



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 102016027922-4 A2**

(22) **Data do Depósito:** 28/11/2016

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



(54) **Título:** USO DE UM COMPOSTO

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/538; C07D 265/38; A61P 3/06

(73) **Titular(es):** FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL, UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS

(72) **Inventor(es):** MAIZA CRISTINA VON DENTZ; GABRIELA GAMBATO; LETÍCIA OSÓRIO DA ROSA; ANDREZA FERRARI; ROSELEI CLAUDETE FONTANA; ELISEU RODRIGUES; MIRIAN SALVADOR; MATHEUS PARMEGIANI JAHN; MARLI CAMASSOLA

(74) **Procurador(es):** REMER VILLAÇA & NOGUEIRA ASSESSORIA E CONSULTORIA DE PROP. INTELECTUAL S/S LTDA.

(57) **Resumo:** A presente invenção descreve o uso de compostos (cinabarinas) na preparação de medicamentos para redução de índices de triglicérides e colesterol plasmáticos em mamíferos. Em uma concretização os compostos são obtidos de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* e/ou seus extratos. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, da Bioquímica, Saúde e Medicina.



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

### USO DE UM COMPOSTO

#### **Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve o uso de compostos (cinabarinas) na preparação de medicamentos para redução de índices de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em mamíferos. Em uma concretização os compostos são obtidos de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* e/ou seus extratos. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, da Bioquímica, Saúde e Medicina.

#### **Antecedentes da Invenção**

**[0002]** Aterosclerose é uma condição em que ocorre o acúmulo de placas de gordura, colesterol e outras substâncias nas paredes das artérias, o que restringe o fluxo sanguíneo e pode levar a graves complicações de saúde, principalmente a doenças coronarianas. Este acúmulo de gordura ocorre em decorrência de elevadas concentrações de triglicerídeos e colesterol sanguíneos.

**[0003]** Os triglicerídeos presentes no corpo podem ser adquiridos por meio da alimentação ou produzidos pelo próprio organismo no fígado. Os triglicerídeos são necessários, pois servem como reserva energética para os momentos de jejum prolongado ou alimentação insuficiente. Porém, o excesso de triglicerídeos no sangue está associado à deposição de gorduras nos vasos e aterosclerose, aumentando o risco de doenças cardiovasculares.

**[0004]** Os níveis de triglicerídeos podem se elevar por vários motivos. Algumas pessoas apresentam alterações genéticas que predispõem à hipertrigliceridemia, outras desenvolvem triglicerídeos altos secundariamente a uma dieta hipercalórica ou à presença de determinadas doenças. Níveis elevados de triglicerídeos também estão associados a um maior depósito de gorduras no fígado, provocando uma alteração conhecida como esteatose hepática.

**[0005]** O principal objetivo do tratamento da hipertrigliceridemia é reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Suplementos ricos em óleo de peixe (ômega 3) também são efetivos para redução da hipertrigliceridemia. Porém para haver efeito, as doses devem ser elevadas, acima de doses 3 gramas por dia de ácido eicosapentaenoico/ácido docosaenoico (EPA/DHA), o que significa pelo menos 4 cápsulas por dia. Alguns pacientes não toleram doses muito altas de óleo de peixe, apresentando diarreia e cólicas abdominais. Atualmente, os fibratos são drogas mais específicas para reduzir níveis de triglicerídeos, podendo alcançar reduções de até 70% em alguns casos. Estas drogas, porém, não agem sobre os valores de colesterol.

**[0006]** O aumento dos triglicerídeos pode ou não vir acompanhado de alterações no colesterol. As duas situações mais comuns são triglicerídeos e LDL (colesterol ruim) elevados ou triglicerídeos elevados e HDL (colesterol bom) baixo. A elevação isolada dos triglicerídeos, sem alterações do colesterol não é muito comum. Em diabéticos, é normal ocorrer incrementos nas concentrações de triglicerídeos.

**[0007]** O colesterol é encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. É um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos.

**[0008]** O termo hipercolesterolemia refere-se a níveis aumentados de colesterol na corrente sanguínea. Condições com elevadas concentrações de partículas LDL (lipoproteína de alta densidade) oxidadas, especialmente partículas LDL pequenas, estão associadas com a formação de ateromas nas paredes das artérias, que é a principal causa de doença coronariana cardíaca e outras formas de doença cardíaca.

**[0009]** O tratamento para níveis elevados de colesterol é atualmente realizado com o uso das estatinas. As estatinas são drogas muito eficazes para reduzir os níveis de colesterol do sangue e para diminuir a incidência de manifestações de doenças decorrentes da diminuição de perfusão de tecidos irrigados por artérias estreitadas pela arteriosclerose. No entanto, há uma série

riscos do uso das estatinas, entre os quais estão a elevação dos níveis de enzimas hepáticas, podendo haver ainda colestase, uma obstrução de vias biliares intra-hepáticas, que também obriga à suspensão da droga. A colestase se manifesta principalmente por icterícia e coceira. Para algumas pessoas, as estatinas, além da hepatite tóxica, podem causar falta de apetite, diarreia e vômitos. Também há efeitos colaterais como insônia, dores de cabeça, perda de memória, formigamentos e neurites. As estatinas podem diminuir a potência masculina e há relatos de incrementos em 200% nos casos de câncer de mama em mulheres que fazem uso desta droga em relação a mulheres que não utilizam. Mães, caso estejam tomando estatinas, não devem amamentar os filhos.

**[0010]** Devido aos diversos efeitos colaterais das drogas utilizadas para reduzir níveis de triglicerídeos e colesterol existe a necessidade de busca de novas substâncias e/ou extratos que apresentem atividade anti-hipertrigliceridêmica e anti-hipercolesterolêmica, 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 hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

**[0011]** 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.

**[0012]** Entre as estatinas, há a lovastatina, substância que foi isolada inicialmente do fungo *Aspergillus terreus*, e junto da mevastatina, foi uma das

primeiras estatinas obtidas no final dos anos 1970. Outros fungos também são capazes de produzir a lovastatina, como por exemplo o *Pleurotus ostreatus*, também conhecido como cogumelo ostra e utilizado na culinária.

**[0013]** Com reportado, na composição dos fungos existe uma série de compostos capazes de regular vias metabólicas e/ou fatores de transcrição capazes de interferir no metabolismo celular.

**[0014]** 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.

**[0015]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema.

**[0016]** Os fungos do gênero *Pycnoporus* pertencentes à família Polyporaceae, são responsáveis por realizar a podridão branca de madeiras. São chamados vulgarmente como "orelha-de-pau" e são facilmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais, 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.

**[0017]** 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).

**[0018]** A toxicidade da cinabarina foi avaliada em um modelo animal pela administração intraperitoneal em camundongos, sendo que a maior concentração usada no trabalho (1000 mg/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).

**[0019]** O artigo científico "Lipid-lowering effects of *Coriolus versicolor* extract in poloxamer 407-induced hypercholesterolaemic rats and high cholesterol-fed rats"(Hor S, Farsi YE, Yam MF, Nuyah NM, Asmawi MZ. Lipid-lowering effects of *Coriolus versicolor* extract in poloxamer 407-induced hypercholesterolaemic rats and high cholesterol-fed rats. J Med Plants Res. 2011;5:2261–2266) apresenta o uso do extrato aquoso de *Trametes versicolor* no tratamento de hipercolesterolemia induzida em camundongos, tendo como resultado a diminuição dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e colesterol de baixa densidade, porém, não antecipa nem indica o uso de extrato de *Pycnoporus sanguineus*, nem compreende cinabarina.

