



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

(21) BR 102018000501-4 A2



(22) Data do Depósito: 09/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/07/2019

(54) **Título:** LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA

(51) **Int. Cl.:** C07H 5/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; CENTRO DE TECNOLOGIAS ESTRATÉGICAS DO NORDESTE.

(72) **Inventor(es):** MONICA FREIRE BELIAN; WAGNER EDUARDO DA SILVA; ANA GABRIELA DA SILVA BEZERRA; NAYARA CELY FERREIRA DA SILVA; ANDRE GALEMBECK.

(57) **Resumo:** A presente patente de invenção consiste no desenvolvimento de novos materiais com atividade fungicida; à base de levana modificada quimicamente com grupamentos R-NH(CH₂)₂NH-R; R-NHCH₂COOH e R-NHCH₂CH(OH)CH₂(OH), onde R = levana; aplicados ao controle microbiológico de fungos nocivos ao ser humano. A avaliação do potencial fungicida foi feita frente aos fungos do gênero *Candida* e variáveis: *albicans*, *utilis* e *krusei*; e os resultados de concentração mínima inibitória para as levanas modificadas ficaram entre 78,1 ? 1250 µg/mL; sendo consideradas ativas e moderadamente ativas. A presente invenção apresenta diversas soluções acerca dos problemas apresentados na maioria dos fungicidas comercial ou sintéticos, como, a toxicidade e solubilidade em água.

“LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA”

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[001] A presente invenção consiste no desenvolvimento de novos materiais com atividade fungicida; à base de levana modificada quimicamente com grupamentos amino. As levanas aminadas, com os grupamentos $R-NH(CH_2)_2NH-R$; $R-NHCH_2COOH$ e $R-NHCH_2CH(OH)CH_2(OH)$, onde R= levana; da presente invenção podem ser aplicadas ao controle microbiológico de fungos nocivos ao ser humano. A avaliação do potencial fungicida foi feita frente aos fungos do gênero *Candida*, e variáveis: *albicans*, *utilis* e *krusei*; e os resultados de concentração mínima inibitória para as levanas ficaram entre 78,1 – 1250 µg/mL; sendo consideradas ativas e moderadamente ativas.

Antecedentes da Invenção

[002] Os polissacarídeos são polímeros naturais, de alto peso molecular, formados por monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas, que se formam com eliminação de água (LEHNIGER, A.L. *Princípios da Bioquímica*, 8 ed.; Sarvier Editora, Ltda. São Paulo, 1993). Sua classificação quanto aos monossacarídeos presentes na estrutura é dada por: homopolissacarídeos, quando formados por um único tipo de unidade monomérica e em heteropolissacarídeos, quando contém mais de um tipo de unidade monomérica. Dextrana, glicogênio, amido, pululana e levana são exemplos de homopolissacarídeos, enquanto xantana, fucana, alginatos, heparina, ácido

hialuronico são heteropolissacarídeos típicos (BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A. *Introdução à Química de Alimentos*, 2 ed., cap. 1. São Paulo, Varela Ltda. 1989). As investigações da aplicação comercial de polissacarídeos são promissoras devido a ser provindo de fontes renováveis, possuem grande diversidade de propriedades e versatilidade. A ausência de toxicidade faz com que os polímeros sejam largamente utilizados em diversos campos da indústria, porém os polímeros industriais são, especialmente, produtos de alto valor comercial. A indústria, em sua maioria, usa grandes quantidades de polissacarídeos de origem vegetal, mas nos últimos anos houve um direcionamento da produção de polissacarídeos por fermentação microbiana, devido às vantagens do suprimento de material de qualidade constante e não sujeito a variações sazonais, como ocorre com polissacarídeos obtidos de plantas e algas, vantagens essas que compensam quando se possui um elevado valor da produção principalmente quando o alvo final é a indústria de alimentos ou farmacêutica (CALAZANS, G. M. T. *Produção de levana para uso clínico. Tese de Doutorado, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1997*). Existem muitos microrganismos que produzem polissacarídeos em quantidades satisfatórias tornando o processo do cultivo de microrganismos e da recuperação do polímero produzido econômico. Comercialmente, o mais importante exopolissacarídeo microbiano é a goma xantana, produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris*, que vem sendo usada há décadas em indústrias alimentícias e não-alimentícias (SUTHERLAND, I. W. *Novel and establish application of microbial polysaccharides, Trends in Biotechnology*, v.16, n.1, p.41-46, 1998). A levana

vem se tornando um polissacarídeo de alto valor comercial, pois apresenta vários usos práticos para diferentes propósitos como, por exemplo, para complexo biologicamente ativo, substituto do plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, preparação de frutose altamente purificada para uso médico (MAYS, T. D.; DALLY, E. L. *Patent U. S.*, n.4, p.769-254, 1988), agente hipocolesterolêmico (YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, Y.; KAWANO, M.; IIZUKA, M.; MATSUMOTO, T.; SAEKI, S.; YAMAGUCHI, H. *Journal of Nutritional Biochemistry, New York*, v. 10, n.1, p. 13-18, 1999) e como imunomodulador e anticarcinogênico (CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANCA, F. P. *Biotechnology Letters, London*, v. 19, n. 1, p. 19-21, 1997).

