



**IPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL  
Assinado  
Digitalmente

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

CARTA PATENTE Nº BR 102016027923-2

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:** BR 102016027923-2

**(22) Data do Depósito:** 28/11/2016

**(43) Data da Publicação Nacional:** 12/06/2018

**(51) Classificação Internacional:** A61K 36/07; A61K 31/538; A61P 31/00.

**(54) Título:** PROCESSO DE CULTIVO DE FUNGOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS E USO DE UM EXTRATO DE PYCNOPORUS SANGUINEUS

**(73) Titular:** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 88648761000103. Endereço: RUA FRANCISCO GETÚLIO VARGAS, 1130, Caxias do Sul, RS, BRASIL(BR), 95070-560, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 92969856000198. Endereço: PRAÇA ARGENTINA S/Nº - PRÉDIO 11102 - CAMPUS CENTRAL, Porto Alegre, RS, BRASIL(BR), 90040-020, Brasileira

**(72) Inventor:** GABRIELA GAMBATO; ANDREZA FERRARI; MARISA DE CAMPOS SANTANA; ROSELEI CLAUDETE FONTANA; ELISEU RODRIGUES; MIRIAN SALVADOR; MARLI CAMASSOLA; LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA.

**Prazo de Validade:** 20 (vinte) anos contados a partir de 28/11/2016, observadas as condições legais

**Expedida em:** 08/03/2022

Assinado digitalmente por:

**Liane Elizabeth Caldeira Lage**

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

### **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

PROCESSO DE CULTIVO DE FUNGOS, PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS* E USO DE UM EXTRATO DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS*

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve um processo de cultivo de fungos, um processo de obtenção de um extrato de um fungo, e uso de tal extrato de um fungo. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, Bioquímica, Saúde e Medicina.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, sendo atualmente uma das principais causas de mortes no Brasil e no mundo, tanto em humanos como em outros animais.

**[0003]** O tratamento do câncer pode ser feito através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade. No entanto, existem diversos efeitos colaterais e as substâncias utilizadas apresentam efeito nocivo para células não tumorais. Nesse sentido, há a necessidade de busca de novas substâncias e/ou extratos que apresentem atividade antitumoral seletiva, mas que ao mesmo tempo não apresentem elevados custos de produção para tornar o acesso aos tratamentos mais acessíveis, e, contribuir assim, para a melhoria da qualidade de vida das pessoas e animais acometidos por cânceres.

**[0004]** Os macrofungos vêm sendo utilizados em terapias tradicionais orientais, e metabólitos fúngicos são cada vez mais utilizados para tratar uma ampla gama de doenças, pois alguns deles são ricos em compostos bioativos.

Entre estes compostos incluem-se polissacarídeos, proteínas (proteínas imunomoduladoras fúngicas, lectinas, glicoproteínas e proteínas não glicosiladas e peptídeos), complexos de polissacarídeo-proteína, componentes lipídicos (ergosterol), e os terpenoides, alcaloides, pequenos peptídeos e aminoácidos, nucleotídeos e nucleosídeos. Esta longa lista representa uma grande variedade de propriedades biológicas.

**[0005]** Na composição dos macrofungos existe uma série de compostos capazes de regular vias metabólicas e/ou fatores de transcrição associados a morte por apoptose, isto é, morte celular programada. Este tipo de morte celular é visto como estratégia importante no tratamento do câncer.

**[0006]** Um dos gargalos na extração de substâncias de plantas e fungos é a dificuldade de obter substâncias em elevadas concentrações e relativamente purificadas, sem a necessidade de processos onerosos.

**[0007]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema.

**[0008]** O *Pycnoporus sanguineus* é um fungo pertencente à família Polyporaceae, o qual é responsável pela podridão branca de madeiras. Este cogumelo é popularmente conhecido por “orelha-de-pau” e é facilmente encontrado em regiões tropicais e subtropicais e de fácil cultivo, podendo desenvolver-se tanto em plantas vivas como mortas. Este fungo é facilmente reconhecível por sua intensa cor laranja avermelhada. Produz cerca de sete pigmentos, sendo o antibiótico cinabarina um deles.

**[0009]** Existem estudos que indicaram que a cinabarina produzida pelo *P. sanguineus* apresenta atividade contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e vários *Streptococcus* spp., tendo atividade principalmente sobre

bactérias gram-positivas (Smânia *et al.* Rev. Microbiol. 26, 302-306, 1995; Smânia *et al.* J Chem Techn Biotechnol. 70, 57-59, 1997).

**[0010]** A toxicidade da cinabarina foi avaliada em um modelo animal pela administração intraperitoneal em camundongos, sendo que a maior concentração usada no trabalho (1000mg/kg) não foi suficiente para matar os animais e nenhuma alteração celular foi observada nos órgãos analisados (fígado e rins) (Smânia *et al.* Phytot Res. 17, 1069-1072, 2003).

**[0011]** O documento patentário US5262315A refere-se a um processo para a produção de vanilina. A cultura de um fungo basidiomiceto do gênero *Pycnoporus* ou os seus mutantes variantes são utilizados para converter um precursor benzenoide de vanilina, e a vanilina produzida por bioconversão é recuperada.

**[0012]** O documento EP 0947142B1 refere-se a um novo método para o cross-linking de uma proteína usando uma enzima. Mais particularmente, ele refere-se a um processo para a reticulação de proteínas utilizando uma oxidase multi-cobre, tal como a lacase ou bilirrubina oxidase produzida por *P. sanguineus*.

**[0013]** Além das propriedades antimicrobianas, *P. sanguineus* vêm sendo estudado devido a sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos e para produção de enzimas.

