 abordavam o uso de compostos. Pesquisando outro grupo de palavras: *antioxidant* AND ovarian tissue culture,* encontramos 25 artigos, 5 deles faziam menção ao assunto de interesse. Para os termos: *(oocyte retrieval OR follicle preantral OR primordial) AND (tissue preservation OR ovarian tissue) AND antioxidant*, f*oram encontrados 31 artigos e 16 deles abordavam utilização de substâncias (7 repetidos). Para os termos: *(oocyte retrieval OR follicle preantral OR primordial OR ovarian tissue) AND (tissue preservation OR ovarian tissue) AND antioxidant**, foi gerado um resultado com 257 itens, dos quais 44 foram positivos para o nosso assunto de interesse (8 deles repetidos).

[010] Existem diversas substâncias com ação no melhoramento de parâmetros reprodutivos, função e desenvolvimento das células reprodutivas, neste caso direcionado apenas a espermatozoides e oócitos. Para maior compreensão, os compostos, naturais e sintéticos, encontrados na literatura foram classificados em 10 grupos: Grupo 1 (flavonóides, fenóis e triterpenos); Grupo 2 (estruturas químicas comerciais); Grupo 3 (plantas e derivados); Grupo 4 (microalgas); Grupo 5 (hormônios); Grupo 6 (antioxidantes comerciais); Grupo 7 (vitaminas). Grupo 8 (açúcares e polissacarídeos); Grupo 9 (derivados de frutos) e Grupo 10 (outras substâncias). Ainda, poucos dados foram encontrados usando biocompostos ativos a partir de esporos de *G. lucidum*. Segundo descrito na literatura, o processo de extração de biocompostos dos esporos de *G. lucidum* por micro-ondas, as ondas eletromagnéticas geram a quebra da parede do esporo e os componentes são liberados diretamente sobre os solventes que hidratam e ajudam a conduzir a energia de micro-ondas. As condições de extração ocorrem em uma

potência de 600 W e 110°C por 20 min (SUN et al., 2014). Além disso, o uso de micro-ondas e vibração de vácuo liberam açúcares da glucose, frutose, galactose e manose dos esporos. A estrutura base desses polissacarídeos são uniões glicosídicas β-(1→3) e β-(1→4) acompanhadas por ramos glicosídicos β-(1→6) (ZHAO et al., 2019).

[011] **Nossa invenção** utiliza micro-ondas (900 a 1200 watts por 9 a 12 min) e a maceração com o auxílio de esferas para desestruturar completamente a parede dos esporos de *G. lucidum*. Também, ocorre a exposição dos esporos a três ciclos, em solução aquosa, a uma temperatura entre 50 a 100 °C, o que permite a liberação de hidratos de carbono de baixo peso molecular e a produção de dois produtos. O produto 1 ajuda a manter a viabilidade na cultura *in vitro* de folículos pré-antrais incluídos no tecido ovariano e o produto 2 possui ação antioxidante nos espermatozóides *in vitro*. Grande parte das substâncias consultadas na literatura são produtos comerciais e provenientes de extratos vegetais crus. Não são descritas novas estruturas e muitas destas substâncias são indicadas para tratamentos por via oral, com o objetivo de manter os parâmetros reprodutivos. Além disso, muitas das avaliações estão relacionadas a estudos *in vivo*. **Nossa invenção** apresenta dois produtos que não requerem o uso de animais de laboratório para testar as biomoléculas extraídas e a aplicabilidade é voltada para o uso exclusivo de meios de cultura *in vitro*. Outra vantagem é a aplicação de moléculas encontradas em cogumelos (*G. lucidum*) para manter os parâmetros reprodutivos celulares. Antes do desenvolvimento do processo ora reivindicado foi realizada uma consulta para artigos relacionados ao processo de extração de sacarídeos do esporo de *G. lucidum* com os seguintes termos: *(reishi OR ganoderma lucidum) AND spore* AND mill**. Obteve-se 44 resultados, dos quais dois estavam relacionados ao processo de extração.

[012] Outra busca foi efetuada utilizando os termos: *(reishi OR ganoderma lucidum) AND spore* AND (microwave OR micro wave OR eletromagnetic wave)*. A última busca originou 33 resultados, dos quais 3 artigos tinham relação com o processo de extração dos produtos desta invenção. **Entretanto**, nenhum dos artigos apresentou **similaridade total com o nosso processo** e a aplicação dos extratos apresentados nesses artigos não estão relacionadas à atividade em células ovarianas ou esperma. Para a extração de sacarídeos existem diferentes protocolos, por exemplo, a extração de polissacarídeos com a ajuda de Na_2CO_3 e um processo de moagem assistida por esferas, seguido por extração em solução aquosa, a 70º C, durante 130 min (WU et al., 2017).

[013] **A presente invenção usa água** que é o melhor solvente de polissacarídeo. Também a extração aquosa de monossacáridos dos esporos de *G. lucidum* com um ciclo de 100 °C durante 2 h para extrair polissacáridos intracelulares, seguido pela extração do resíduo resultante do processo anterior com dois ciclos de água a 100 °C durante 2 h, após este ter sido lavado com etanol e passado por secagem. A partir daí, foram extraídos polissacarídeos da parede dos esporos, do tipo β glucan com massa molecular $1.57x10^5$ g/mol e uma estrutura básica de (1→3),(1→4),(1→6) glucanas, com ramificações de dissacarídeos do tipo β-D-Glc*p* e B-D-Glc*p*-(1-4)-β-D-Glc*p*-1- (WANG et al., 2017). As paredes dos esporos podem conter glucanas do tipo a-1,3. Estas estimulam a proliferação de linfócitos e anticorpos, aumentando a ação do sistema imunitário.

[014] Os glucanos são compostos de monossacarídeos do tipo glicose: a-1,3; a-1,4 y a 1-1,6. Este tipo de moléculas integra as células de mamíferos, plantas e microorganismos, e são essenciais para a formação da parede celular e interação com o meio extracelular (MORENO-MENDIETA et al., 2017). A **nossa invenção** combina a exposição a micro-ondas e a maceração com auxílio de esferas.

Também inclui três ciclos de água quente, com temperatura variando entre 50 e 100 °C, permitindo, assim, a extração de monossacáridos de baixo peso molecular com aplicação em células reprodutivas. **Nossa invenção** mantém a viabilidade das células reprodutivas, não apresenta citotoxicidade e sua aplicação é exclusiva para adição *in vitro* em meios de cultivo celular. O produto 2 incrementa a viabilidade e ajuda manter DNA em espermatozoides. **Nossa invenção** foi avaliada em ensaios de cultivo *in vitro*. As aplicações estão relacionadas com o melhoramento e a conservação das células reprodutivas em cultivos *in vitro*.

[015] A consulta das patentes foi realizada na base de dados da CAPES, pelo Derwent Innovations Index - DII. Seis tipos de buscas foram feitos com diferentes combinações de palavras. A consulta foi relacionada ao processo de quebra e extração de moléculas de esporos de *G. lucidum*. O primeiro grupo de palavras foi composto por: *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND (microwave OR micro wave OR micro wave OR micro-wave))* e obteve-se 56 patentes, das quais 28 patentes foram relacionadas. As metodologias incluíam secagem de esporos por micro-ondas, seguida da quebra de esporos por outros diferentes métodos, como dispositivos complexos de quebra de esporos que inclui ondas eletromagnéticas.

[016] Também estavam incluídas patentes que utilizam micro-ondas para esterilizar esporos antes da fermentação e patentes que utilizam ciclos de frio e aquecimento por micro-ondas para quebrar esporos. Outro tipo de busca foi relacionado à maceração dos esporos com a ajuda de esferas. A ordem das palavras foi a seguinte: *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND (espher* OR ball*)*.O número total de patentes encontradas foi de 67. Apenas 6 patentes foram listadas e uma delas já estava incluída no grupo anterior. As patentes explicam a moagem com esferas para quebrar esporos. Os materiais encontrados

foram aço inoxidável e argônio, com diâmetros entre 2 a 5 mm e 0,1 mm, respectivamente. No terceiro grupo, as palavras *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND mill*)* geraram um resultado com 125 patentes, das quais 20 patentes estavam relacionadas e 1 patente repetida.

[017] As informações mencionam o processo de moagem em condições de baixa temperatura, alta pressão de ar e uso de diferentes solventes. Os tipos de moinhos de nano-impacto descritos, dispositivos com cilindros cerâmicos ou de argônio, combinação de moagem com enzimas, moinhos coloidais e auxílio de hidrólise enzimática para quebrar e extrair compostos. O quarto conjunto de palavras foi: *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND (ruptur* OR lysis OR lysis OR break* OR brok*))* -. Foram encontradas 630 patentes e 37 patentes relacionadas, com 10 patentes repetidas. Elas abordavam a quebra com esferas e dispositivos complexos, dispositivos com cilindros, sob condições de refrigeração e enzimólise. O quinto grupo de palavras foi *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND (microwave OR micro wave OR micro-wave OR electromagnetic wave)*, 57 patentes foram encontradas, apenas 1 patente foi de interesse e descreve um dispositivo automatizado que inclui impulsos elétricos, um transmissor de ondas eletromagnéticas e controle remoto de temperatura para quebrar esporos. O sexto grupo foi *TS=((ganoderma OR reishi) AND spore* AND (microwave OR OR micro wave OR micro wave OR micro wave OR electromagnetic wave OR wave))* por todos os anos com 73 patentes, todas incluídas nas pesquisas anteriores.