**[0020]** Patentes que empregam o *Pycnoporus* e seus metabólitos estão descritas. Uma delas é a CN104099304A, intitulada "Method for preparing laccase-containing fermentation broth by *Pycnoporus sanguineus*", mas esta invenção pertence ao campo da fermentação microbiana, e em particular refere-se a um método para a preparação de caldo de fermentação contendo lacase por *P. sanguineus*. O método compreende os passos como se segue: sob condições aeróbicas e no escuro, o fungo é cultivado num meio de fermentação estéril contendo uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e componentes inorgânicos, o meio de fermentação compreende farinha de milho, farelo de pó, tartarato de amônio, fosfato de monopotássio, sulfato de magnésio heptahidratado, succinato de sódio, sulfato de cobre penta-hidratado, hexa-hidrato de cloreto de potássio, um surfactante, um agente antiespumante e água. Apresenta como vantagens reprodutibilidade, elevadas atividades de lacase produzida, boa estabilidade de temperatura enzima, alta adaptabilidade pH e similares; e a lacase pode ser amplamente aplicado para os campos da degradação do corante, biobranqueamento, colagem de madeira, recuperação ecológica e semelhantes.

**[0021]** 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.

**[0022]** O documento EP 0947142B1 refere-se a um novo método para a cross-linking 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*.

**[0023]** A patente de invenção "Composição antimicrobiana que compreende uma oxidoreductase e um agente melhorador da-hydroxyanilide do tipo" WO2000027204A1, refere-se a uma composição enzimática capaz de matar ou inibir células microbianas ou microrganismos, por exemplo, na lavagem de roupa, em superfícies duras, em sistemas de água, na pele, nos dentes ou nas membranas mucosas, compreendendo um sistema de enzima de oxidação fenólica e um agente melhorador de fórmula. A presente invenção também se relaciona com a utilização da dita composição enzimática para a conservação de produtos alimentares, cosméticos, tintas, revestimentos etc.

**[0024]** Além das propriedades antimicrobianas, *P. sanguineus* vêm sendo estudado devido a sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos e para produção de enzimas.

**[0025]** Em relação à redução de triglicerídeos e colesterol existem diversas patentes para este fim. Entre as quais se destaca o documento patentário US20030166614A1, intitulado "Método para a redução do colesterol e triglicerídeos" que descreve um método de tratamento de níveis excessivos de lipídios no sangue em humanos. O tratamento inclui uma dose diária de suplementos alimentares disponíveis. Os suplementos são concentrados de óleo de peixe, niacina e lecitina. Na forma de realização preferida, dois comprimidos de 500 mg de niacina, dois de 1200 mg de lecitina, e dois 1250

mg de concentrado de óleo de peixe são administrados oralmente, uma vez a duas vezes por dia.

**[0026]** A patente US4351835A - Método para impedir a deposição de gordura corporal em mamíferos, se trata de um método para reduzir a taxa de triglicerídeos no fígado e a síntese de deposição de gordura corporal em mamíferos mediante a administração oral durante um período prolongado de uma mistura terapêutica de quantidades eficazes de piruvato e a dihidroxiacetona, que pode ser adicionado à riboflavina. O método também tem o efeito de aumentar as capacidades de armazenamento de glicogênio de fígado.

**[0027]** O documento US7022713B2, intitulado "Agente terapêutico hiperlipêmico" relata a invenção de um agente terapêutico que compreende pitavastatinas e hiperlipemia ácido eicosapentaenóico ou derivado de um éster dos mesmos, como ingredientes eficazes. De acordo com o invento, um agente terapêutico tipo IIb e tipo IV tem um excelente efeito na redução do colesterol e triglicerídeos no sangue.

**[0028]** O método para reduzir o colesterol no sangue e/ou triglicerídeos no sangue reportado pela patente US6020383A consiste na administração de uma quantidade eficaz de terc-butil-hidroquinona ou um seu sal. Além disso, uma preparação de terc-butil-hidroquinona sob a forma de unidade de dosagem é fornecida para reduzir o colesterol no sangue e/ou triglicerídeos no sangue. A preparação é vantajosamente concebida para administração oral.

**[0029]** O documento patentário US5958417A, Combinações de ervas, descreve o uso de preparações de ervas que têm atividade substancial reconhecida na melhoria da função circulatória e que têm efeitos reconhecidos na promoção da motilidade do intestino. Particularmente combinações preferidas foram selecionadas a partir dos seguintes ervas: Crataegus, Ho Shou Wu, crisântemo, folha de lótus, Alisma e Hu-Zhang, Cassia sementes, e ruibarbo.



**[0030]** 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.

**[0031]** Devido aos efeitos colaterais do uso de estatinas no tratamento de hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e esteatose hepática, aqui descritos, como hepatite tóxica, falta de apetite, diarreia, vômitos, insônia, dores de cabeça, perda de memória, formigamentos e neurites, é necessário o desenvolvimento de novos métodos de tratamento que sejam menos nocivos.

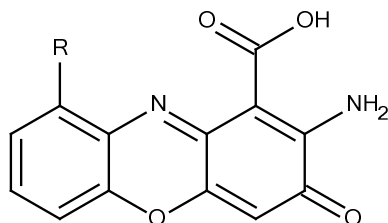
### **Sumário da Invenção**

**[0032]** Dessa forma, a presente invenção vem resolver os problemas constatados no estado da técnica, a partir do uso de compostos (cinabarinas) na preparação de medicamentos para redução de índices de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em mamíferos.

**[0033]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta o uso de um composto na preparação de um medicamento para:

- redução de gorduras no fígado de mamíferos; ou
- redução de índices de colesterol plasmático em mamíferos; ou
- redução de índices de triglicerídeos em mamíferos; ou
- combinações dos mesmos;

em que o composto possui a fórmula:



em que R é selecionado entre CHOH ou COOH.

**[0034]** 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**

**[0035]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes e figuras:

**[0036]** A figura 1 mostra o desenvolvimento de basidiomas em cultivo em estado sólido em meio com serragem de *Pinus* sp. suplementado com 4% (m/m) de farelo de trigo e 1% (m/m) de carbonato de cálcio. Figura 2.

**[0037]** A Figura 2 mostra as estruturas moléculares das cinabarinas presentes no extrato de *Pycnoporus sanguineus*.

**[0038]** A Figura 3 mostra os cromatogramas do extrato de *Pycnoporus sanguineus*, evidenciando o elevado grau de pureza das duas formas de cinabarina, a cinabarina e o ácido cinabarínico.

**[0039]** A Figura 4 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).

**[0040]** A Figura 5 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).

**[0041]** A Figura 6 mostra o espectrograma de massa do composto não identificado (Pico 3), espectro MS (17,29 min) (modo positivo).