**[0014]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

### **Sumário da Invenção**

**[0015]** Dessa forma, a presente invenção vem resolver os problemas constantes no estado da técnica, a partir de fungos, preferencialmente *P. sanguineus*, e seus extratos que podem ser utilizados para tratar o câncer seletivamente.

**[0016]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de cultivo de fungos compreendendo a etapa de:

- Produção de macrofungos a partir de micélios em um meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose;

em que o meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose compreende de 85% a 95% em peso de materiais lignocelulósicos, 1% a 10% em peso de uma fonte de carboidratos e de 0,1% a 5% de sais alcalinos.

**[0017]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus* compreendendo as etapas de:

a) Cultivo em meio submerso ou em um meio em estado sólido, mais preferencialmente o dito meio em estado sólido rico em lignocelulose, de *Pycnoporus sanguineus*, formando micélios e/ou basidiomas;

b) Trituração e/ou moagem dos micélios e/ou basidiomas obtidos de acordo com a etapa a);

c) Extração hidroalcoólica do material obtido em b);

d) Desidratação da solução obtida em c).

**[0018]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* no preparo de um medicamento para tratar câncer seletivamente.

**[0019]** Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são os fungos, preferencialmente *P. sanguineus*, e seus extratos que podem ser utilizados para tratar o câncer seletivamente.

**[0020]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

### **Breve Descrição das Figuras**

**[0021]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente são apresentadas as presentes figuras:

**[0022]** A Figura 1 mostra os cromatogramas do extrato de *Pycnopus sanguineus*, evidenciando o elevado grau de pureza das duas formas de cinabarina, a cinabarina e o ácido cinabarínico.

**[0023]** A Figura 2 mostra as moléculas das substâncias detectadas no extrato de *Pycnopus sanguineus*.

**[0024]** A Figura 3 mostra o espectrograma de massa do composto ácido cinabarínico (Pico 1), espectro MS (3,54 min), espectro MS<sup>2</sup> do *m/z* 301 (modo positivo).

**[0025]** A Figura 4 mostra o espectrograma de massa do composto cinabarina (Pico 2), espectro MS (3,73 min), espectro MS<sup>2</sup> do *m/z* 287 (modo positivo).

**[0026]** A Figura 5 mostra o espectrograma de massa do composto não identificado (Pico 3), espectro MS (17,29 min) (modo positivo).

**[0027]** A Figura 6 mostra os espectros de UV dos picos 1 (ácido cinabarínico), 2 (cinabarina) e 3 (composto não identificado) do extrato de *Pycnopus sanguineus*.

**[0028]** A Figura 7 apresenta os dados de viabilidade celular (%) das linhagens tumorais de laringe (Hep-2) e controles não tumorais MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) e EA.hy926 (endotélio vascular humana) tratadas com o extrato de *Pycnopus sanguineus*.

**[0029]** A Figura 8 apresenta as fotografias mostrando alterações morfológicas observadas para a linhagem tumoral Hep-2 tratadas com *Pycnopus sanguineus*. Fotos de microscopia óptica realizada em microscópio invertido (100×).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0030]** A presente invenção revela a possibilidade de produção de micélio ricos em princípios bioativos, especialmente cinabarinas, tanto em

cultivos submersos em biorreator, como em cultivo em estado sólido empregando biomassas lignocelulósicas como matéria-prima. A produção de corpos de frutificação também pode ser realizada a partir dos cultivos em estado sólido.

**[0031]** Substâncias e extratos com atividade antitumoral seletiva podem ser obtidos de *P. sanguineus* cultivado em resíduos lignocelulósicos o que contribui para reduzir o impacto ambiental destes resíduos, bem como para reduzir os custos de produção destes extratos com propriedades antitumorais. Ainda, a presente invenção apresenta processo de obtenção de um extrato de cinabarinas de maneira simples e rápida, mas ao mesmo tempo com elevado grau de pureza.

**[0032]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta um processo de cultivo de fungos compreendendo a etapa de:

- Produção de macrofungos a partir de micélios em um meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose;

em que o meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose compreende de 85% a 95% em peso de materiais lignocelulósicos, 1% a 10% em peso de uma fonte de carboidratos e de 0,1% a 5% de sais alcalinos.

**[0033]** Em uma concretização, o material lignocelulósico é serragem. Em uma concretização, a fonte de carboidratos é farelo de arroz ou de milho. Em uma concretização, o sal básico é carbonato de cálcio.

**[0034]** Em uma concretização, o meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose compreende de 85% a 95% em peso de serragem, 1% a 10% em peso de farelo de arroz ou de milho e de 0,1% a 5% em peso de carbonato de cálcio.

**[0035]** Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus* compreendendo as etapas de:

a) Cultivo em meio submerso ou em um meio em estado sólido, mais preferencialmente o dito meio em estado sólido rico

em lignocelulose, de *Pycnoporus sanguineus*, formando micélios e/ou basidiomas;

- b) Trituração e/ou moagem dos micélios e/ou basidiomas obtidos de acordo com a etapa a);
- c) Extração hidroalcoólica do material obtido em b);
- d) Desidratação da solução obtida em c).

**[0036]** Em uma concretização, a etapa c) do processo de obtenção de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* compreende as etapas de:

- I) Solubilizar o material obtido na etapa b) com álcool 70%;
- II) Manter a solução da etapa I) em ebulição por 30 minutos, após, remover o sobrenadante e concentra-lo;
- III) Adicionar água ao resíduo da etapa II) e manter em ebulição por 1h;
- IV) Filtrar a solução da etapa III).

**[0037]** Em uma concretização, na etapa I) da extração hidroalcoólica a proporção mássica entre o material e o álcool 70% é de 1:30 até 1:50. Em uma concretização, na etapa III) da extração hidroalcoólica a proporção mássica entre o resíduo e a água é de 1:30 até 1:50.