[018] Durante a consulta, verificou-se que os diferentes pedidos de patente estavam relacionados com preparações orais para o câncer, o reforço do sistema imunitário, a melhoria da função hepática, a proteção do coração e com suplementos nutricionais. **Nossa patente** aborda a aplicação *in vitro* pela adição direta aos meios de cultura dos

dois produtos para melhorar os parâmetros reprodutivos dos espermatozóides e oócitos incluídos no tecido ovariano. A seguir as patentes relacionadas com uso de micro-ondas: CN108935806-A, CN109222060-A, CN108853151-A, CN108272076-A, CN108272077-A, CN108201098-A, CN102145022-A (CN102145022-B), CN101810352-A, CN109105884-A.

[019] No geral, as patentes incluem micro-ondas para secagem de esporas de *G. lucidum* após a ruptura. Para estes processos a radiação de micro-ondas é combinada com a adição de solventes orgânicos. A ruptura dos esporos de *G. lucidum* nestas patentes é explicada pela exposição dos esporos a vapores com diferentes temperaturas, congelamento alternado de calor, ruptura com uso de ultra-nano-moinho e uso de dióxido de carbono supercrítico. A patente CN109105884-A prepara um extrato de *G. lucidum* misturando esporos e cogumelo triturado de *G. lucidum* com água e extração por micro-ondas durante 30 a 60 min, seguida da exposição do extrato a 70°C. Os produtos dos extratos descritos nas patentes após o rompimento dos esporos são destinados a apresentações orais, as quais se encontram na forma de chá ou suplemento de oligoelementos para estimular a imunidade.

[020] **Nossa invenção** usa os dois produtos obtidos em meios de cultura de células reprodutivas. A patente CN107320503-A obtém 99% de quebra de esporos. A metodologia descreve a mistura de esporos de *G. lucidum* com solvente orgânico. Em seguida, os esporos são secos e expostos a micro-ondas durante 10 a 20 min. Este processo é repetido várias vezes até os esporos romperem. As patentes CN104273518-A e CN208008821-U fazem ruptura dos esporos usando um dispositivo que combina radiação de micro-ondas com um fluxo de nitrogênio (-9 a -16°C) e maceração por rolos de cerâmica, porém não explicam quais foram os biocompostos extraídos após rompimento. As patentes

CN101091727-A e CN101091727-B realizam a ruptura de esporos de *G. lucidum* por microtrituração, uso de ultrassom e fluxo de ar sob pressão.

[021] Após a quebra dos esporos, um dispositivo de micro-ondas com sistema de refrigeração é usado para extrair biomoléculas. As patentes CN104042642-A e CN104042642-B combinam baixa temperatura, micro-ondas, ultravioleta, fluxo de pressão de ar e o uso de um álcali para quebrar os esporos de *G. lucidum*. As patentes CN1569212-A e CN1250233-C realizam hidrólise enzimática com ácido orgânico e assistência de micro-ondas para desfazer e quebrar a quitina da parede dos esporos. **Todas as patentes mencionadas destinam o pó de esporos de *G. lucidum* para suplementação via oral com o objetivo de estimular o sistema imune.** Nossa invenção realiza o rompimento dos esporos de *G. lucidum* por maceração, com auxílio de esferas de aço/crômio, e micro-ondas. A extração de biocompostos é realizada em solução aquosa, com pH entre 5.5 e 7.5 em diferentes temperaturas para extração de sacarídeos da parede dos esporos.

[22] As patentes CN1513881-A e CN1266164-C utilizam o micro-ondas como pré-tratamento, antes da ruptura de esporos. Depois, moléculas são extraídas dos esporos utilizando água como solvente e diálise. **Nossa invenção** estuda e aplica os sacarídeos extraídos no eluído após dialise de um extrato aquoso de esporos de *G. lucidum*. Além disso, apresenta um produto que estimula o aumento do diâmetro dos folículos pré-antrais, e outro com ação antioxidante em cultivo *in vitro* de espermatozóides. Este último faz parte do eluído de um extrato aquoso de esporos de *G. lucidum*. A patente CN106867657-A não descreve a ruptura dos esporos de *G. lucidum*, mas explica que para extrair compostos é utilizado um dispositivo de dióxido de carbono supercrítico equipado com micro-ondas. As patentes CN106344627-A, CN104083894-A e CN104083894-B não abordam o rompimento dos esporos. Estas

utilizam um tratamento que combina soxhlet e dióxido de carbono supercrítico assistido por micro-ondas.

[023] Em geral, estes processos são dedicados à extração de ácidos graxos ou lipídios dos esporos de *G. lucidum*. **Nossa invenção extrai principalmente os sacarídeos e não requer equipamento de laboratório complexo**. As patentes CN108815230-A, CN108743669-A e CN108704032-A quebram os esporos *G. lucidum* misturando um pré-tratamento por micro-ondas a vácuo, seguido de congelamento dos esporos em nitrogênio líquido e exposição de ar à pressão. Além disso, as patentes CN104083409-A e CN104083409-B combinam moagem ultramicronizada, ultrassom e uso de nitrogênio (-18 a -15°C) para romper os esporos. Neste caso, o micro-ondas é utilizado exclusivamente para secar os esporos de *G. lucidum*.

[024] **Nossa proposta** exclui o nitrogênio e ar a pressão porque combina a maceração com auxílio de esferas e a exposição a micro-ondas para conseguir a ruptura da parede dos esporos de *G. lucidum*. Este tipo de patentes se encaminha ao uso de pó de esporas de *G. lucidum*. **Nossa invenção** apresenta dois produtos para uso *in vitro* em células reprodutivas. Usa-se rompimento com moagem e solvente fulereno nas patentes CN107080758-A e CN107080759-A. Na primeira o pré-processamento se dá por moinho de esferas em condições de alta energia e baixa temperatura, durante 1 a 20 h numa taxa de 200 a 2000 rotações por min (rpm). Na segunda a moagem por esferas é feita entre 20-40 °C. As aplicações são para prevenir formação de tumores.

[025] A patente CN105647809-A faz ruptura de esporos com moinho de esferas em forma de funil (0.4 a 0.8 Megapascais) em uma solução em condições de alta pressão, temperatura ambiente e gás supersônico, que passa no fluxo numa taxa de 420-470 metros por segundo. A patente CN104054505-A usa grânulos perolados de diferentes diâmetros (2-5 mm) inclusos em moinho para ruptura de

esporos de *G. lucidum*. A proporção de esporos e esferas é de 1:7. Nossa invenção descreve o processo de extração de dois produtos para células reprodutivas com sacarídeos de peso molecular menor que 12 KDa e aplicação em células reprodutivas.

[026] A patente CN102972973616-A utiliza um moinho de nano-impacto o qual promove a quebra dos esporos por colisão das esferas de zircónio de 0,1 mm de diâmetro. Após a ruptura, é feita uma extração em de dióxido de carbono supercrítico para obter triterpenos, ácido ganodérico A e fitoesterina. Na patente CN10197971975-A, os esporos de *G. lucidum* são macerados, lavados com água a 40 °C durante 12 h e secos. Então, os esporos são liofilizados, diminuindo e aumentando a temperatura.

[027] O processo inclui quatro repetições de ciclos de esfriamento de -55 a -65 °C durante 3 a 5 h e de aquecimento de 35 °C durante 3 a 5 h. Terminado o processo de liofilização, os esporos foram triturados com a ajuda de esferas de aço inoxidável para concluir o processo de rompimento e foram armazenados em cápsulas. A patente CN101933955-A congela os esporos a -40 °C e depois processa-os por moinho coloidal e ultrassom em um intervalo de 30 e 40 min. A patente CN101002805-A utiliza pérolas com diâmetros entre 2 e 5 mm em equipamento de moagem para quebrar esporos. Na patente CN106010968-A é utilizado um moinho coloidal, com esferas de argônio em suspensão para pré-tratamento dos esporos e, depois é descrita a quebra por método enzimático, com enzima de fruta. O pó resultante dos esporos quebrados é seco e deixado ao ar de alta pressão. Em seguida, são misturados com *bitterherb, Yunnan stellaria vestila, reineckia cornea, ginseng, pholidota* e *licorie* e armazenados em sachê para consumo oral, com função de estimulação do sistema imune.

[028] A patente CN10815797943-A também utiliza um moinho coloidal, porém, os esporos são misturados com óleo de peônia, diluídos em

água e aquecidos a 50 °C sob vácuo. Por seguinte, são misturados com gelatina e glicerina e são armazenados em cápsulas para consumo oral. A patente CN106109507-A rompe os esporos de *G. lucidum* com o auxílio de solvente durante a trituração. Também faz o uso de ultrassom para formar pó de esporos para consumo oral na prevenção de doenças. A patente CN107893029-A realiza uma hidrólise enzimática dos esporos, que são posteriormente expostos ao nitrogênio e quebrados no moinho.

[029] **Nossa invenção** utiliza a maceração com a ajuda de esferas de aço/crômio de 1 mm de diâmetro para fazer a quebra direta das esferas. A metodologia permite obter 98% de quebra e, também permite o rompimento dos esporos em pequenas quantidades para experimentação. Além disso, é importante ressaltar que em nossa invenção os produtos são extraídos dos esporos de *G. lucidum* e sua aplicação é em células reprodutivas *in vitro*.