**[0042]** A Figura 7 mostra os espectros de UV dos picos 1 (ácido cinabarínico), 2 (cinabarina) e 3 (composto não identificado) do extrato de *Pycnoporus sanguineus*.

**[0043]** A figura 8 mostra um gráfico da concentração de glicose em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos tratados por 30 dias com *Pycnoporus sanguineus* (Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento). Símbolos diferentes (\* e/ou #) indica diferença

estatística significativa dos grupos DBT em relação aos outros grupos ( $p < 0.05$ , Tukey).

**[0044]** A figura 9 mostra um gráfico da concentração de triglicerídeos em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos tratados por 30 dias com *Pycnopus sanguineus* (Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento). Símbolos diferentes (\* e/ou #) indica diferença estatística significativa dos grupos DBT em relação aos outros grupos ( $p < 0.05$ , Tukey).

**[0045]** A figura 10 mostra um gráfico da concentração de colesterol total em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos tratados por 30 dias com *Pycnopus sanguineus* (Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento). Símbolos diferentes (\* e/ou #) indica diferença estatística significativa dos grupos DBT em relação aos outros grupos ( $p < 0.05$ , Tukey).

**[0046]** A figura 11 mostra um gráfico da concentração de colesterol não HDL em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos tratados por 30 dias com *Pycnopus sanguineus* (Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento). Símbolos diferentes (\* e/ou #) indica diferença estatística significativa dos grupos DBT em relação aos outros grupos ( $p < 0.05$ , Tukey).

**[0047]** A figura 12 mostra um gráfico da concentração de colesterol HDL em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos tratados por 30 dias com *Pycnopus sanguineus* (Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0048]** A presente invenção revela a produção de micélios ricos em princípios bioativos (cinabarinas), em que os princípios bioativos são capazes de contribuir significativamente para a redução dos índices lipídicos (colesterol e triglicerídeos). O uso dos princípios ativos com propriedades anti-

hipertrigliceridêmicas e anti-hipercolesterolêmicas (redução de triglicerídeos e colesterol), com potencial para evitar e tratar esteatose hepática também são revelados.

**[0049]** A produção de micélios pode ser realizada tanto por cultivos submersos em biorreator, como por cultivos em estado sólido empregando biomassas lignocelulósicas como matéria-prima. A produção de corpos de frutificação também é realizada a partir dos cultivos em estado sólido.

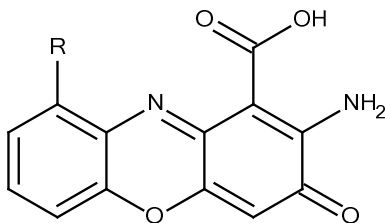
**[0050]** A utilização de corpos de frutificação e micélio de *P. sanguineus* e seus extratos para formulações compreendendo princípios ativos (cinabarinas) capazes de reduzir triglicerídeos e colesterol em curtos espaços de tratamento (em torno de um mês) é um objeto da presente invenção. Destaca-se que as reduções em triglicerídeos e colesterol total são significantes, sendo reduzidas a concentrações iguais a indivíduos normais. Destaca-se que a maior redução do colesterol foi de colesterol não HDL.

**[0051]** Este efeito também foi observado em ratos diabéticos apresentando, portanto, pode ser utilizada em formulações farmacêuticas para tratamento de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia.

**[0052]** Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta o uso de um composto na preparação de um medicamento para:

- redução de gorduras no fígado de mamíferos; ou
- redução de índices de colesterol plasmático em mamíferos; ou
- redução de índices de triglicerídeos em mamíferos; ou
- combinações dos mesmos;

em que o composto possui a fórmula:



em que R é selecionado entre CHOH ou COOH.

**[0053]** Em uma concretização, o uso é para preparação de um medicamento de hipertrigliceridemia.

**[0054]** Em uma concretização, o uso é para preparação de um medicamento de hipercolesterolemia.

**[0055]** Em uma concretização, o uso é para preparação de um medicamento para tratamento de esteatose hepática.

**[0056]** Em uma concretização, o medicamento é administrado por via oral, tópica ou parenteral. Em uma concretização, o medicamento é administrado por via oral.

**[0057]** Em uma concretização, o composto é obtido de corpos de frutificação e/ou micélio de *Pycnoporus sanguineus* e/ou seus extratos.

**[0058]** Em uma concretização, um processo de obtenção de micélio e corpos de frutificação em meios submersos e em estado sólido, empregando resíduos regionais é uma alternativa para aos processos conhecidos, pois torna a produção mais econômica e possibilita a utilização de substratos que estão disponíveis em diferentes regiões geográficas.

**[0059]** Em uma concretização, a presente invenção descreve a produção, extração e concentração e purificação de um extrato rico em cinabarinas e de extratos de macrofungos e micélios com propriedades anti-hipertrigliceridêmicas e anti-hipercolesterolêmicas.

**[0060]** Os princípios ativos produzidos pelo *Pycnoporus sanguineus* não apresentam os mesmos efeitos colaterais que as estatinas. Estes princípios ativos apresentam custos de produção mais baixos, e produção a partir de fungo cultivado em resíduos lignocelulósicos o que contribui para reduzir o impacto ambiental destes resíduos.

**[0061]** A presente invenção pode se apresentar em diferentes formas farmacêuticas, podendo ser utilizadas em diferentes vias de administração compreendendo as vias oral, tópica e injetável (parenteral).

**[0062]** Os ativos podem ser incorporados em formulações sólidas como granulados, cápsulas, drágeas e comprimidos preparadas com excipientes

inertes em diversas proporções. Dentre os excipientes pode ser utilizado o amido, a celulose, a lactose, o estearato de magnésio e o talco.

**[0063]** Também podem ser preparadas formulações líquidas ou semissólidas tais como xaropes, soluções, suspensões e elixires a base de sacarose, sorbitol, celulose, sacarina, óleos e água.

**[0064]** Diversas formulações farmacêuticas podem ser preparadas a partir da presente invenção, suas preparações sendo óbvias para um técnico no assunto.

**[0065]** No presente documento entende-se o termo “cinabarinas” como o composto cinabarina e o ácido cinabarínico.

### **Exemplos - Concretizações**

**[0066]** Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

#### **Processo de Cultivo**

**[0067]** 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.

**[0068]** 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 1. 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 como pode ser observado na figura 1.

**Tabela 1.** 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 |    |    |    |    |    |    |
| <b>Casca de Arroz</b>   |    |    |    | 50 | 50 | 70 | 40 | 95 | 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  |

**Tabela 2.** Composição do meio *Pinus spp.*

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

### Processo de Extração

**[0069]** 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.

**[0070]** 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

**[0071]** Os extratos foram dissolvidos em metanol:MTBE (50:50, v/v) e filtrados em membrana PTFE de 0,22 µm. Os compostos foram separados em

uma coluna C30 YMC (5  $\mu$ 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.

**[0072]** Os extratos obtidos a partir de micélios e de basidiomas de *P. sanguineus* são ricos em cinabarinas (Figura 2) e com elevado grau de pureza (acima de 95%) (Tabela 3 e Figuras 3 a 7).

**[0073]** 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.

**[0074]** 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 4).

**Tabela 3.** Características cromatográficas e espectroscópicas dos compostos encontrados no extrato de *Pycnoporus sanguineus*. obtidas por HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>.