**[0038]** Em uma concretização, a etapa d) de desidratação do processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus* ocorrer por liofilização.

**[0039]** Em uma concretização, etapa c) de extração hidroalcoólica do processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus* compreende caldos do cultivo da etapa a).

**[0040]** Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta um uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* no preparo de um medicamento para tratar câncer seletivamente.

**[0041]** Em uma concretização, o uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* é no preparo de um medicamento para tratar câncer de laringe.

**[0042]** Em uma concretização, o dito extrato de *Pycnoporus sanguineus* é obtido pelo dito processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus*.



**[0043]** Em uma concretização, o dito extrato compreende de 90% a 100% em peso de cinabarina, mais preferencialmente pelo menos 95% em peso de cinabarina.

**[0044]** Preferencialmente, a obtenção do extrato é por extração sólido-líquido, mas não limitada ao mesmo, podendo incluir outros processos como maceração, infusão e decocção.

**[0045]** Preferencialmente, o solvente usado é uma mistura de etanol e água, mas não limitado ao mesmo, podendo ser utilizados outros, incluindo metanol e outros solventes de menor polaridade.

**[0046]** Preferencialmente, o processo de obtenção do extrato compreende o uso de micélio e basidiomas, porém não limitado ao mesmo, podendo ser utilizado caldos de cultivo da produção de micélios de *P. sanguineus*.

**[0047]** O processo de obtenção de micélio e corpos de frutificação em meios submersos e em estado sólido, empregando resíduos regionais são alternativas para aos processos conhecidos, pois torna a produção mais econômica e possibilita a utilização de substratos que estão disponíveis em diferentes regiões geográficas.

**[0048]** Na presente invenção entende-se o termo “cinabarina” como suas formas ativas de cinabarina e ácido cinabarínico.

**[0049]** As descrições que seguem são apresentadas a título de exemplo e não limitativas ao escopo da invenção e farão compreender de forma mais clara o objeto do presente pedido de patente.

### **Exemplo – Concretizações**

#### **Produção de micélio e corpos de frutificação (macrofungos ou basidiomas)**

##### **Cultivo em meio líquido**

**[0050]** Para o cultivo de *P. sanguineus* em meio líquido foi preparada uma solução de pré-inóculo de acordo com a tabela 1, em que 95% do pré-

inóculo era meio caldo de batata e 5% do pré-inóculo era solução mineral. Após, foram transferidos 5 (cinco) discos das linhagens do fungo *P. sanguineus*, com 1,5 cm de diâmetro, para os frascos Erlenmeyer contendo o pré-inóculo, previamente esterilizados por 20 minutos em autoclave. Os frascos foram mantidos em agitação recíproca de 180 rpm a  $28 \pm 2$  °C por 5 dias, formando o inóculo de *P. sanguineus*.

**[0051]** Após o preparo do inóculo, utilizou-se um biorreator de mistura completa (New Brunswick, modelo BioFlo®/Cellingen® 115), com volume útil de 10 litros para o cultivo em meio líquido. Para um volume operacional de 5 litros, utilizou-se 1 litro de inóculo.

**[0052]** Os cultivos foram mantidos em uma temperatura de 28 °C, em uma frequência do agitador de 200 a 400 rpm e em uma taxa de aeração de 0,5 a 2 vvm. O pH não foi controlado, no entanto ele foi analisado diariamente. O O<sub>2</sub> dissolvido no caldo de cultivo foi mantido em valores acima de 30% da saturação.

**Tabela 1.** Composição do pré-inóculo e do cultivo submerso

<b>Composição do pré-inóculo</b>			
<b>Meio caldo de batata</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Solução Mineral*</b>	<b>Composição (% m/v)</b>
Caldo de batata	100 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Glicose	20 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4
H <sub>2</sub> O (q.s.p)	1000 mL	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
		Ureia	0,3
		CaCl <sub>2</sub>	0,4
		MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,00156
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,005
		ZnSO <sub>4</sub>	0,0014
		CoCl <sub>2</sub>	0,002
		H <sub>2</sub> O (q.s.p)	100 mL

\*Solução mineral concentrada dez vezes (10x) com nutrientes e micronutrientes, conforme proposta por Mandels & Reese (1957). A solução foi armazenada a 4°C

### Cultivo em Meio Sólido

**[0053]** Para a produção de basidiomas de *P. sanguineus* os micélios foram repicados em uma placa contendo o Meio Ágar Serragem de Pinus spp. (MM) e incubados a 24 °C por 7 a 10 dias.

**[0054]** Após o desenvolvimento do micélio sobre toda a placa, as culturas foram utilizadas para inocular os sacos para a produção dos macrofungos, devidamente esterilizadas, contendo o meio de cultivo de acordo com a tabela 3. Os sacos foram mantidos a temperatura de  $28 \pm 5$  °C, por aproximadamente 45 dias, até a colonização de todo o substrato. Após, os sacos foram mantidos em local com temperatura em torno de  $28 \pm 5$  °C e umidade necessária para o desenvolvimento do basidioma dos macrofungos.

Tabela 2.

<b>Meio Ágar Serragem de Pinus spp. (MM)</b>	<b>Composição (% m/v)</b>
Serragem de Pinus spp	2
Farelo de trigo	2
CaCO <sub>3</sub>	0,2
Ágar-ágar	2
H <sub>2</sub> O (q.s.p)	100 ml

**Tabela 3.** Composição (% m/v) dos meios de cultivo em estado sólido.

<b>Cultivo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>Serragens</b>	50	50	70				40	95	
<b>Casca de Arroz</b>			50	50		70	40		95
<b>Bagaço de maçã</b>	45			45					
<b>Resíduo de Uva</b>	45			45					
<b>Polietileno</b>		25			25	15			
<b>Farelo de trigo</b>	4	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1

### **Processo de Obtenção de Extratos de *P. sanguineus***

#### **Obtenção dos extratos aquosos através do micélio de *Pycnoporus sanguineus* cultivado em meio líquido**

**[0055]** Para obtenção dos extratos, a biomassa obtida depois do cultivo no biorreator foi centrifugada, e liofilizada por um aparelho Labconco Liofilizador de Bancada FreeZone 2,5L. O material liofilizado foi triturado em cadinho de porcelana e acondicionado em recipientes fechados e armazenado à temperatura ambiente.