[030] Várias patentes descrevem processos de extração de moléculas relacionadas com sacarídeos de esporos de *G. lucidum*. A patente CN107198709-A obtém polissacarídeos e sacarose dos esporos por micromoagem com pressão de ar e maceração a -10 °C, por 9 a 11 ciclos. Em seguida, os esporos são colocados em água a 100 °C entre 2 - 2,5 h, depois é adicionado β ciclodextrina para moer em moinho coloidal por 30 min. O polissacarídeo é usado para aumentar a imunidade e como citostático. O produto é misturado com *ginseng, tuckahoe* e *atractylodes*. A patente CN109123620-A adiciona ácido cítrico aos esporos de *G. lucidum*, que são secos, congelados, expostos ao vapor numa temperatura entre 62 a 68°C por 32 a 38 min, magnetizados e macerados. Desta forma, obtém-se o pó de esporos ricos em β glucan, que é misturado com polissacarídeos de algas castanhas, espinheiro-branco e mangostán.

[031] O produto é usado oralmente para aumentar a imunidade e melhorar a digestão. A patente CN108623703-A utiliza esporos irradiados expostos a temperaturas entre 80 e 100°C por 1 a 4 h para fazer uma extração em água e obter polissacarídeo cru, o qual é liofilizado e utilizado como suplemento nutricional. A patente CN108610435-A, após maceração, congelamento e quebra dos esporos com dióxido de carbono supercrítico e ultrassom produz a extração de um polissacarídeo dos esporos de *G. lucidum*. O extrato é preparado com etanol (50 a 80%).

[032] A patente CN108467438-A extrai um polissacarídeo intracelular do sobrenadante resultante da dos esporos fervidos em água. Os esporos sedimentados são desengordurados com etanol e colocados novamente em água a ferver para obter outro sobrenadante. Os sobrenadantes são misturados e precipitados com etanol. O sedimento é passado através de uma coluna de troca iônica e são obtidos polissacarídeos de tipo: β-D-Glc de estrutura (1→4,3), (1→6)(1→4), (1→4), (1→6)(1→6)(1→6), (1→4)(1→6), (1→3), (1→4,3), (1→6), (1→2). Os polissacáridos têm entre 105 e 104 kDa em tamanho e sua administração é para melhorar a resposta imunológica.

[033] **Nossa invenção** inclui extração principalmente do monossacárido glucose, o sacarídeo pode ter tamanho menor que 12 kDa e sua aplicação tem como objetivo melhorar os parâmetros reprodutivos de espermatozoides e oócitos em meios de cultivo *in vitro*. Existem patentes que utilizam sistemas de cilindros e dispositivos de quebra de esporos de *G. lucidum*, por exemplo, a patente CN207546686-U utiliza um dispositivo que inclui um sistema de refrigeração enquanto vários cilindros maceram e quebram os esporos. A patente CN205761474-U também usa o sistema prévio, mas acompanha-o com vibração. A patente CN1473658-A utiliza cilindros de zircônio granulado para macerar e quebrar os esporos. A patente CN201602113-U utiliza um dispositivo

automático de temperatura e ondas eletromagnéticas para esterilizar e quebrar os esporos. A patente CN201602113-U possui um dispositivo com gerador de temperatura, de pulso elétrico e emissor de energia de ondas eletromagnéticas. O sistema é automatizado e atua na esterilização e quebra dos esporos.

[034] A **nossa invenção** é caracterizada pela maceração assistida por esferas e pela exposição dos esporos ao micro-ondas, não incluindo, desta forma, dispositivos muito complexos. Os tratamentos enzimáticos podem ser simultâneos com outros métodos de rompimento de esporos de *G. lucidum*. A extração de substâncias da parede dos esporos pode variar e seus usos são geralmente para fortalecer o sistema imunológico. Na patente CN108096216-A os esporos são macerados e tratados com enzima em uma temperatura entre 105 e 115 °C durante 4 a 6 min. Os esporos são banhados com ácido cítrico e depois colocados num sistema de refluxo com etanol em 4 ciclos de 60 a 75 °C durante 2 a 4 h.

[035] Os óleos obtidos após este processo são colocados em microcapsulas. Parte do cogumelo do *G. lucidum* e esporos de *Dendrobium huoshanense* são misturados para formar um suplemento oral com função de melhorar a resposta imunológica, para o tratamento de cirrose, insuficiência hepática, esteatohepatite e enfisema hepático. O produto também pode ser usado para diminuir a inflamação. Existem diversos tipos de extrações com diferentes temperaturas com o objetivo de extrair polissacáridos, óleos e triterpenos dos esporos de *G. lucidum*. A patente CN10878783414-A extrai moléculas dos esporos por exposição a temperaturas distintas. A primeira exposição é de 2 a 3 h a 100 °C e a segunda entre 1 a 2 h.

[036] Obtém-se um precipitado com etanol a 50-60 %. Em seguida, o material é seco entre 100 e 120 °C durante 24 a 30 h para obter um extrato sólido. Nesta metodologia são utilizadas várias combinações de solventes, tais como: ácido acético glacial, anidrido acético e anidrido

butírico. O extrato inclui radiação de micro-ondas para secagem e, por fim, é misturado com extrato de folha de goiaba, folha de amora, medula e *Lycium barbarum*. O produto é hipoglicemiante e apresentado na forma de comprimidos orais. A patente CN104013652-A utiliza esporos quebrados e a mistura com etanol 20 a 95% numa temperatura de 50 a 100°C em 4 ciclos de 3 h. Os extratos são concentrados e o etanol é evaporado.

[037] O resíduo é lavado com éter de petróleo, acetato de etilo e butanol durante vários ciclos à temperatura de 100 °C. Todos os extratos são secos e as paredes dos esporos são tratadas com ácido acético e hidróxido de sódio para extrair quitosano. Os extratos e o quitosano extraído são utilizados nos tratamentos de câncer. A patente CN10715808043-A descreve uma extração aquosa de 4 a 6 h em 80 a 120 °C, o precipitado é concentrado entre 60 a 70°C. A mistura possui triterpenos e polissacarídeo para tratamento de câncer gástrico, adenocarcinoma de pulmão e linfoma. A patente CN104857030-A é uma bebida alimentar com esteróis e triterpenos obtidos por três tipos de extração dos esporos. A primeira extração é feita a 63°C por 45min, 96°C por 20 min e 100°C por 20 min. A segunda extração é feita a 78°C por 60 min e 90°C por 25 min. A terceira extração é feita em três ciclos de 15 min a 100°C. Todos os extratos são misturados, concentrados e secos e apresentados em pó.

[038] Na patente CN101849974-A, os esporos são lavados, congelados duas vezes por 4 a 5 h a -14 °C, depois assados, esterilizados em raios ultravioletas e embalados para consumo. Na patente CN100998614-A a extração do etanol é feita de 40 a 95% por 2 a 3 h em 50 a 80°C e depois concentrada entre 50 a 80°C. **Nossa invenção** utiliza ciclos de extração aquosa entre 50 e 100°C sem o uso de produtos químicos ou separações que os incluam, nossa invenção faz parte de processos de

tecnologia verde, os quais não impactam nocivamente o meio ambiente, e nem geram resíduos tóxicos.

[039] Os açúcares extraídos têm uma função na cultura *in vitro* de células espermáticas e ovócitos inclusos em tecido de ovário. Os esporos de *G. lucidum* e seus diferentes extratos, ácidos graxos e polissacarídeos são utilizados em tratamentos para o câncer, melhorando a função hepática, doenças cardíacas, suplementos orais para fortalecer o sistema imunológico e como auxiliar no tratamento de diversos tipos de células tumorais. As diferentes apresentações podem conter apenas esporos ou ser misturadas com diferentes produtos.

[040] A patente CN106212818-A, apresenta um chá como suplemento nutricional contendo esporos de *G. lucidum*, crisântemo, trigo, medula óssea, morango, *Radix puerariae* e xilitol. A patente CN108244443-A, descreve uma bebida de esporos sólidos com suplemento de selênio, ácido cítrico e mistura de soja, feijão verde, milheto, trigo e milho para estimular a proliferação de linfócitos, síntese de anticorpos e imunoglobulinas, proteção contra câncer de cólon, câncer de pele, câncer de fígado e mama.

[041] A patente CN108065305-A além de quebrar esporos com pressão de ar e extração de dióxido de carbono supercrítica, apresenta um produto em comprimidos que é usado como antioxidante e inclui uma mistura de lipídios, vitamina E, palmitato de ascorbilo e polifenol para fortalecer o cérebro, melhorar a inteligência, diminuir o envelhecimento cerebral e estimular o sistema imunológico. A patente CN101856430-A apresenta um produto feito de esporos e pó de ossos para melhorar a nutrição, a energia e o sistema imunológico. A patente CN109419822-A expõe um produto em cápsulas, comprimidos e xarope rico em selénio para aumentar a imunidade.

[042] A patente CN108991527-A descreve o desenvolvimento de cápsulas para melhorar a imunidade, digestão e efeito antioxidante, o

produto inclui pólen e suco de bambu. Na patente CN108721341-A esporos quebrados são utilizados para a prevenção de doenças cardíacas e hipertrofia cardíaca compensatória. A patente CN107397765-A explica que seu produto obtido numa extração com etanol tem função antineoplásica e citostática. A patente CN107455637-A mistura esporos de *G. lucidum* quebrados e de seu cogumelo para suplemento oral.