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

<sup>a</sup> Numerado de acordo com o cromatograma mostrado na Figura 3.



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

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

**Tabela 4.** Rendimento, conteúdo de polifenóis totais, inibição do radical livre difenilpicril hidrazil (DPPH) para os extratos secos dos micélios e basidiomas de *Pycnoporus sanguineus*.

|                  | Rendimento (%) | DPPH (IC <sub>50</sub> <sup>\$</sup> )<br>mg/mL | Polifenóis Totais<br>(mg/mL)* |
|------------------|----------------|---|-------------------------------|
| <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

<sup>\$</sup> Concentração necessária para inibir 50% do radical livre DPPH

#### Redução de índices de triglicerídeos e de colesterol plasmáticos e redução de gorduras no fígado

**[0075]** Para a avaliação da atividade do extrato de *P. sanguineus* foram utilizados grupos de ratos controle e grupos de ratos com diabetes.

**[0076]** A diabetes foi induzida nos ratos por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ – Sigma) na dose de 65 mg/kg. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram concentração de glicose plasmática superior a 250mg/dL quatro dias após a injeção de STZ.

**[0077]** O tratamento com o extrato de *P. sanguineus* foi realizado utilizando-se ratos Wistar machos (provenientes do Biotério da Universidade Federal de Santa Maria) alojados em caixas padronizadas, a 22 ± 2 °C com ciclo claro/escuro de 12 horas.

**[0078]** Estudos mostram que a concentração utilizada in vivo em tratamentos com o *P. sanguineus*, que devido ao efeito citotóxico a concentração de 10 mg/kg/dia é uma dose aceitável para o extrato de *P. sanguineus*. Este extrato foi disponibilizado para consumo dos ratos na água de consumo. Devido ao consumo de água 3 vezes maior por parte dos animais diabéticos, inicialmente, os ratos diabéticos receberam o produto numa diluição

de 3 vezes a partir do preparado para os animais do grupo Controle. Para que a quantidade adotada fosse mantida durante todo o tratamento, o peso dos ratos e o consumo de líquido foram monitorados semanalmente e os cálculos de preparação da solução eram refeitos com base nesses dados.

**[0079]** Os grupos foram configurados da seguinte forma.

- Grupo CTR H2O (n=5 ratos): Controles tratados com água;
- Grupo CTR Pyc (n=5 ratos): Controles tratados com *P. sanguineus*;
- Grupo DBT H2O (n=7 ratos): Diabéticos tratados com água;
- Grupo DBT Pyc (n=7 ratos): Diabéticos tratados com *P. sanguineus*.

**[0080]** Após o período de 4 semanas de tratamento com o extrato, os animais foram pesados e posteriormente mortos por decapitação em função das avaliações bioquímicas no sangue. O sangue troncular dos ratos foi coletado e depositado em tubos de ensaio específicos: 1 mL para o perfil hematológico e 4 mL para as análises bioquímicas. No sangue coletado para as análises bioquímicas, o plasma foi separado e congelado. Também foram coletados e pesados fígado e rins para cálculo dos índices hepático e renal dos grupos.

**[0081]** O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul.

**[0082]** A comprovação das propriedades antihipertrigliceridemia e antihipercolesterolemia do extrato de *P. sanguineus*, bem como os efeitos sobre fígado e rins é apresentada nas Tabelas 5 a 7 e nas Figuras 8 a 12.

**[0083]** As enzimas aminotransferase de aspartate (AST) e a aminotransferase de alanine (ALT) normalmente são contidas dentro das células do fígado. Se o fígado estiver com algum problema (patologia ou intoxicação), as células são rompidas e extravasam AST e ALT na corrente sanguínea, elevando os níveis destas enzimas no sangue e sinalizando o problema que possa existir. Verificou-se que quanto à ação destas enzimas, houve redução da sua ação nos ratos normais, mas não houve diferença nos ratos diabéticos para AST (Tabela 5). Já para ALT (Tabela 6), verificou-se

redução nos ratos normais, mas incrementos nos ratos diabéticos. Já para leucócitos e plaquetas, nos indivíduos normais houve incremento em suas quantidades, mas este fato não foi verificado para os ratos diabéticos. Quanto aos parâmetros nefro-hepáticos não foram verificadas variações significativas (Tabela 7).

**Tabela 5.** Atividades enzimáticas de aminotransferase de aspartate (AST) e a aminotransferase de alanine (ALT) e albumina em plasmas sanguíneos de ratos normais e diabéticos após 30 dias de tratamento com *Pycnopus sanguineus*.

|                  | CTR H2O           | CTR Pyc            | DBT H2O            | DBT Pyc           |
|------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------------|
| AST (U/L)        | 151,25 ± 9,06 [5] | 131,30 ± 12,55 [5] | 162,20 ± 20,21 [6] | 131,82 ± 8,15 [7] |
| ALT (U/L)        | 53,60 ± 3,90 [5]  | 52,03 ± 4,62 [5]   | 96,03 ± 7,85 [6]   | 91,96 ± 5,23 [7]  |
| Albumina (mg/dL) | 1,83 ± 0,04 [5]   | 1,79 ± 0,03 [5]    | 1,32 ± 0,15# [6]   | 1,49 ± 0,05 [7]   |

CTR- controle

DBT – diabéticos

Pyc – tratamento com *Pycnopus sanguineus*.

Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento.

**Tabela 6.** Hemograma de ratos normais e diabéticos após 30 dias de tratamento com *Pycnopus sanguineus*.

|                                   | CTR H2O           | CTR Pyc           | DBT H2O          | DBT Pyc           |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| Leucócitos (10 <sup>9</sup> /L)   | 8,91 ± 0,47 [5]   | 6,74 ± 0,65 [5]   | 8,55 ± 1,38 [6]  | 7,92 ± 0,74 [7]   |
| Eritrócitos (10 <sup>12</sup> /L) | 9,31 ± 0,14 [5]   | 9,04 ± 0,13 [5]   | 9,16 ± 0,14 [6]  | 9,27 ± 0,10 [7]   |
| Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L)    | 844,4 ± 53,88 [5] | 905,6 ± 69,31 [5] | 623 ± 102,96 [6] | 557,5 ± 65,54 [7] |
| Hematócrito (%)                   | 46,33 ± 0,91 [5]  | 44,38 ± 0,92 [5]  | 47,17 ± 0,64 [6] | 46,39 ± 0,68 [7]  |

CTR- controle

DBT – diabéticos

Pyc – tratamento com *Pycnopus sanguineus*.

Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento.

**Tabela 7.** Variação de peso, consumo de líquido e índices hepáticos e renais de ratos normais e diabéticos após 30 dias de tratamento com *Pycnopus sanguineus*.

|                            | CTR H2O           | CTR Pyc           | DBT H2O              | DBT Pyc               |
|----------------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Variação de peso (g)       | 0,099 ± 0,008 [5] | 0,103 ± 0,008 [5] | (-)0,035 ± 0,012 [6] | (-) 0,031 ± 0,010 [7] |
| Consumo de líquido (g/dia) | 0,053 ± 0,002 [4] | 0,050 ± 0,002 [4] | 0,204 ± 0,010 [4]    | 0,203 ± 0,005 [4]     |
| Índice hepático (%)        | 3,80 ± 0,11 [5]   | 3,79 ± 0,11 [5]   | 4,33 ± 0,11 [6]      | 4,15 ± 0,11 [7]       |
| Índice renal (%)           | 0,59 ± 0,02 [5]   | 0,55 ± 0,01 [5]   | 0,90 ± 0,03 [6]      | 0,93 ± 0,04 [7]       |

CTR- controle

DBT – diabéticos

Pyc – tratamento com *Pycnoporus sanguineus*.