**[0056]** Para a preparação dos extratos aquosos de *P. sanguineus*, foram utilizados 10 mL de água destilada para cada 0,5 g da biomassa triturada. As misturas foram homogeneizadas em agitador magnético durante 30 minutos a 28 °C e centrifugada a 5400 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes resultantes foram coletados obtendo-se assim os extratos na concentração de 5% (m/v). Após, os extratos foram armazenados em recipientes adequados, acondicionados em ultrafreezer com temperatura de -80 °C para posterior liofilização. A partir dos extratos liofilizados foram preparadas, por diluição, as demais concentrações para os ensaios antitumorais.

#### **Obtenção dos extratos a partir dos basidiomas de *Pycnoporus sanguineus***

**[0057]** Os basidiomas de *P. sanguineus* (Agaricomycetes) foram inicialmente desidratados a 60 °C até apresentarem massa constante. Após, os basidiomas foram triturados em moinho de facas até a obtenção de uma quantidade suficiente para preparar os extratos (55 g de pó seco). A extração a 10% foi realizada sobre refluxo, utilizando-se 2,75 L de etanol 70% a 90 °C por 30 minutos. A separação da amostra foi realizada por filtração simples.

**[0058]** Após, foi feita uma nova extração com água destilada (2,75 L), utilizando o resíduo da primeira filtração, a 100 °C, durante 1 hora. A amostra foi então separada por filtração simples. Os filtrados foram secos em rotavapor, as frações foram misturadas, armazenadas em -80 °C, liofilizadas e então

armazenadas ao abrigo da luz, dando um rendimento de 25% (14 g de extrato seco).

#### Análise dos extratos

**[0059]** Os extratos foram dissolvidos em metanol:MTBE (50:50, v/v) e filtrados em membrana PTFE de 0,22  $\mu\text{m}$ . Os compostos foram separados em uma coluna C30 YMC (5  $\mu\text{m}$ , 250 mm x 4,6 mm) utilizando como fase móvel um gradiente linear de MeOH:MTBE. O fluxo da fase móvel foi de 0,9 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada para 29 °C. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados entre 280 e 429 nm. Após a saída do detector DAD um divisor de fluxo permitiu a entrada de 0,45 mL/min no MS. Os espectros de massas foram adquiridos com um scan range de m/z 100 a 800. Os parâmetros do MS foram os seguintes: fonte ESI no modo de ionização positivo; voltagem do capilar: 3000 V, temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>): 310 °C, fluxo: 5 L/min, nebulizador: 30 psi; fragmentação no modo automático e energia de fragmentação MS<sup>2</sup>: 35 eV.

**[0060]** Os extratos obtidos a partir de micélios e de basidiomas de *P. sanguineus* são ricos em cinabarinas e com elevado grau de pureza (acima de 95%) (Tabela 4 e Figuras 1 a 5).

**[0061]** A obtenção de extrato com estes teores de cinabarina é relevante e inédita na área. O referido composto pode, portanto, ser facilmente obtido a partir de micélios e de corpos de frutificação do macrofungo, empregando materiais lignocelulósicos como matéria-prima o que reduz os custos dos processos de produção do fungo e de seus metabólitos.

**[0062]** Destaca-se que todos os extratos obtidos de *P. sanguineus* apresentaram importante teor de polifenóis e atividade antioxidante, destacando-se os extratos obtidos a partir dos basidiomas (Tabela 5).

#### Atividade Antitumoral

**[0063]** Para avaliar a viabilidade celular utilizou-se o ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cristais de

formazam. Neste ensaio, 100 µL do inóculo de  $1 \times 10^5$  cél/mL de cada linhagem foi adicionado às placas de 96 poços. Após total aderência, as soluções testes dos extratos foram adicionadas e deixadas em tratamento por 24 h. Após, os tratamentos foram aspirados e foi adicionada a solução de MTT, após 3 h os cristais formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplacas. A viabilidade foi calculada considerando o controle como 100% de viabilidade celular.

**[0064]** Conforme observado na Figura 7, o extrato de *P. sanguineus* foi avaliado frente às linhagens de células não tumorais endotelial EA.hy926 e pulmonar MRC5 e a linhagem tumoral de laringe Hep-2.

**[0065]** Observou-se que, após 24 h de tratamento com os extratos na concentração de 10 µg/mL, a linhagem Hep-2 apresentou  $47,15 \pm 2,48$  % de viabilidade enquanto que nesta mesma concentração a linhagem EA.hy926 apresentou  $82,18 \pm 1,38$  % e a linhagem MRC5 apresentou  $71,99 \pm 3,40$  %. Verificando-se, portanto, que linhagem tumoral Hep-2 apresentou menor viabilidade em comparação as linhagens não tumorais EA.hy926 e MCR5 (Figura 7). Além da redução da viabilidade na linhagem tumoral, também foram observadas alterações morfológicas características de morte celular, as quais não foram observadas nas linhagens não tumorais (Figura 8).

**Tabela 4.** Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos encontrados no extrato de *Pycnopus sanguineus*. obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>.