[043] As patentes CN10650999905-A e CN106509906-A têm uma apresentação em comprimido oral de polissacarídeos de esporos de *G. lucidum* para estimular a imunidade. A patente CN106036883-A mistura polissacáridos de esporos e cogumelos de *G. lucidum* com celulose microcristalina e amido para diminuir a toxicidade por metais pesados e servir como um suplemento nutricional. A patente CN105901201-A apresenta esporos e cogumelos processados na forma de chá branco para diminuir a inflamação, desintoxicar, baixar a pressão arterial, baixar a concentração de açúcar no sangue, diminuir a fadiga, aumentar a imunidade e embelezar.

[044] A patente CN105687256-A apresenta um tratamento para homens de meia idade com déficit androgênico. A terapia envolve o uso de esporos (600 mg) três vezes ao dia por um período de três semanas para infertilidade. A patente KR2016019750-A descreve um tratamento com esporos de *G. lucidum* para obesidade, hiperlipidemia, esteatose hepática e arterosclerose. Patente CN105168266-A tem uma mistura de esporos e pó de cogumelo para diminuir a fadiga. A patente CN101006856-A utiliza os corpos frutíferos e esporos de *G. lucidum* para o tratamento antisséptico de bactérias intestinais.

[045] As patentes US200626956-A1 e US2005025786-A1 explicam que a administração de esporos de *G. lucidum* germinados em mulheres antes da gravidez reduz os defeitos do tubo neural em crianças. Além Disso, promove a diferenciação celular e a proliferação de células

neuroepiteliais no embrião. A patente CN1286119-A usa ácido ganodérico, esporos e polidose ganodérica extraída em etanol para suprimir células tumorais.

[046] A patente CN1363391-A apresenta o desenvolvimento de cápsulas com extrato e pó de esporos de *G. lucidum* para estimular a imunidade. A patente CN1230435-A explica que os esporos *G. lucidum* da China, Japão, Coreia e Taiwan são utilizados para tratar hepatite, nefrite, hipertensão, hiperlipemia, insônia, inibir as células cancerosas e estimular o sistema imunitário.

[047] As patentes de utilizações dos esporos e extratos de *G. lucidum* são muito diversas e a **nossa invenção** apresenta dois produtos para a adição *in vitro* em meios de cultivo de espermatozoides e oócitos.

Descrição Resumida da Invenção

[048] Nesta patente é descrito processo de ruptura do *Ganoderma* composto por quatro etapas, a partir das quais são obtidos dois produtos biotecnológicos. Estes permitem a conservação de oócitos pré-antrais e atuam como agente antioxidante em espermatozoides, para manutenção de suas características biológicas.

[049] O primeiro passo foi definir a metodologia para ruptura dos esporos; o segundo produzir e caracterizar os extratos; no terceiro passo avaliou-se a citoxicidade do produto; e na última etapa foi realizada a avaliação das atividades biológicas. A ruptura dos esporos de *G. lucidum* compreende a exposição dos esporos a micro-ondas (900 - 1200 Watts) e cisalhamento com auxílio de esferas de aço/crômio. Essas etapas podem ser realizadas de forma isolada ou em associação.

[050] No processo isolado os esporos de *G. lucidum* foram quebrados com esferas de aço/crômio de 1 mm de diâmetro durante 5 e 15 min de maceração, e foi observado uma eficiência de 98%. Quando

associadas as etapas de micro-ondas e maceração com esferas de aço/crômio, obteve-se 100% de eficiência.

[051] Para a extração dos produtos bioativos foi realizada uma etapa de extração aquosa com agitação (**Produto 1**) e uma extração adicional, a qual incluiu exposição a micro-ondas antes da extração (**Produto 2**). O estudo da citotoxicidade celular mostrou que em relação ao controle os produtos não apresentaram citotoxicidade. A atividade biológica do produto 1 em folículos pré-antrais suínos foi avaliada por ensaio *in vitro* e, além disso observou-se a estimulação do crescimento folicular, devido ao aumento do diâmetro folicular (38,36 ± 05,03 µm) e do diâmetro oocitário (24,60 ± 03,48 µm). O produto 2 foi testado em espermatozóides e permitiu a manter a viabilidade celular (19,20 ± 0,13 %). Os produtos 1 e 2 ajudam a manter o equilíbrio osmótico celular nos meios de cultivo porque os carboidratos presentes ajudam controlar os radicais livres e os micro e macronutrientes (Na, K, Ca, Mn, Mg, P) podem melhorar a viabilidade celular.

[052] De fato, os extratos de *G. lucidum* podem ser adicionados como adjuvantes aos meios de cultivo celular porque seu poder antioxidante é eficaz.

Definições

Oócito: célula germinal feminina precursora do óvulo e responsável pela reprodução.

Folículos pré-antrais: unidade funcional do ovário, na qual estão inseridos os oócitos. As estruturas foliculares são responsáveis pela maturação e desenvolvimento dos oócitos.

Espermatozoide: célula germinal masculina responsável pela fertilização do óvulo.

Micro e macroelementos: são minerais essenciais para a vida e indispensáveis para o metabolismo, entre eles esta o sódio, potássio, magnésio, cálcio, selênio, cobre, zinco etc. Os macroelementos são

encontrados nos seres vivos em grandes quantidades, enquanto os microelementos em poucas.

Ganoderma lucidum: cogumelo comestível do tipo basidiomiceto, da familia *Ganodermataceae,* conhecido nas culturas asiáticas por suas propriedades terapêuticas na saúde, seu efeito antioxidante e como suplemento nutricional.

DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, reagente usado para medir poder antioxidante de substâncias.

Liofilização: processo de desidratação, no qual se usa a sublimação da água, com o objetivo de conservar produtos naturais.

MOIFOPA: manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

Fertilidade: capacidade para conceber um filho.

In vitro: procedimento em ambiente controlado fora de um organismo vivo.

Vitalidade: morfologia sem mudanças na estrutura de espermatozoides e oócitos. Célula viva.

Motilidade: movimentação do espermatozoide, habilidade de uma célula movimentar-se.

Fecundidade: potencial para a reprodução de um organismo.

Dialise: fenômeno de retenção de substâncias por membranas semipermeáveis.

Sacarídeo: carboidratos simples, composto orgânico formado por carbono, hidrogênio e oxigênio.

Dissacarídeo: conjunto de dois monossacarídeos.

Monossacarídeos: açúcar simples de fórmula CH_2O, e classificados segundo o número de átomos de carbono

Polissacarídeo: carboidratos formados pela polimerização de outros açúcares menores

Metabólito: moléculas resultantes do metabolismo celular.

Coloidal: sistema composto por duas fases, a primeira de líquido fluido e a segunda de partículas solidas finas.

Antioxidante: molécula que pode retardar ou prevenir a oxidação. Também, pode se definir como um tipo de reação química de transferência de elétrons de uma substância para um agente oxidante.

Reserva folicular: número de folículos pré-antrais ovarianos.

Biocomposto: elemento químico que ajuda manter o funcionamento de diversos sistemas vitais, pode-se classificar em carboidratos, lipídios e proteínas.

Listagem das figuras

[053] As figuras presentes no anexo servirão para proporcionar um melhor entendimento do processo de extração dos compostos bioativos de esporos de *G. lucidum* e dos produtos que aqui são reivindicados para uso na presente patente.

[053] Figura 1: fluxograma para o desenvolvimento do processo e a melhor forma de aplicar o processo/produto" obtido. Nesta figura é descrito a evolução da tecnologia objeto da presente patente.

[054] **Erro! Fonte de referência não encontrada.**: Processo para obtenção dos dois produtos após a ruptura de esporos de *Ganoderma lucidum.*

[055] **Erro! Fonte de referência não encontrada.**3: Análise realizada por HPSEC-MALLS-RID para o produto 2. O extrato possui conteúdo rico em sais e, além disso, a presença de um sacarídeo entre os minutos 60 e 70. As moléculas relacionadas apresentam pequenos tamanhos moleculares e alta concentração.

[056] Figura 4: Categorias de preservação do DNA no teste cometa que foram classificados em A, B, C e D mostrando diferentes níveis de integridade do DNA nos espermatozóides avaliados. Existem quatro categorias para medir o dano no DNA: A para 20 µm; B para 20.01 - 30 µm; C for 30.01 - 40 µm; D para valores maiores que 40.01 µm (SHAMSI et

al., 2010). Apenas a categoria A foi considerada porque o objetivo da análise era avaliar as propriedades antioxidantes com menor dano ao DNA entre os diferentes extratos dos esporos *G. lucidum*. A cauda do esperma não foi considerada nas medidas.

[057] Figura 5: folículos pré-antrais. A) folículo primordial morfologicamente normal; B) folículo primário morfologicamente normal aos 7 dias de cultura; C) folículo pré-antral morfologicamente degenerado. (GC) células de granulosa, (O) oócitos, (N) núcleo, (escala: 50 µm).

Descrição Detalhada da Invenção

[059] Na figura1 é detalhado o bioprocesso proposto nesta invenção para obtenção dos produtos 1 e 2, a partir dos esporos de *G. lucidum,* e sua aplicação em células reprodutivas.

1. Processo de extração de compostos bioativos:

[060] As moléculas bioativas são, em sua maioria, liberadas após o rompimento da parede dos esporos de *G. lucidum*. Para liberar estas moléculas são aplicados dois processos de ruptura de esporos.