[003] A levana pode ser definida como um homopolissacarídeo extracelular composto por resíduos D-furanosil unidos por ligações β -2,6 na cadeia principal e β -2,1 nos pontos de ramificação. Sua obtenção acontece pela reação de transfrutossilacção durante a fermentação em meios de cultura ricos em sacarose, extrato de levedura e sais minerais. A levana pode ser chamada de polifrutana devido ser constituída de moléculas de D-frutose (ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H.. *Semina, Ciências Agrárias*, v. 26, n. 1, p. 71-82, 2005).

[004] A levana é um subproduto da fermentação para produção de etanol e em conseqüência disso vêm crescendo o incentivo a pesquisas tanto para a identificação de novos microrganismos produtores, quanto para processos que visem à otimização de produção em escala industrial, pois se ganhará tanto com a produção da matéria prima (etanol) quanto com a do

subproduto, já que a levana possui diversas aplicações (REISS, M.; HARTMEIER, W. *Food Biotechnology*, New York, v. 4, p. 69-75, 1990) (KEITH, J.; WILEY, B.; BALL, D.; ARCIDIACONO, S.; ZORFASS, D.; MAYER, J.; KAPLAN, D. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 38, n. 5, p. 557-560, 1991) (TANO, M. S.; BUZATO, J. B. *Brazilian Journal of Microbiology*, Sao Paulo, v. 34, p. 242-244, 2003). A levana pode ser produzida por diferentes tipos de bactérias, sendo citadas neste texto as *Acetobacter suboxydans*, *Aerobacter levanicum*, *Erwinia herbícola*, *Streptococcus salivarius*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Pseudomonas syringae* e a *Zymomonas mobilis*, sendo esta última utilizada na presente invenção.

[005] Na patente PI 9102806-0 A2 é apresentado o desenvolvimento de sistemas de obtenção de levana, em condições econômicas, dentro do processo de fermentação alcoólica de mostos à base de sacarose pela bactéria *Zymomonas mobilis*. O processo, em suas três variantes (batelada intermitentemente alimentada, batelada continuamente alimentada; e contínuo), permitiu a viabilização econômica da produção de levana como co-produto da fermentação. Porém a referida patente não explora propriedades antimicrobianas da levana produzida, nem propõe modificações na mesma para a geração de levanas com maior atividade antimicrobiana.

[006] Nas patentes BR 11 2012 024432 9 A2 e BR 11 2014 005134 8 A2 são descritas composições farmacêuticas com a utilização da levana. A levana não é utilizada como ingrediente farmacêuticamente ativo, mas como rede de matriz aberta. A presente invenção propõe a utilização de levanas modificadas

como agentes fungicidas, o que difere completamente das patentes supracitadas.

[007] Não foi encontrada na literatura (busca de trabalhos e patentes) a utilização de levana e levanas modificadas no controle e prevenção de fungos ou descrita a síntese e as atividades antimicrobianas da levanas aminadas propostas. Na presente invenção serão utilizadas levanas modificadas com 1,2-diaminoetano – codificada de levanodiamino, glicina – codificada de levanoglicina; e 3-amino-1,2-propanediol – codificada de levanoamino, no controle e prevenção de fungos do gênero *Candida*. A presente invenção apresenta diversas soluções acerca dos problemas apresentados na maioria dos fungicidas comercial ou sintéticos, como, atoxicidade e alta solubilidade em água. Na presente invenção é possível destacar também os valores de CMI para *C. krusei* de 78,1 µg/mL, para os compostos levanoamino e levanoglicina; e para *C. albicans* de 78,1 µg/mL, para o composto levanodiamino; sendo consideradas ativas.

Descrição da Invenção

[008] A produção das levanas aminadas, que compreende três levanas distintas; da presente invenção compreenderam duas etapas: (i) produção de levana; e (ii) modificação química da levana através do processo de oxidação, seguida da formação dos grupos amino. Após a produção das três levanas aminadas da presente invenção, foram realizados testes de caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana.