Os números entre colchetes referem-se ao número de animais em cada tratamento.

**[0084]** Quanto às atividades antihiperlipidêmicas, não foram verificadas atividades relacionadas ao *P. sanguineus* (Figura 8), no entanto quando são analisadas as concentrações de triglicerídeos e colesterol (Figuras 9 a 12), verifica-se claramente que houve redução nas concentrações nos ratos que apresentavam alterações, sendo que estas reduções foram tão significantes que apresentaram valores semelhantes aos dos animais controle.

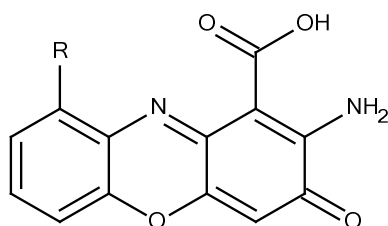
**[0085]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### Reivindicações

1. Uso de um composto **caracterizado por** ser na preparação de um medicamento para:

- redução de gorduras no fígado de mamíferos; ou
- redução de índices de colesterol plasmático em mamíferos; ou
- redução de índices de triglicerídeos em mamíferos; ou
- combinações dos mesmos;

em que o composto possui a fórmula:



em que R é selecionado entre CHOH ou COOH.

2. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento de hipertrigliceridemia.

3. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento de hipercolesterolemia.

4. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** por ser na preparação de um medicamento para tratamento de esteatose hepática.

5. Uso de um composto de acordo com a reivindicação 1 **caracterizado** pelo dito medicamento ser administrado por via oral.

6. Uso de um composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo composto ter sido obtido de corpos de frutificação e/ou micélio de *Pycnoporus sanguineus* e/ou seus extratos.

**FIGURAS**

Figura 1

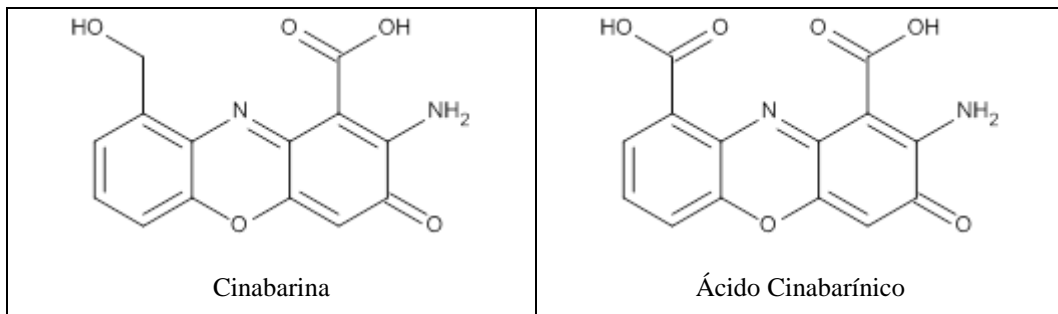
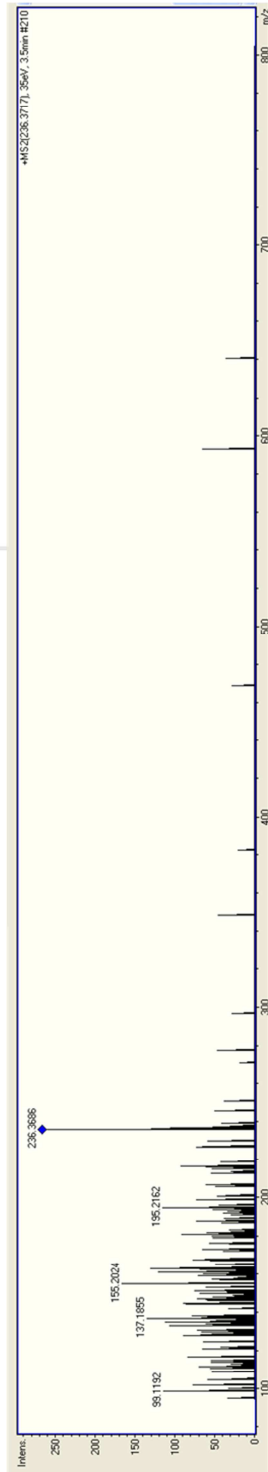
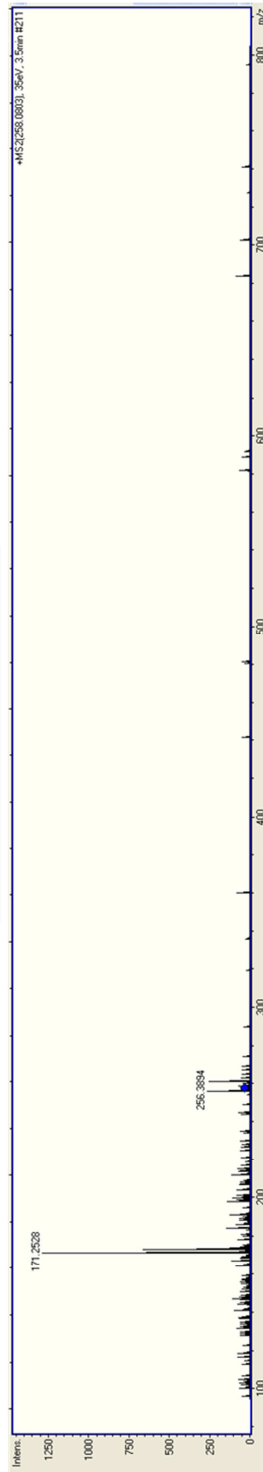


Figura 2

• *P. sanguinarius* MS<sup>2</sup> 236 (3.5 min)



• *P. sanguinarius* MS<sup>2</sup> 258 (3.5 min)



• *P. sanguinarius* MS<sup>2</sup> 595 (3.7 min)