Pico <sup>a</sup>	Composto	t <sub>R</sub> (min) <sup>b</sup>	λ máx (nm) <sup>c</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	MS <sup>2</sup> (+)
1	Ácido cinabaránico	3,54	428 / 445	301,3930	237,3685
2	Cinabarina	3,73	429 / 443	287,3114	225,2841 – 241,2851
3	Não identificado	17,29	271 / 281	-	-

<sup>a</sup> Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 1.

<sup>b</sup> Tempo de retenção de uma coluna C30.

<sup>c</sup> Solvente: gradiente de MeOH/MTBE.

**Tabela 5** - Rendimento, conteúdo de polifenóis totais, inibição do radical livre difenilpicril hidrazil (DPPH) para os extratos secos dos micélios e basidiomas de *Pycnoporus sanguineus*.

	<b>Rendimento (%)</b>	<b>DPPH (IC<sub>50</sub><sup>\$</sup>)</b> <b>mg/mL</b>	<b>Polifenóis Totais</b> <b>(mg/mL)*</b>
<b>Micélio</b>	32,02	7,9± 0,03	26,93 ± 1,99
<b>Basidioma</b>	25,31	13,98 ± 0,78	31,24 ± 1,46

\*Polifenóis totais expressos em equivalentes de ácido gálico

\$ Concentração necessária para inibir 50% do radical livre DPPH

**[0066]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### **Reivindicações**

1. Processo de cultivo de fungos **caracterizado por** compreender a etapa de:

- produção de macrofungos a partir de micélios em um meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose;

em que o meio de cultivo em estado sólido rico em lignocelulose compreende de 85% a 95% em peso de serragem, 1% a 10% em peso de farelo de arroz ou de milho e de 0,1% a 5% de carbonato de cálcio; e

em que o dito fungo é do gênero *Pycnoporus*, *opcionalmente Pycnoporus sanguineus*.

2. Processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus* **caracterizado por** compreender as etapas de:

a) Cultivo em meio submerso ou em meio em estado sólido rico em lignocelulose, conforme definido na reivindicação 1, mais preferencialmente um meio em estado sólido de *Pycnoporus sanguineus*, formando micélios e/ou basidiomas;

b) Trituração e/ou moagem dos micélios e/ou basidiomas obtidos de acordo com a etapa a);

c) Mistura da biomassa obtida em b) em água destilada e centrifugação;

d) Coleta do sobrenadante obtido em c);

e) Desidratação do produto obtido em d) até massa constante;

f) Trituração e/ou moagem dos micélios e/ou basidiomas obtidos de acordo com a etapa e);

g) Extração hidroalcolica do material obtido em f);

h) Desidratação da solução obtida em g).

3. Processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** etapa c) compreender as etapas de:



- I) Solubilizar o material obtido na etapa b) com álcool 70%;
- II) Manter a solução da etapa I) em ebulição por 30 minutos, após, remover o sobrenadante e concentra-lo;
- III) Adicionar água ao resíduo da etapa II) e manter em ebulição por 1h;
- IV) Filtrar a solução da etapa III).

4. Processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** etapa h) de desidratação ocorrer por liofilização.

5. Processo de obtenção de extrato de *Pycnoporus sanguineus*, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado pela** etapa g) de extração hidroalcolica compreender caldos do cultivo da etapa a).

6. Uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus*, obtido por um processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 5, **caracterizado por** ser no preparo de um medicamento para tratar câncer seletivamente.

7. Uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus*, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado por** ser no preparo de um medicamento para tratar câncer de laringe.

8. Uso de um extrato de *Pycnoporus sanguineus*, de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 7, **caracterizado pelo** extrato compreender de 90% a 100% em peso de cinabarina, mais preferencialmente pelo menos 95% em peso de cinabarina.