[009] Para a produção de levana foi utilizada a linhagem de *Zymomonas mobilis* codificada como ZAG-12, e registrada na Coleção de Microrganismos do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste.

[010] Para a produção de levana foi utilizado o meio Agar nutritivo, que é constituído de extrato de carne, numa faixa de 2,0 – 4,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 3,0 g L⁻¹; peptona de carne, numa faixa de 3,0 – 6,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 5,0 g L⁻¹; e agar bacteriológico, numa faixa de 10,0 – 20,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 15,0 g L⁻¹. O meio tem um ajuste de pH em uma faixa de 6,7 – 7,2; e então é autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

[011] Foi preparado 90 mL do meio SDL, que foi constituído de D-Glicose, numa faixa de 15,0 – 25,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 20,0 g L⁻¹; extrato de levedura, numa faixa de 2,0 – 7,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 5,0 g L⁻¹. O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos.

[012] Sob a chama do bico de Busen e com auxílio de pipetas semi-automáticas colocou-se 1 % das linhagens e inocularam-se tubos de ensaio que continham meio SDL. As condições para o crescimento do microrganismo são 30 °C e tempo de 48 h.

[013] O meio de fermentação é composto por sacarose, numa faixa de 150,0 – 220,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 200,0 g L⁻¹; extrato de levedura, numa faixa de 1,0 – 4,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 2,0 g L⁻¹; KH₂PO₄, numa faixa de 1,0 – 4,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas

2,0 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, numa faixa de 0,5 – 1,0 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 0,5 g L⁻¹; e (NH₄)₂SO₄, numa faixa de 0,5 – 1,2 g L⁻¹, sendo preferencialmente utilizadas 1,0 g L⁻¹. Após preparado o meio e levado a autoclave a 121 °C por 15 minutos, e sob a chama adicionou-se 200 mL do meio que continha a *Zymomonas mobilis*. Este meio foi então incubado a 30°C por 72 h.

[014] Após 72 h de fermentação, realizaram-se os procedimentos de centrifugação e filtração do meio de fermentação para que houvesse a remoção das células contidas no sistema. A Centrifugação foi realizada a 4°C, utilizando uma rotação de 13500 g por 15 min. E a filtração foi feita em um sistema de filtração à vácuo com membrana de 0,22 µm.

[015] A primeira etapa de modificação da levana foi feita através da oxidação de carbonos vicinais em cerca de 10 a 25% de unidades frutósídicas. O procedimento de oxidação foi feito com o periodato de sódio, sob agitação constante por um intervalo de 5 a 10 horas, sendo preferencialmente utilizado 7h.

[016] Após o tempo reacional, a levana oxidada foi dialisada e em seguida foram adicionadas as aminas em três recipientes distintos e posteriormente, a mistura foi adicionado um redutor de imina para amina, como o borohidreto e hidretos, sendo preferencialmente usado o borohidreto de sódio; gerando assim, três levanas aminadas. Os compostos contendo os grupos amino utilizados foram 1,2-diaminoetano – codificada de levanodiamino, glicina – codificada de levanoglicina; e 3-amino-1,2-propanediol – codificada de levanoamino. As levanas produzidas apresentam estruturas químicas

R-NH(CH₂)₂NH-R; R-NHCH₂COOH e R-NHCH₂CH(OH)CH₂(OH), onde R= levana.

Exemplo 1: Caracterização das levanas aminadas

[017] Os dados gerais, bem como da caracterização espectroscópica (FT-IR, Raios-X e índice de cristalinidade), obtidos para a levana, levana oxidada, levanodiamino, levanoglicina e levanoamino encontram-se descritos abaixo:

[018] IR cm⁻¹ (KBr): ν 3386, 2947, 1097, 930, 918 (levana); 3418, 1646 (levana oxidada); 3669, 3497, 3386, 2947, 1587, 1114 (levanodiamino); 3626, 3470, 3386, 2947, 1149 (levanoglicina); 3387, 2947, 1581, 1081 (levanoamino); RMN ¹H ppm (D₂O): 4.2 – 3.2 (levana); 4.2 – 3.2 e 2.90 – 2.05 (levanas aminadas); RMN ¹³C ppm (D₂O): 59.88, 63.34, 76.27, 75.16, 80.23, 104.15 (levana).

Exemplo 2: Ensaio Antimicrobiano.

[019] O potencial antimicrobiano da levana, levana oxidada e levanas aminadas foram avaliados frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) e as bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416); e aos fungos *Candida albicans* (UFPEDA 1007), *Candida utilis* (UFPEDA 1009), e *Candida krusei* (UFPEDA 1002). As bactérias e fungo foram provenientes da coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A suspensão dos microrganismos foi padronizada pela turvação equivalente ao

tubo 0,5 da escala de McFarland em água destilada, correspondente a uma concentração de aproximadamente 108 UFC/mL para bactérias e 107 UFC/mL para fungos.