1.1. Processo 1:

[061] Na primeira metodologia, usada para produzir o produto 1, os esporos são cisalhados com o auxílio de esferas de aço/crômio durante 5 a 15 min. O percentual de ruptura celular foi de 98%.

1.2. Processo 2:

[062] Na segunda metodologia, usada para produzir o produto 2, a maceração com esferas foi associada à exposição ao micro-ondas, entre 5 a 15 min. A ruptura celular foi de 100%.

2. Processo de liberação em extrato aquoso e com diferentes temperaturas das substâncias bioativas das paredes de esporos:

Foram utilizadas diferentes temperaturas, entre 30 a 100 °C para extração aquosa dos esporos. Isso permitiu a extração de sacarídeos da parede dos esporos de *G. lucidum*.

2.1. Processo 1:

[064] Após rompimento dos esporos de *G. lucidum,* foi feita uma extração aquosa, entre 20 a 30 °C, durante 24 h com agitação constante de 120 revoluções por min (rpm).

2.2. Processo 2:

[065] Após rompimento dos esporos com esferas e micro-ondas foi realizada uma extração, entre 20 e 30 °C durante 24 h com agitação de 120 rpm. Após este processo a solução foi centrifugada e o sobrenadante isolado. Em seguida, foi feita uma dialise com membrana de 12 a 14 kDa obtendo uma fração eluída.

[066] O resíduo dos esporos foi suspenso em solução aquosa, a qual foi aquecida, entre 50 e 100 °C durante 2 h. Após o aquecimento a solução foi centrifugada e o sobrenadante isolado novamente. O processo de aquecimento foi realizado em três ciclos, e todos os sobrenadantes obtidos foram unidos em uma única amostra. Por último, os extratos foram concentrados e liofilizados.

3. Processo para caraterização dos produtos 1 e 2:

[067] Os produtos 1 e 2 foram analisados por sua composição monosacarídica. No produto 1 foi encontrado ramnose (1.76%), fucose (4.19%), xilose (3.90%), manose (10.15%), glucose (62.19%) e galactose (17.21%). No produto 2 foi achado arabinose (11.28%), manose (20.22%), glucose (53.33%) e galactose (15.17%).

[068] Na análise por HPSEC-MALLS-RID do produto 1 foi hetereogêneo e apresentou moléculas relacionadas com carboidratos, no tempo de 40 min da análise, e conteúdo de proteínas ou aminoácidos na análise por infravermelho. O produto 2 também foi hetereogêneo com sinal de

carboidrato em 70, 65 e 60 min. As moléculas encontradas estão relacionadas com carboidratos de baixo peso molecular.

Exemplos de uso dos produtos 1 e 2 após ruptura dos esporos de *Ganoderma*

Os seguintes exemplos servem para ilustrar como foi realizada a abordagem científica para avaliar a citotoxicidade e a atividade biológica dos produtos.

Exemplo 1: Avaliação de citotoxicidade por cultivo *in vitro* de tecido de córtex ovariano

[072] Após a obtenção dos extratos foi feita a avalição de citotoxicidade em oócitos usando a técnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA). O cultivo *in vitro* de tecido de córtex ovariano foi realizado de acordo com a metodologia de MAO et al., (2004). O meio de cultivo utilizado foi alfa MEM (pH 7,2 - 7,4), 100 mg/mL de ácido ascórbico, 1000 mg/1 mL BSA, 29,200 µg/mL hipoxantina, 10 µg/mL transferrina, 1 mM piruvato, 100 µg/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina.

[070] O tecido de córtex ovariano de cada par de ovários do animal foi cortado em 11 fatias (tamanho aproximado: 5 mm × 5 mm x 1 mm), utilizando um bisturi em condições estéreis. Uma porção foi imediatamente fixada para análise histológica e ultra-estrutural (controle fresco) e as outras 10 foram colocados em cultivo por 7 dias.

[071] As amostras de tecido de córtex ovariano foram transferidas para placas de cultivo de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultura e 10 µL de diferentes diluições do produto 1. As diluições foram de 10, 25, 50 e 100 %. Posteriormente, foram realizadas análises histológicas (CELESTINO et al., 2009; MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012).

[072] As amostras para teste histológico foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4 %, em PBS a pH 7,2, durante 12 h a 4 °C. O tecido ovariano foi desidratado, em concentrações crescentes de etanol, e embebidos em parafina. Cada amostra foi fracionada em cortes de 7 µm e depois foram coradas com ácido periódico - Schiff (PAS) - hematoxilina. Cada seção foi avaliada com auxílio do microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão), com ampliação 400x. Na leitura foram considerados os folículos vivos, com base na integridade do oócito e as células da granulosa, presença ou ausência de corpos piquinóticos, retração ooplasmática e organização das células da granulosa (Figura 4).

[073] Os estágios de desenvolvimento dos folículos foram previamente definidos (TELFER, 1996) como primordial (uma camada de folículos achatados) ou de crescimento (primário: uma camada de células da granulosa de forma cuboidal; secundário: duas ou mais camadas de células granulosa cuboidais ao redor do oócito). A percentagem de folículos morfologicamente normais, antes (dia 0) e depois do cultivo *in vitro*, indicaram a porcentagem de sobrevivência folicular. As diluições do produto 1 (10, 25, 50 e 100 %) não tiveram efeitos citotóxicos sobre a sobrevivência e desenvolvimento dos folículos pré-antrais durante os dias de cultivo.

Exemplo 2: **Atividade biológica do produto 1 em oócitos:**

[074] O produto 1 além de manter a sobrevivência igual ao controle no dia 7 de cultivo *in vitro,* apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os diâmetros folicular e oocitário. A concentração de 50 % do produto 1 estimulou o aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro oocitário (24,60 ± 03,48 µm) e no diâmetro folicular (38,36 ± 05,03 µm) nos 7 dias de cultivo (Tabela 1).

Tabela 1. Sobrevivência dos folículos pré-antrais. Na tabela 1 são dados os resultados da aplicação do produto 1, as letras em vermelho mostram valores significativos ($p < 0.05$). A sobrevivência folicular é apresentada em percentagem (%). A sobrevivência folicular é maior quando o meio de cultivo teve adição do extrato de esporos de *G. lucidum* nos 7 dias de cultivo.

Produto 1	Diâmetro folicular		Diâmetro oócitario	
Percentual de concentração (%)	Dia 0 (µm)	Dia 7 (µm)	Dia 0 (µm)	Dia 7 (µm)
0	30.51±05.68^{A}	30.50 ± 02.94^{A*}	23.95±04.29^{A}	23.53±02.01^{A*}
10		32.68 ± 05.55^{A*}		19.29±01.11^{B***}
25		36.62 ± 07.05^{B*}		21.89±04.09^{A*}
50		38.36 ± 05.03^{B**}		24.60±03.48^{A**}
100		35.84 ± 05.86^{B*}		21.14±02.23^{A*}

Na tabela 2 compara-se o efeito do produto 1 sobre o diâmetro follicular.

Tabela 2. Incremento do diâmetro folicular nos 7 dias de cultivo de folículos. Letras vermelhas são significativas ($p < 0.05$). Compara-se sempre o diâmetro folicular antes e depois dos 7 dias de cultivo.

Exemplo 3: **Efeitos de ação do produto 2 em espermatozoides:**

[075] O produto 2 conservou significativamente (*p < 0,05*) a viabilidade (19.20 ± 00.13 %) dos espermatozóides após o teste de atividade

Producto 1, percentual de concentração (%)	Sobrevivência folicular	
	Dia 0 (%)	**Dia 7 (%)**
0	74.00±00.07^{A}	56.00±00.10^{B*}
10		42.66±00.07^{B**}
25		44.00±00.05^{B**}
50		56.66±00.07^{B*}
100		60.00±00.02^{B*}

antioxidante. Esta atividade observada foi superior ao controle positivo (H_2O_2) e ao controle negativo que foi suplementado com ácido ascórbico (12,40 ± 00,11 %). Além disso, a manutenção da motilidade apresentou tendência estatística, porém não foi significativa no grupo em que foi adicionado o produto 2 (*p < 0,05*).

[076] A avaliação da preservação do DNA das amostras de sêmen avaliadas com o ensaio Cometa apresentaram 4 categorias de integridade do DNA. A FIGURA 5 mostra os halos circulares de espermatozóides com alta integridade de DNA (categoria A), enquanto nas categorias B e C é visível um halo esticado ou um halo com pequenos fios salientes, indicando um grau médio de ruptura no DNA. A categoria D mostra um ponto maior que se afasta do núcleo celular, revelando esperma com menor integridade de DNA.

[077] A categoria A teve a melhor percentagem esperada, uma vez que apresentou uma menor fragmentação de DNA entre os espermatozóides. A adição do produto 2 não promoveu diferença

estatística significativa ($p < 0.05$). Entretanto, houve uma tendência entre o controle negativo com ácido ascórbico (64,86 ± 00,15 %) e o produto 2 (77,14 ± 00,19 %), o qual apresentou percentagem mais elevada de esperma na categoria A. Ver Figura 5 e Tabela 3.

Tabela 3. Percentagem de motilidade, viabilidade e menor fragmentação de DNA em espermatozoides cultivados in vitro. As letras vermelhas são valores significativos. AA significa ácido ascórbico, controle negativo. H_2O_2, grupo sem adição de antioxidante (controle positivo).