## FIGURAS

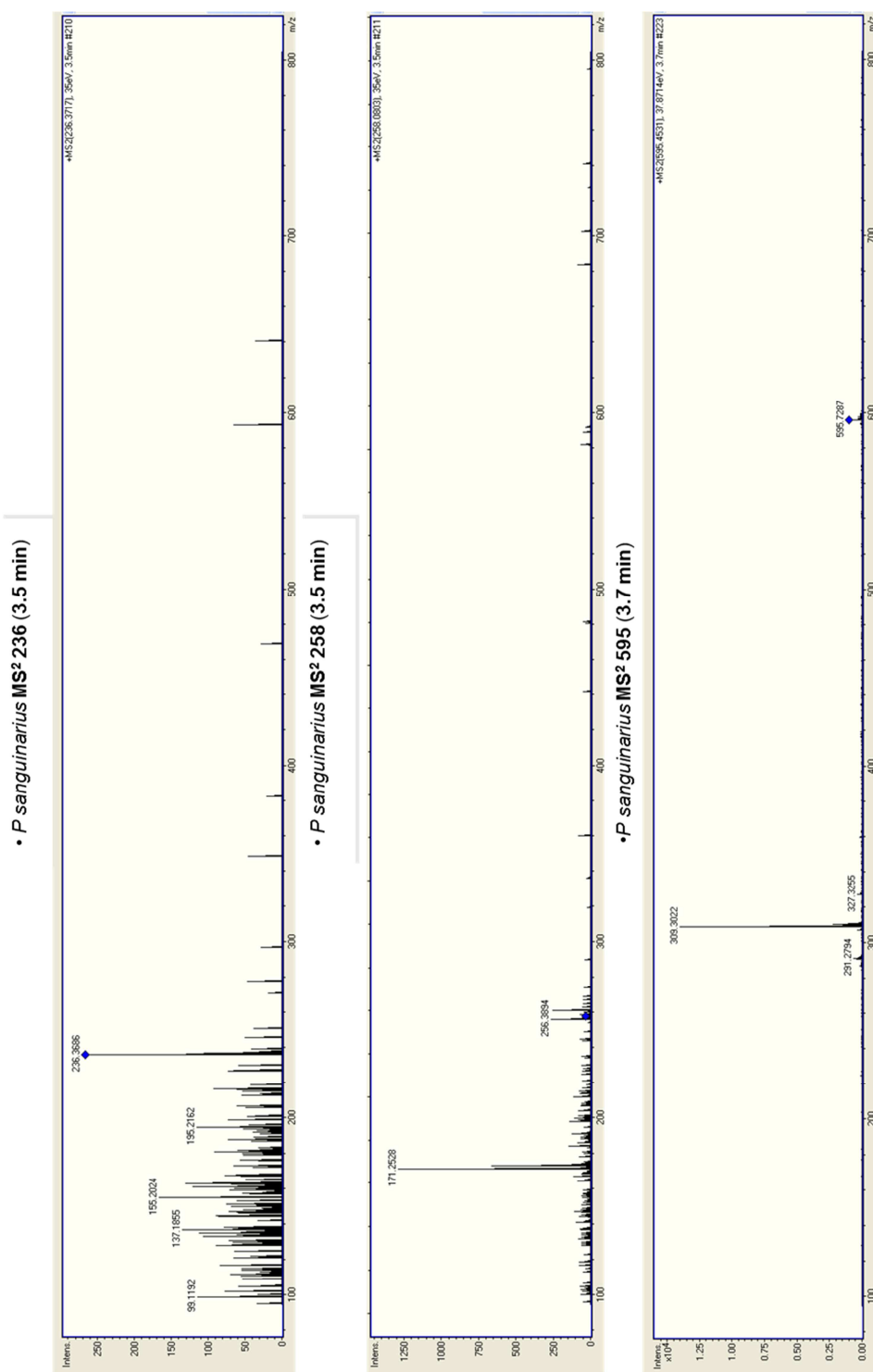


Figura 1

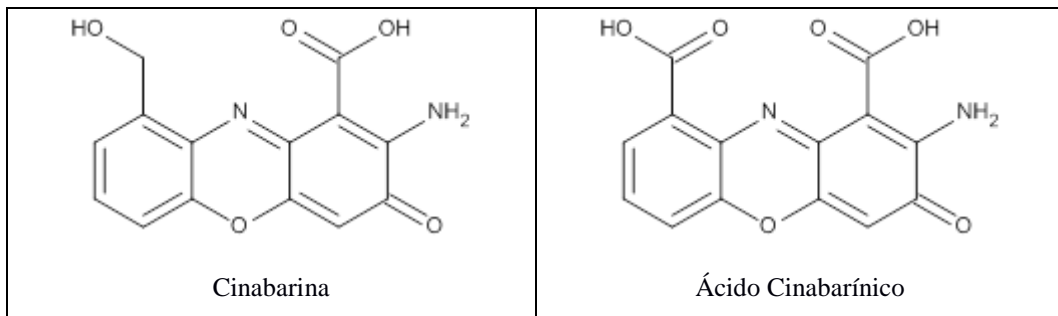


Figura 2

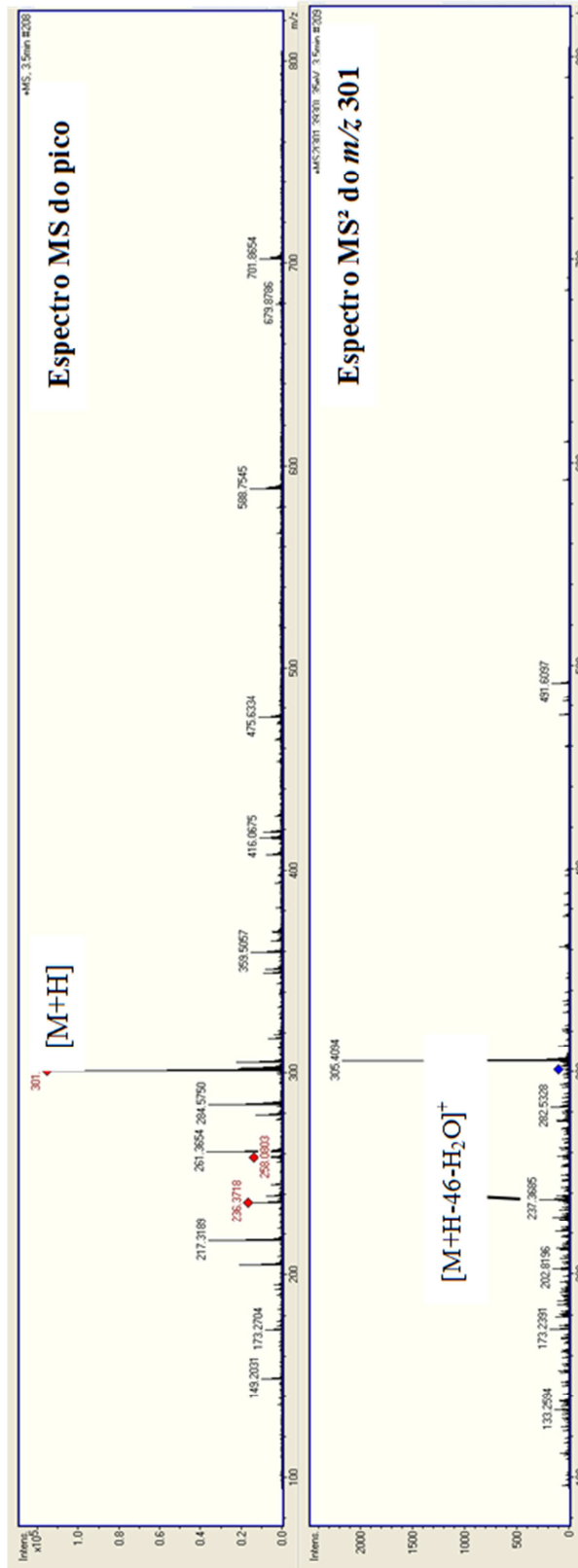