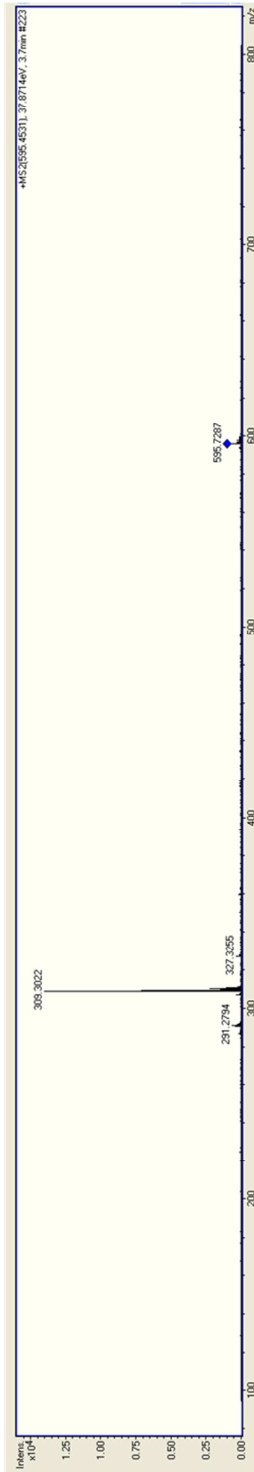


Figura 3

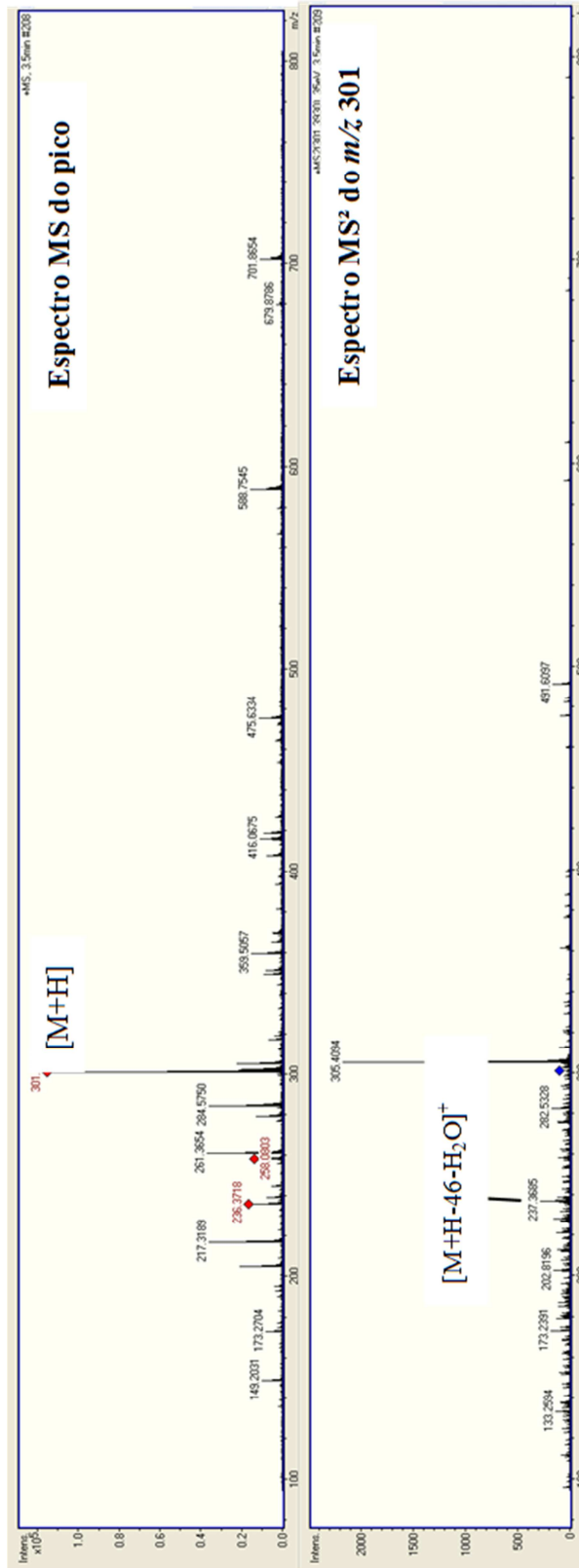


Figura 4



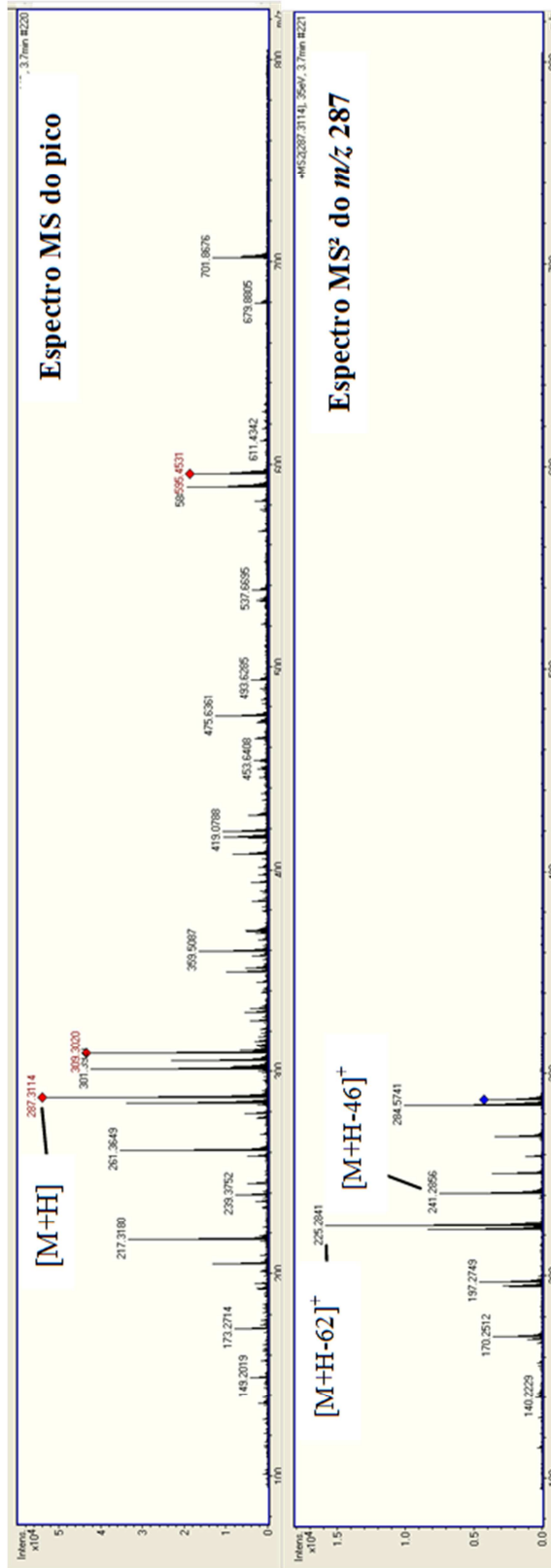


Figura 5

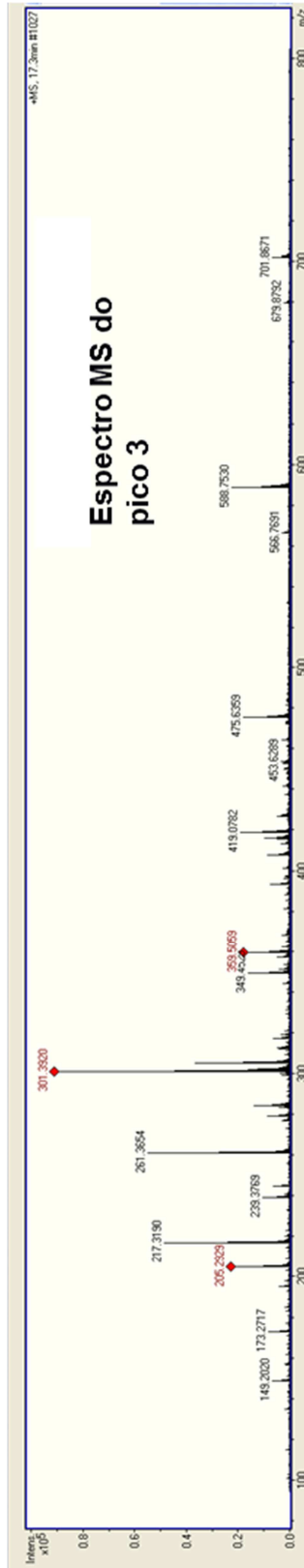


Figura 6

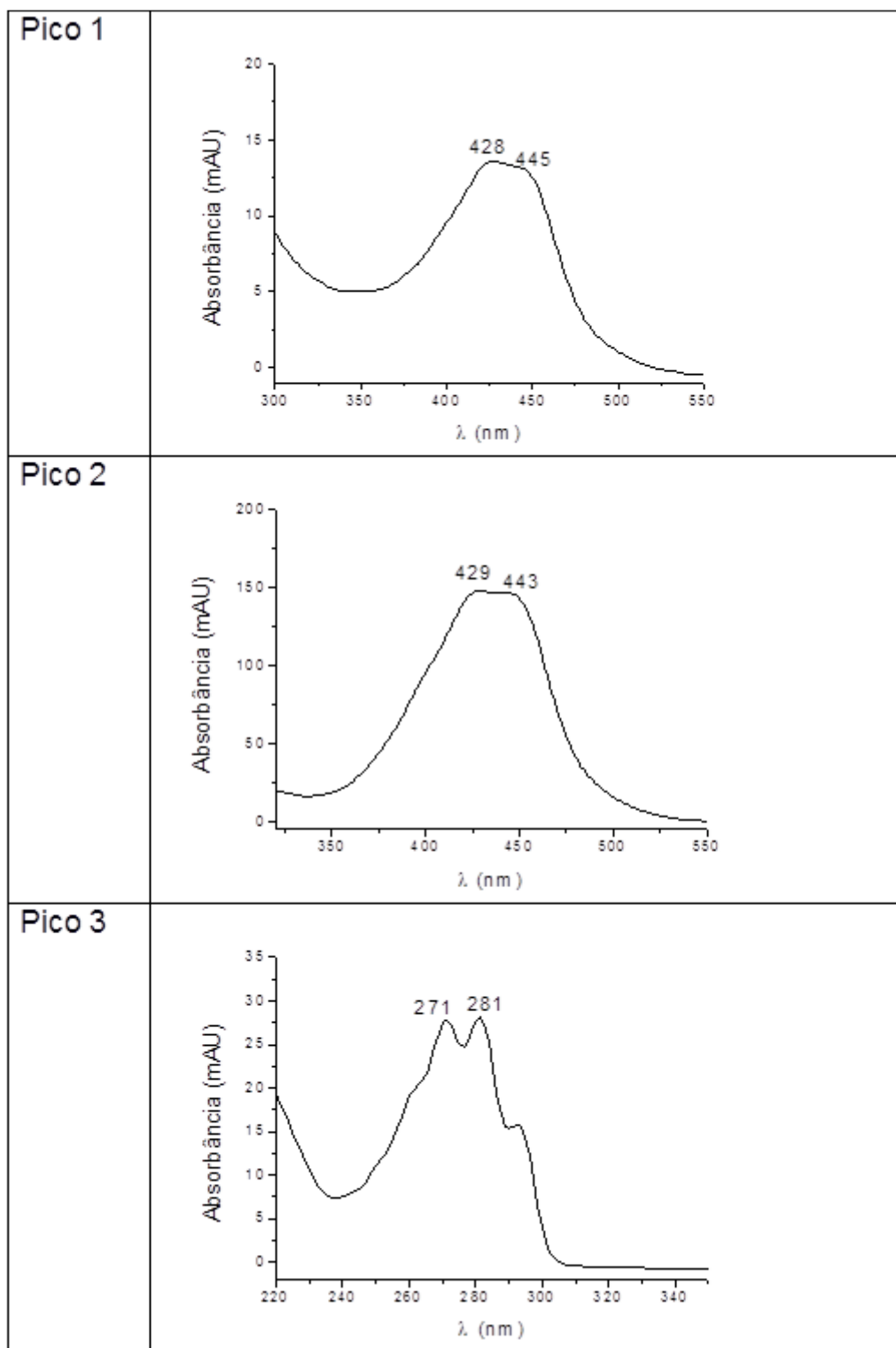


Figura 7

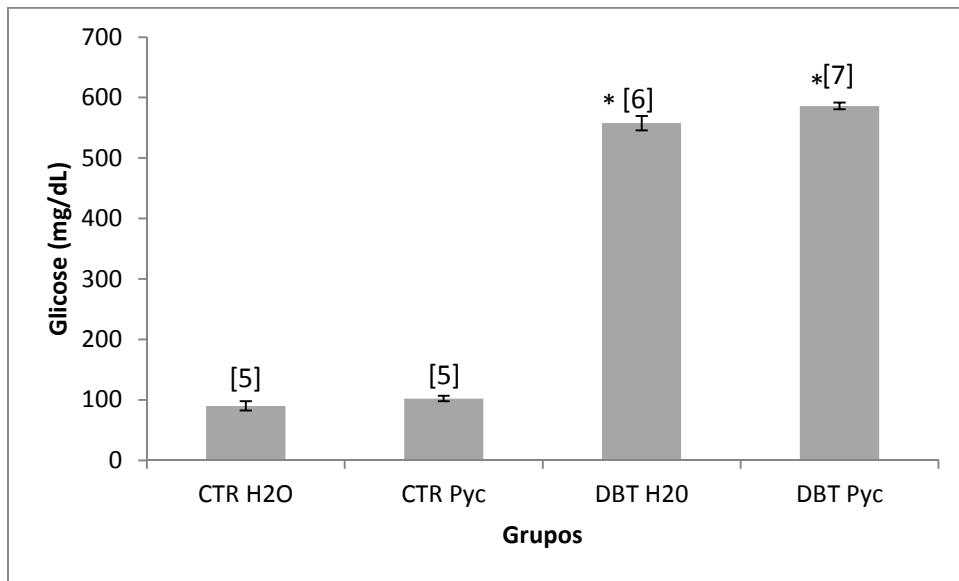