Grupos	% Motilidade	% Viabilidade	% Menor fragmentação DNA
AA, (-) Controle	09.55±0.101	12.40±0.11	64.86±00.15
H2O2, (+) Controle	05.22±0.11	05.04±0.07	48.17±00.22
PRODUTO 2	09.36±0.13	19.20±0.13*	77.14±00.19

Em resumo, o processo de ruptura de esporos de *G. lucidum* e os dois produtos têm aplicabilidade na área de resgate e conservação de células reprodutivas de animais e humanos com melhoramento nos diferentes parâmetros das células reprodutivas. No processo de extração dos agentes bioativos para conservação de células reprodutivas os dois produtos seguem processos diferentes. No **Produto 1** o processo de obtenção é o rompimento mecânico, dos esporos de *G. lucidum,* e extração aquosa usando temperaturas entre 28 e 32 °C. No **Produto 2** o processo de extração é feito em série. No primeiro passo é usado água, em temperaturas entre 50 e 100 °C, por três ciclos. A cada ciclo é feita centrifugação a 3000 - 8000 *g* por 5 - 15 min. O

sobrenadante é resgatado e liofilizado, na sequência o produto é dialisado por um período entre 20 e 30 h. Assim, os extratos de *G. lucidum* obtidos na presente invenção podem ser adicionados como adjuvantes aos meios de cultivo celular porque seu poder antioxidante é eficaz.

BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S. S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 9, n. 3, p. 338–347, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62151-7>.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 3, n. 28, p. 1–21, 2005.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799–808, 2006.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; et al. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured In Vitro. **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 3, p. 239–246, 2009. Disponível em: <http://rsx.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1933719108325756>.

CHENG, C. R.; YUE, Q. X.; WU, Z. Y.; et al. Cytotoxic triterpenoids from Ganoderma lucidum. **Phytochemistry**, v. 71, n. 13, p. 1579–1585, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.06.005>. .

CIA, C. I. A. Country comparison: Total fertility rate. Disponível em: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/rankorder/2127rank.html>.

EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M. R.; NAKAMURA, N.; et al. Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*.

Phytochemistry, v. 49, n. 6, p. 1651–1657, 1998.

FIGUEIREDO, J. R. DE; MARTINS, F. S.; PAULA, A.; RODRIGUES, R.; ROBERTO, J. Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos Development and applications of artificial ovary in goats. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 18, p. 59–62, 2009.

FRANKS, S.; HARDY, K.; CONWAY, G. S. **Pathophysiology of Ovarian Function in the Human Female**. Fourth Edi ed. Elsevier, 2015.

GIOMETTI, I. C. **Cultivo de Folículos PRÉ-ANTRAIS**, 2003. Universidade Estadual Paulista (UNESP).

GUERRIERO, G.; TROCCHIA, S.; ABDEL-GAWAD, F. K.; CIARCIA, G. Roles of reactive oxygen species in the spermatogenesis regulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. April, p. 10–13, 2014.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; JOÃO, M.; et al. Fruiting body , spores and in vitro produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal : A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 135–140, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.009>.

HELENO, S. A.; BARROS, L.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; et al. Fruiting body , spores and in vitro produced mycelium of Ganoderma lucidum from Northeast Portugal : A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharidic extracts. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 135–140, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.009>.

HELENO, S. A.; FERREIRA, I. C. F. R.; ESTEVES, A. P.; et al. Antimicrobial and demelanizing activity of Ganoderma lucidum extract , p - hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 95–100, 2013.

HOMA, S. T.; VESSEY, W.; PEREZ-MIRANDA, A. Reactive Oxygen Species (

ROS) in human semen : determination of a reference range. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, p. 757–764, 2015.

HUIE, C. W.; DI, X. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 812, n. 1-2 SPEC. ISS., p. 241–257, 2004.

KAO, P.; WANG, S.; HUNG, W.; et al. Structural Characterization and Antioxidative Activity of Low-Molecular-Weights Beta-1 , 3-Glucan from the Residue of Extracted *Ganoderma lucidum* Fruiting Bodies. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 8, 2012.

KWAK-KIM, J.; BAO, S.; LEE, S. K.; KIM, J. W.; GILMAN-SACHS, A. Immunological modes of pregnancy loss: Inflammation, immune effectors, and stress. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 2, p. 129–140, 2014.

LEITE, G. A. A.; FIGUEIREDO, T. M.; SANABRIA, M.; et al. Ascorbic acid supplementation partially prevents the delayed reproductive development in juvenile male rats exposed to rosuvastatin since prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. october, p. 328–338, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.006>.

LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLES, R. A. MINIREVIEW Ascorbic Acid and Fertility. **Biology of reproduction**, v. 52, p. 262–266, 1995.

MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ANDRADE, P. M.; SALES, E. T.; et al. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. **Animal reproduction science**, v. 132, n. 3–4, p. 159–68, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22727672>.

MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosal cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro. **Journal of animal science**, v. 82, n.

7, p. 1967–75, 2004. Disponível em: <http://animalsci.highwire.org/content/82/7/1967.short%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15309943>.

MORENO-MENDIETA, S.; GUILLEN, D.; HERNANDEZ-PANDO, R.; SANCHEZ, S.; RODRIGUEZ-SANOJA, R. Potential of glucans as vaccine adjuvants: A review of the alpha-glucans case. **Carbohydrate polymers**, v. 165, p. 103–114, 2017. England.

ORSI, N. M.; FIELD, S. L.; ELLISSA, N.; ALLEN, K.; CUMMINGS, M. Cytokine Networks in the Ovary. **Cytokine Effector in Tissues**, p. 51–74, 2017. Elsevier.

PATERSON, R. R. M. Ganoderma – A therapeutic fungal biofactory. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1985–2001, 2006.

PERDICHIZZI, A.; NICOLETTI, F.; VIGNERA, S. L. A.; et al. Effects of Tumour Necrosis Factor- a on Human Sperm Motility and Apoptosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 2, p. 152–162, 2007.

RÍOS-CAÑAVATE LUIS, J. *Ganoderma lucidum*, un hongo con propiedades inmunoestimulantes. **Revista de Fitoterapia**, v. 8, n. 2, p. 135–146, 2008.

SHAMSI, M. B.; VENKATESH, S.; TANWAR, M.; et al. Comet Assay : A Prognostic Tool for DNA Integrity Assessment in Infertile Men Opting for Assisted Reproduction. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 675–681, 2010.

SOCCOL, C. R.; BISSOQUI, L. Y.; RODRIGUES, C.; et al. Pharmacological Properties of Biocompounds from Spores of the Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes): A Review. **International journal of medicinal mushrooms**, v. 18, n. 9, p. 757–767, 2016. United States.

SUN, X.; WANG, H.; HAN, X.; et al. Fingerprint analysis of polysaccharides from different Ganoderma by HPLC combined with chemometrics methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 432–439, 2014. Disponível :

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714008170>
SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. Annals of Translational Medicine. **Anais...** . v. 2, p.17, 2014.
TELFER, E. E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. **Theriogenology**, v. 45, n. 1, p. 101–110, 1996.
VICTOR, V. V; GUAYERBAS, N.; PUERTO, M.; MEDINA, S.; FUENTE, M. DE. Ascorbic acid modulates in vitro the function of macrophages from mice with endotoxic shock. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 89–101, 2000.
WAGNER, H.; CHENG, J. W.; KO, E. Y. Role of reactive oxygen species in male infertility : An updated review of literature. **Arab Journal of Urology**, p. 1–9, 2017. Arab Association of Urology.
WANG, Y.; LIU, Y.; YU, H.; et al. Structural characterization and immuno-enhancing activity of a highly branched water-soluble β-glucan from the spores of Ganoderma lucidum. **Carbohydrate Polymers**, v. 167, p. 337–344, 2017. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861717302631>
WU, K.; JU, T.; DENG, Y.; XI, J. Mechanochemical assisted extraction: A novel, efficient, eco-friendly technology. **Trends in Food Science and Technology**, v. 66, p. 166–175, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.011>.
ZHAO, C.; ZHANG, C.; XING, Z.; et al. Pharmacological effects of natural Ganoderma and its extracts on neurological diseases: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1160–1178, 2019. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018344799>
ZHU, X.; CHEN, X.; XIE, J.; WANG, P.; SU, W. Mechanochemical-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* spores. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 927–932, 2012.

REIVINDICAÇÕES

1. PROCESSO PARA ROMPIMENTO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* E OBTENÇÃO DE PRODUTOS PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS E ESPERMATOZOIDES, caraterizado por ser realizado pelas etapas de:
   I- Rompimento das paredes dos esporos secos por cisalhamento com auxílio de esferas e separação das esferas
   II- Diluição dos esporos rompidos em meio aquoso
   III- Extração de biomoléculas dos esporos rompidos em meio aquoso
   IV- Centrifugação e obtenção do Produto 1 (sobrenadante)
   V- Rompimento adicional das paredes dos esporos processados previamente conforme as etapas I – II, por micro-ondas, seguido da repetição das etapas III - IV
   VI- Suspensão dos sólidos insolúveis em meio aquoso
   VII- Extração de biomoléculas em meio aquoso a temperatura elevada
   VIII- Centrifugação
   IX- Após realização de três ciclos sequenciais de extração conforme etapas VI a VIII, mistura dos sobrenadantes a uma fração do Produto 1
   X- Diálise
   XI- Liofilização e obtenção do Produto 2

2. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa I pela maceração com auxílio de esferas de aço/cromo de 0,1 mm, na proporção de 0,1 a 1,6 g de esferas/g de esporos, por tempo entre 5 e 20 min, e subsequente separação das esferas com peneira do tipo tamis com auxílio de ímã.

3. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa II pela suspensão dos esporos rompidos em água ou solução salina fisiológica em proporção de 1:10 a 1:20 (m/v).
4. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa III pela incubação da suspensão aquosa contendo os esporos rompidos durante 24 a 48 h com agitação entre 100 e 300 rpm, a uma temperatura entre 20 e 32 °C, para extração de biomoléculas.
5. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa IV a uma velocidade entre 3000 e 8000 *g* durante 5 a 15 min para separação do sobrenadante, obtendo-se o Produto 1.
6. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa V utilizando micro-ondas a uma potência entre 900 e 1200 W por 5 a 15 min.
7. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa VI pela suspensão dos sólidos insolúveis em água ou solução salina fisiológica em proporção de 1:20 a 1:100 (m/v).
8. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa VII pela incubação da suspensão a uma temperatura entre 50 e 100ºC, por tempo entre 1 e 3 h.
9. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa VIII a uma velocidade entre 3000 e 8000 *g* por 5 a 15 min, de modo a separar o sobrenadante dos sólidos insolúveis.
10. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa IX pela mistura dos sobrenadantes obtidos nos três ciclos de extração conforme etapas VI a VIII, em proporção de 1:1 a 2:1 (sobrenadante: produto 1, v/v).

11. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa X pela diálise da fração líquida obtida na etapa IX com membrana de 14 a 12 kDa em água ultrapura por tempo entre 20 e 30 h a temperatura ambiente.
12. PROCESSO de acordo com a reivindicação 1, caraterizado pela realização da etapa XI utilizando-se o eluído da membrana de diálise para liofilização durante 20 – 30 h, obtendo-se o Produto 2.
13. PRODUTO 1 PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS, obtido de acordo com processo tal qual reivindicação 1, caraterizado por conter as moléculas bioativas ramnose, xilose, manose, glucose, galactose e proteínas entre 10 e 225 kDa obtidas dos esporos de *G. lucidum.*
14. PRODUTO de acordo com a reivindicação 13, caraterizado por conter glucanas em concentração entre 60 e 80 % (m/m) em relação aos monossacarídeos totais.
15. PRODUTO de acordo com as reivindicações 13 e 14, caracterizado por apresentar efeito, em concentrações entre 100 e 50% de produto 1, de atividade de incremento em parâmetros reprodutivos de sobrevivência e diâmetro folicular de oócitos em tecido ovariano.
16. PRODUTO 2 PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE ESPERMATOZOIDES, obtido de acordo com processo tal qual reivindicação 1, caraterizado por conter as moléculas bioativas glucose, manose, galactose e arabinose obtidas dos esporos de *G. lucidum*.
17. PRODUTO de acordo com a reivindicação 16, caraterizado por conter glucanas em concentração entre 50 e 80% (m/m) em relação aos monossacarídeos totais.
18. PRODUTO de acordo com as reivindicações 16 e 17, caraterizado por apresentar atividade antioxidante de modo a conservar parâmetros reprodutivos de espermatozoides (viabilidade e integridade do DNA).

19. USO de Produto 1 descrito nas reivindicações de 13 a 15, caraterizado por compreender sua adição a meios de cultivo e soluções diluentes empregadas no resgate de oócitos em tecido ovariano.
20. USO de Produto 2 descrito nas reivindicações de 16 a 18, caraterizado por compreender sua adição a soluções diluentes, meios de criopreservação/vitrificação e descongelamento de espermatozoides, tecido testicular e tecidos relacionados.
21. USO de Produtos 1 e 2 descritos nas reivindicações de 13 a 18, bem como de suas misturas em quaisquer proporções, caraterizado por compreender adição a meios de cultivo *in vitro,* soluções de criopreservação/vitrificação e descongelamento de células reprodutivas e tecidos relacionados.