Figura 3

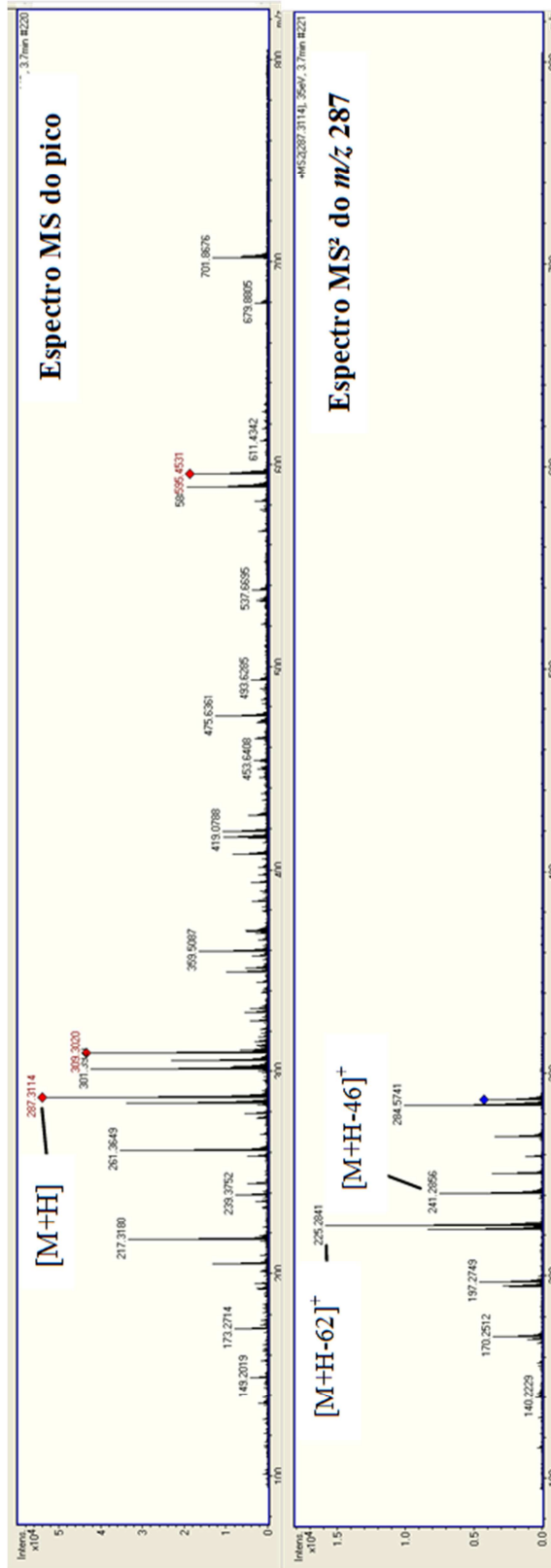


Figura 4

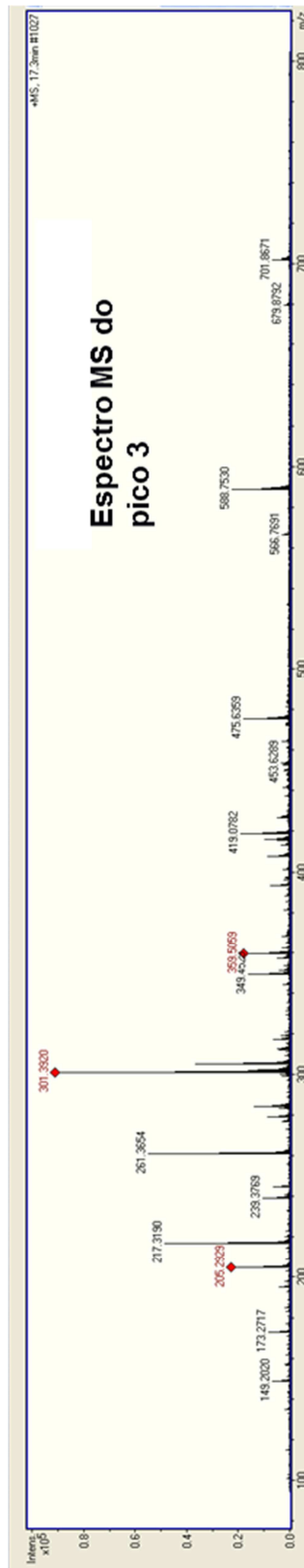


Figura 5