Figura 8

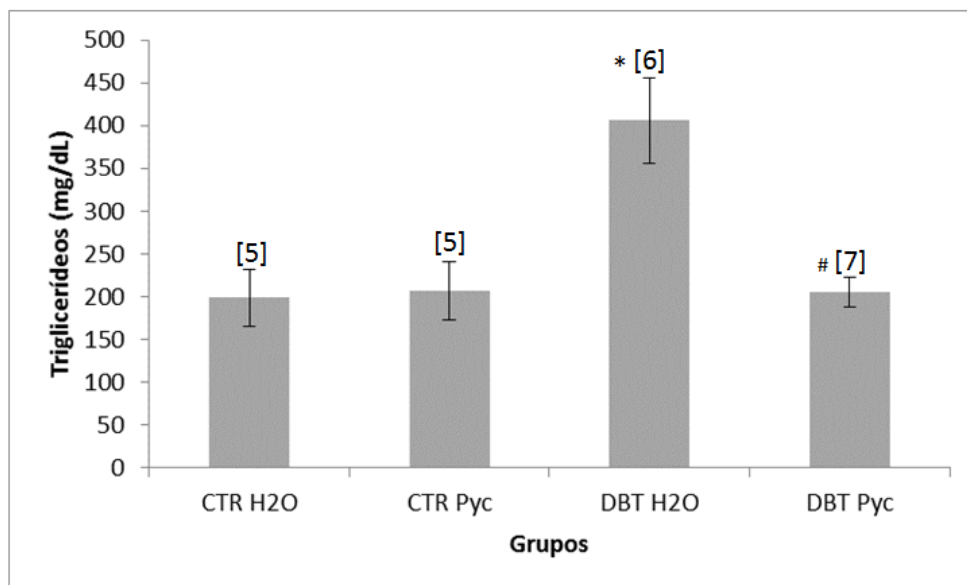


Figura 9

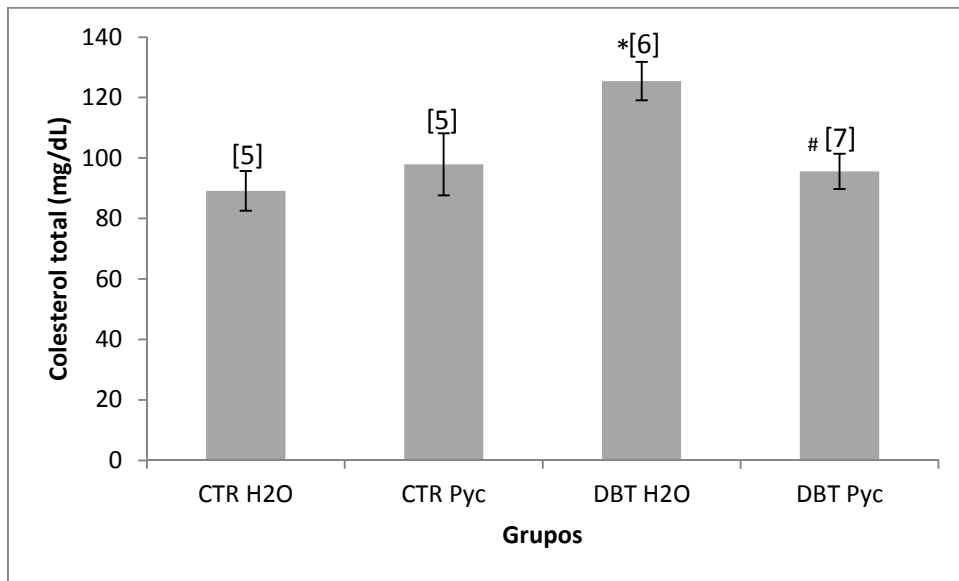


Figura 10

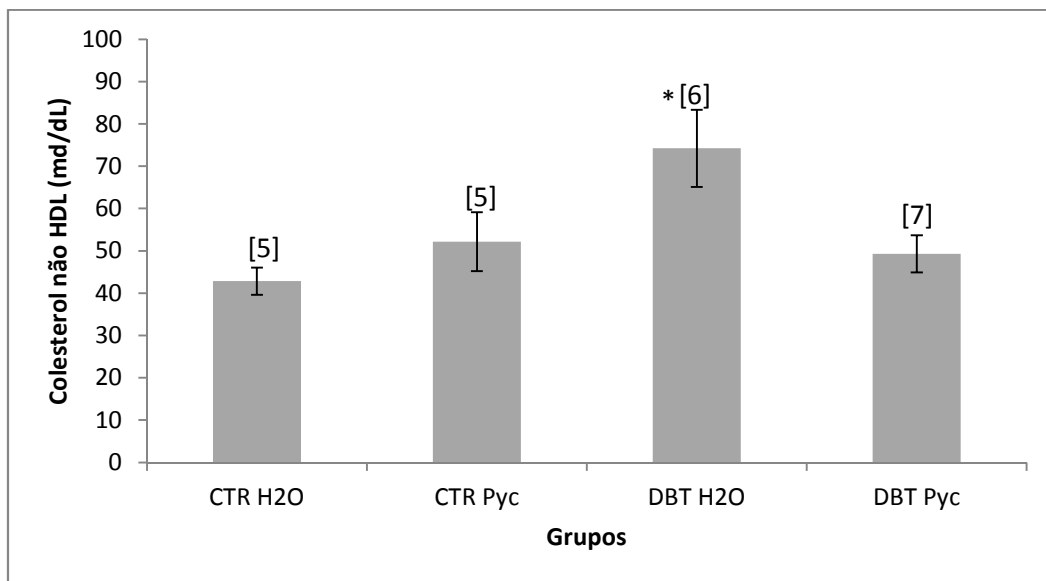


Figura 11

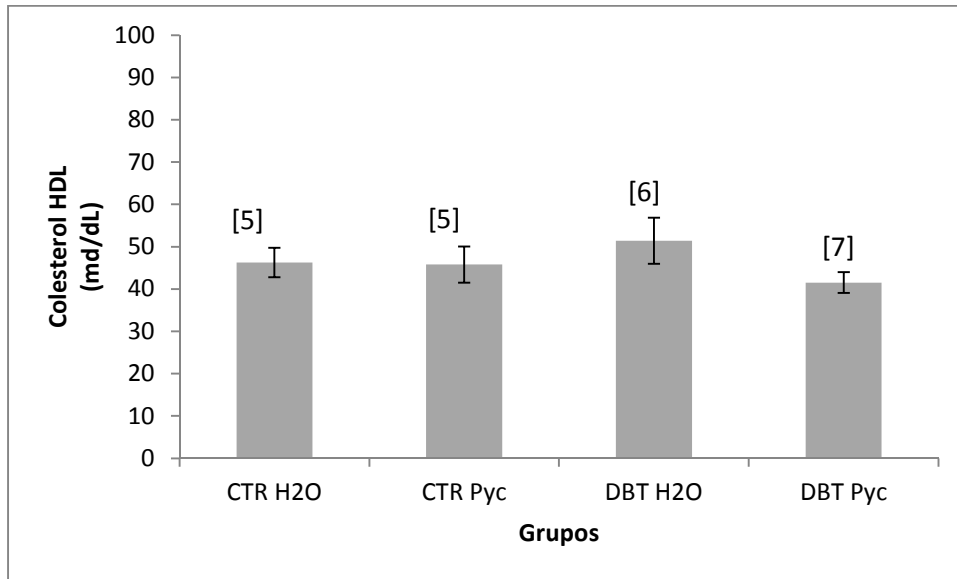


Figura 12

**Resumo**

## USO DE UM COMPOSTO

A presente invenção descreve o uso de compostos (cinabarinas) na preparação de medicamentos para redução de índices de triglicerídeos e colesterol plasmáticos em mamíferos. Em uma concretização os compostos são obtidos de um extrato de *Pycnoporus sanguineus* e/ou seus extratos. A presente invenção se situa nos campos da Biotecnologia, da Bioquímica, Saúde e Medicina.