Figuras

Figura 1

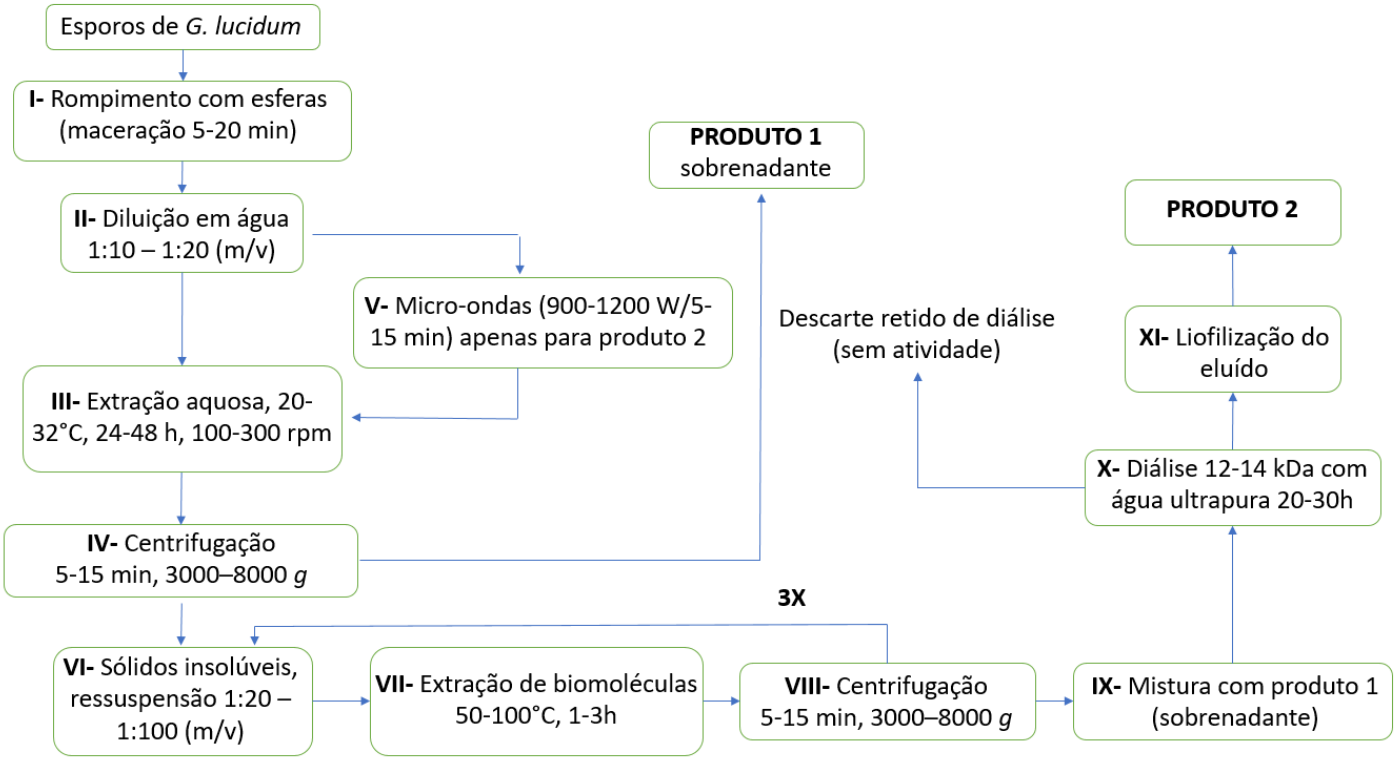


Figura 2

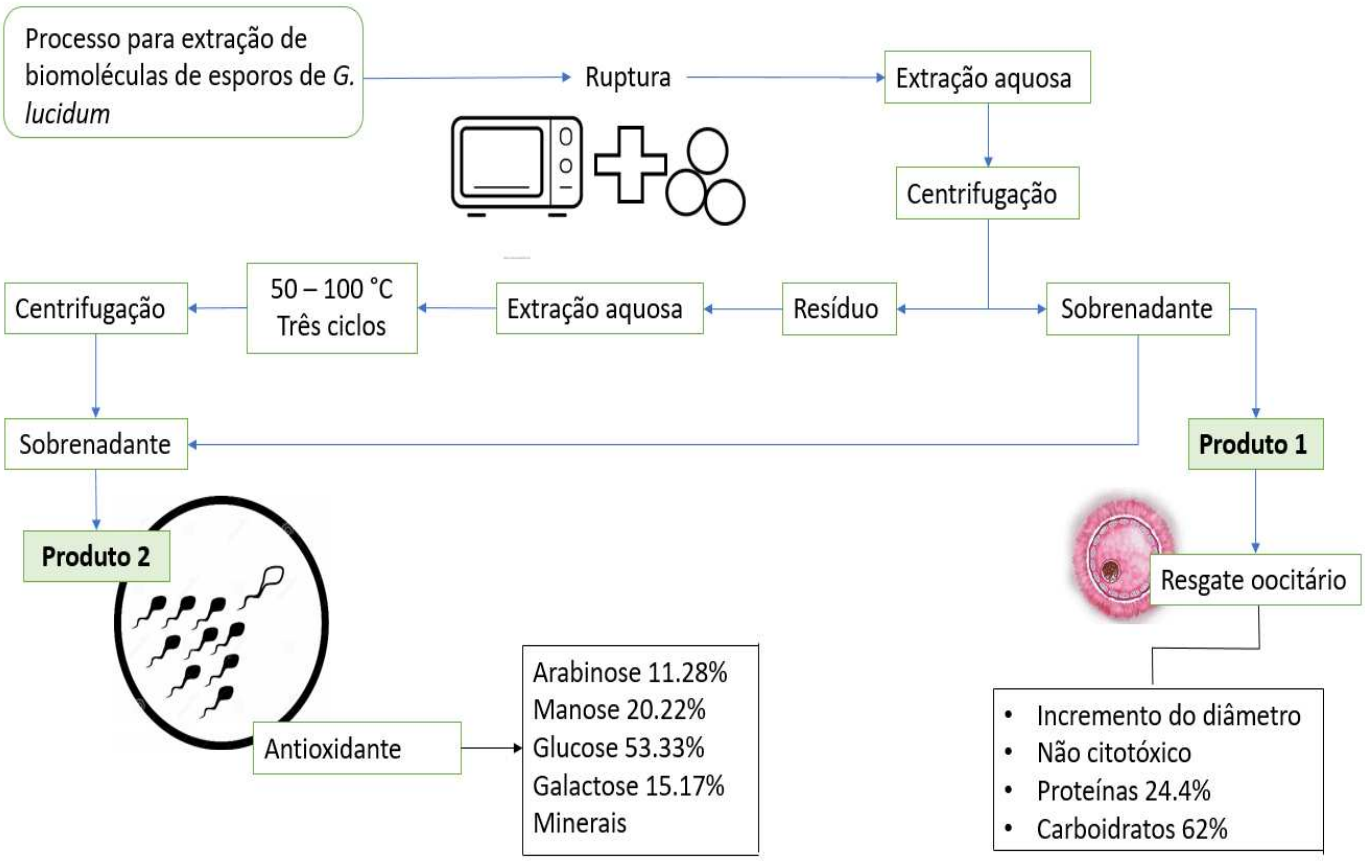

Processo para extração de biomoléculas de esporos de *G. lucidum*
Ruptura
Extração aquosa
Centrifugação
Sobrenadante
Resíduo
Extração aquosa
50 – 100 °C
Três ciclos
Centrifugação
Sobrenadante
Produto 1
Resgate oocitário
• Incremento do diâmetro
• Não citotóxico
• Proteínas 24.4%
• Carboidratos 62%
Produto 2
Antioxidante
Arabinose 11.28%
Manose 20.22%
Glucose 53.33%
Galactose 15.17%
Minerais

Figura 3

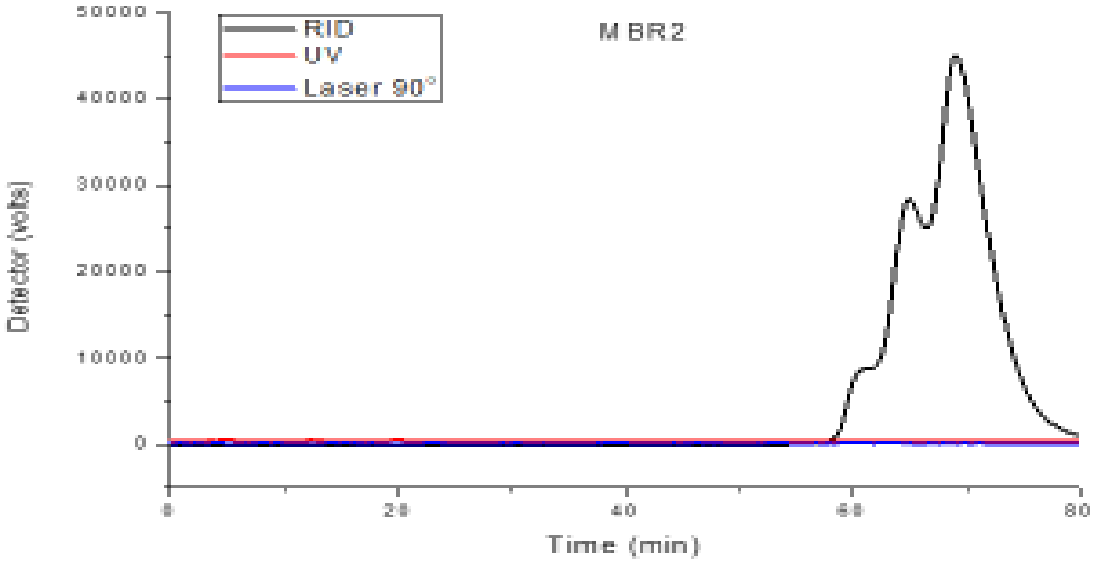

RID
UV
Laser 90°
M BR2
50000
40000
30000
20000
10000
0
Detector (volts)
0
20
40
60
80
Time (min)

Figura 4

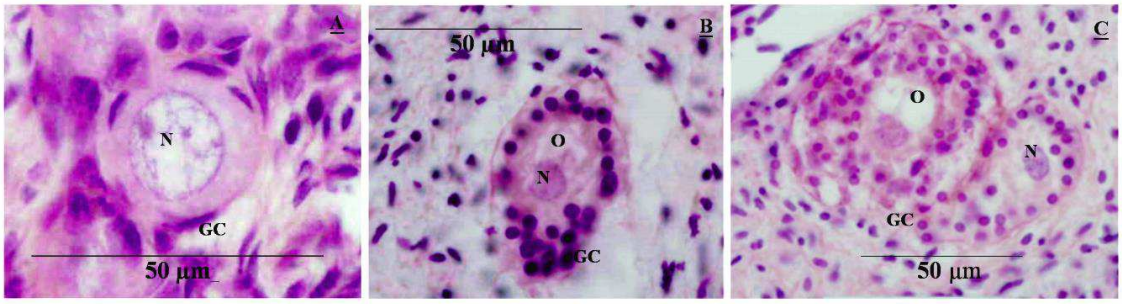
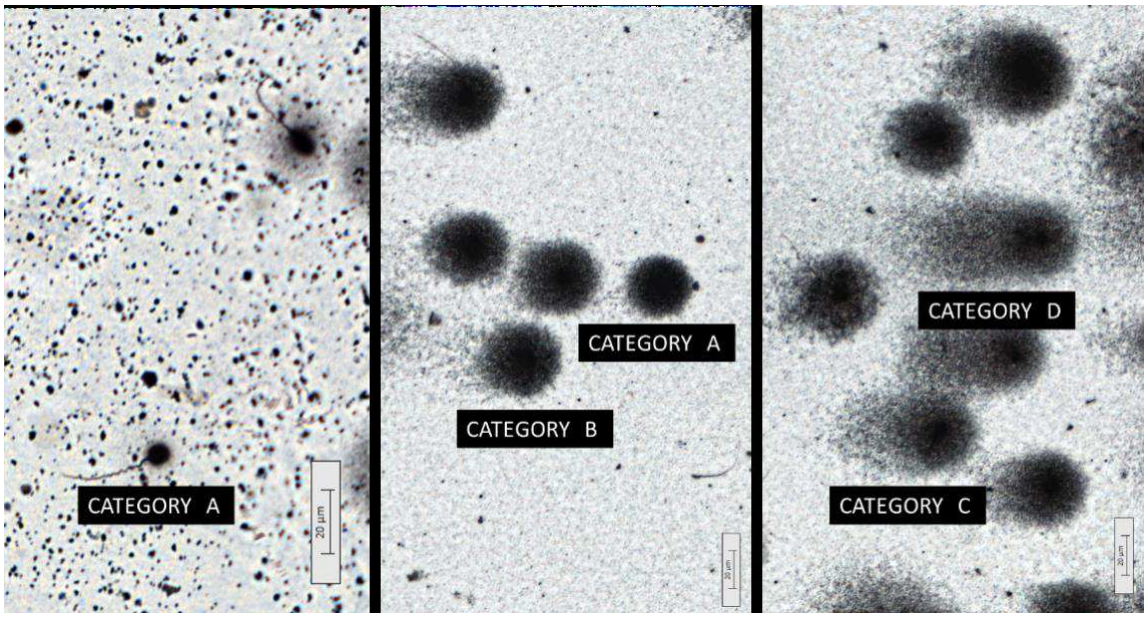


Figura 5



RESUMO

PROCESSO PARA ROMPIMENTO DE ESPOROS DE *Ganoderma lucidum* E OBTENÇÃO DE PRODUTOS PARA CONSERVAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS E ESPERMATOZOIDES

Esta invenção descreve um processo de ruptura de esporos de *Ganoderma lucidum* e a obtenção de dois produtos para conservação *in vitro* de oócitos (produto 1) e espermatozoides (produto 2). Os produtos 1 e 2 possuem aplicação em cultivo *in vitro* de células reprodutivas, na conservação por criopreservação e vitrificação e no descongelamento como diluentes protegendo vários parâmetros reprodutivos como viabilidade celular, morfologia e maturação. O processo para obtenção dos bioativos compreende as etapas de rompimento dos esporos por cisalhamento e micro-ondas, extração em solução aquosa, centrifugação e conservação por liofilização. O produto 1 estimula o resgate de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano e o produto 2 incrementa a viabilidade e preserva o DNA em espermatozoides. Os produtos reivindicados na presente invenção não apresentam citotoxicidade e foram avaliados em ensaios de cultivo *in vitro*. As aplicações estão relacionadas com o melhoramento e a conservação das células reprodutivas em cultivos *in vitro*.