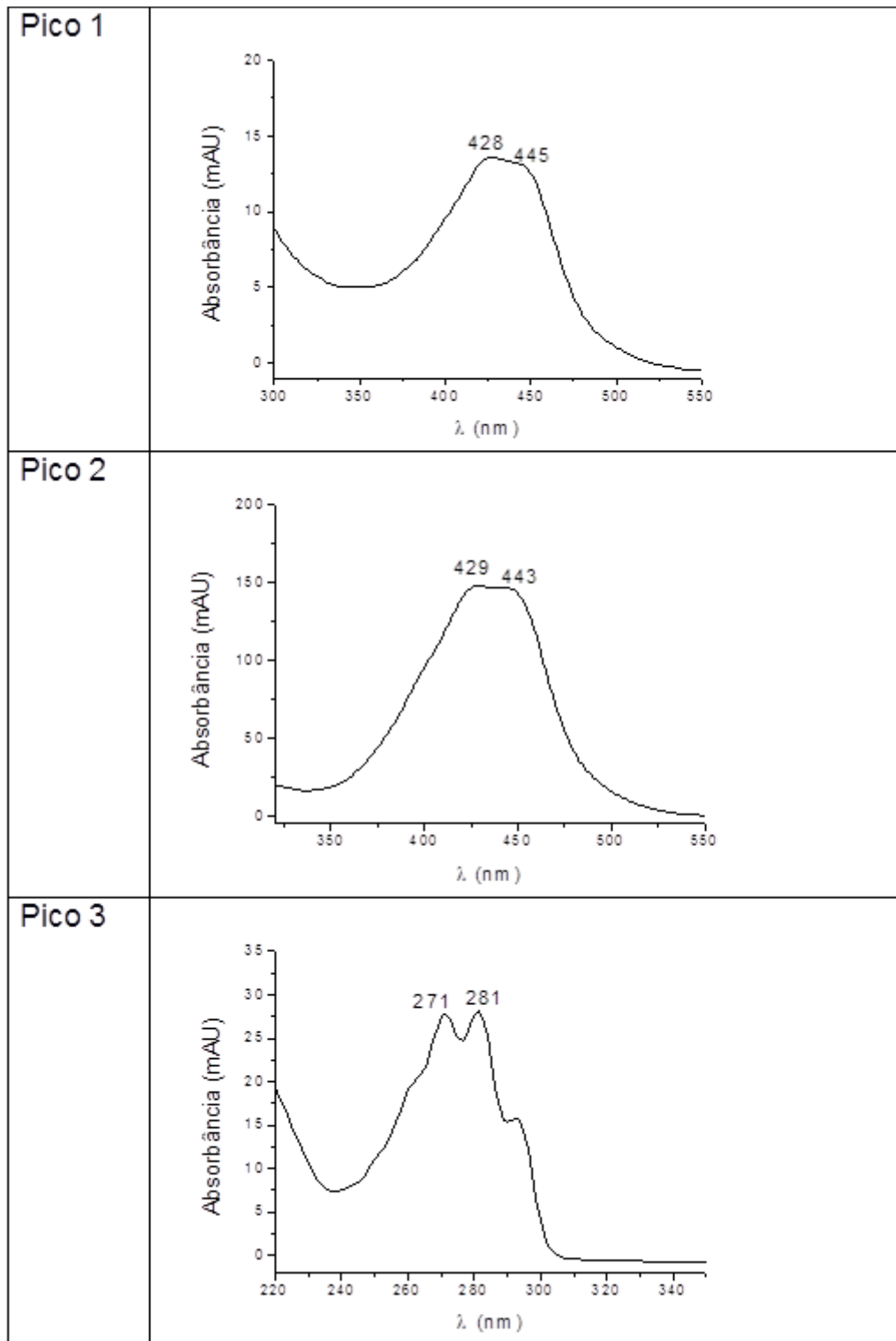


Figura 6

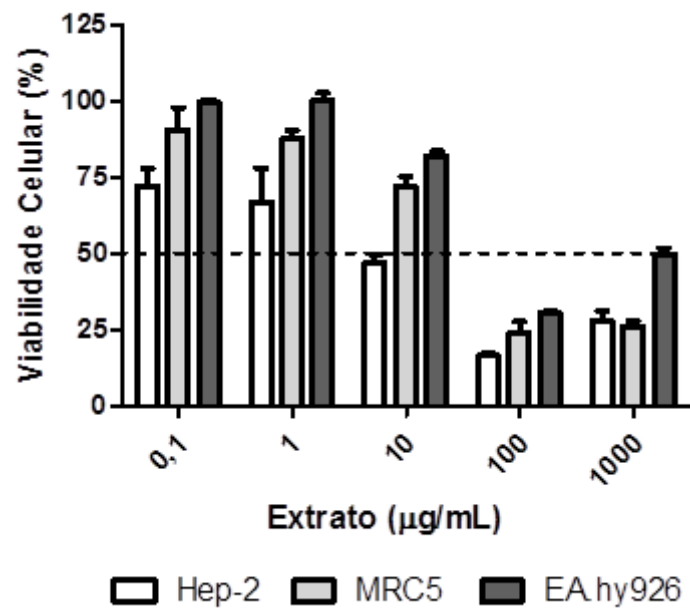


Figura 7

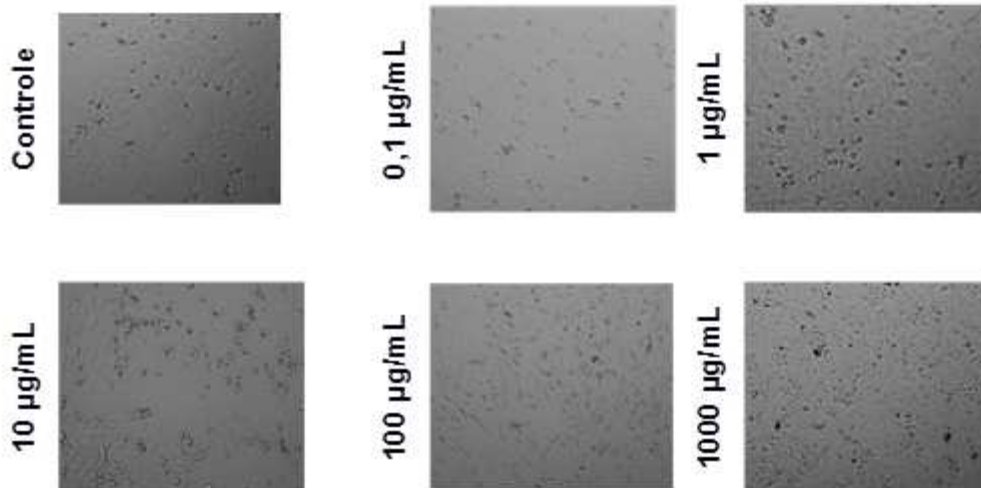


Figura 8