[020] A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição em multiplacas com 96 poços. Os meios de cultura empregados foram o Ágar Sabourand (para fungos) e Ágar Muelle-Hinton (para bactérias). O Metronidazol (2,5 µg/mL) e Fluconazol (2,5 µg/mL) foram usados como controle positivo, enquanto o álcool etílico como controle negativo. As análises foram realizadas em triplicata e as microplacas foram cultivadas à 37 °C por 18-24 h para bactérias e 30 °C por 48-72 h para o fungo. Após o período de cultivo, as microplacas foram reveladas com a adição de 10 µL da solução de risazurina a 0,01% e incubadas por 3 h. A CMI foi definida como a menor concentração da amostra que inibiu o crescimento do microrganismo, com concentração final de 2500 g mL⁻¹. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 1 (para bactérias) e Tabela 2 (para fungos).

[021] Tabela 1. Resultados obtidos a partir do ensaio antimicrobiano para bactérias.

Bactérias	LEVANA	LEVOXI	LEVANODIAMINO	LEVGLICINA	LEVANOAMINO
<i>S. aureus</i>	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	2500µg/mL
<i>B. subtilis</i>	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	2500µg/mL
<i>E. coli</i>	2500µg/mL	<2500µg/mL	1250 µg/mL	<2500µg/mL	625µg/mL
<i>P. aeruginosa</i>	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	2500µg/mL
<i>E. faecalis</i>	<2500µg/mL	2500µg/mL	<2500µg/mL	<2500µg/mL	2500µg/mL

[022] Para os ensaios antibacterianos foram observadas atividades contra *Escherichia coli* para as levanas modificadas, levanodiamino e

levanoamino. As demais levanas foram consideradas inativas, incluindo-se a levana sem modificações e a levana oxidada.

[023] Tabela 2. Resultados obtidos a partir do ensaio antimicrobiano para fungos.

Fungos	LEVANA	LEVOXI	LEVANODIAMINO	LEVGLICINA	LEVANOAMINO
<i>C. albicans</i>	2500µg/mL	<2500µg/mL	78,1µg/mL	2500µg/mL	156,2µg/mL
<i>C. utilis</i>	<2500µg/mL	<2500µg/mL	312,5µg/mL	<2500µg/mL	312,5µg/mL
<i>C. krusei</i>	<2500µg/mL	78,1µg/mL	1250 µg/mL	78,1µg/mL	78,1µg/mL

[024] Os dados do ensaio antifúngico mostraram atividade para as levanas aminadas e para a levana oxidada. A levanodiamino apresentou atividade contra os três fungos, *Candida albicans*, *Candida utilis* e *Candida krusei*, sendo mais ativa (alta atividade) contra a *Candida albicans*. A levanoglicina apresentou alta atividade contra a *Candida krusei*. Já a levanoamino apresentou também atividade frente aos três gêneros de cândida, com valores de CMI de 78,1; 156,2 e 312,5 µg/mL; para *Candida krusei*, *Candida albicans* e *Candida utilis*, respectivamente.

[025] Os valores de CMI obtidos na atividade antifúngica sugerem que as levanas modificadas podem ser utilizadas na clínica médica como promissores antifúngicos.

REIVINDICAÇÕES

1. “LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA” **caracterizado pela** presente invenção consistir na produção de levanas modificadas por processo químico com 1,2-diaminoetano, glicina e 3-amino-1,2-propanediol, apresentando estas levanas, atividade fungicida.
2. “LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA”, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** presente invenção produzir os compostos com fórmula química $R-NH(CH_2)_2NH-R$; $R-NHCH_2COOH$ e $R-NHCH_2CH(OH)CH_2(OH)$ onde R = levana.
3. “LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA” conforme reivindicação 1 e 2, **caracterizado por** apresentar alta solubilidade em água, podendo ser utilizado como um antimicrobiano.

RESUMO

“LEVANAS AMINADAS COM POTENCIAL ATIVIDADE FUNGICIDA”. A presente patente de invenção consiste no desenvolvimento de novos materiais com atividade fungicida; à base de levana modificada quimicamente com grupamentos $R-NH(CH_2)_2NH-R$; $R-NHCH_2COOH$ e $R-NHCH_2CH(OH)CH_2(OH)$, onde R = levana; aplicados ao controle microbiológico de fungos nocivos ao ser humano. A avaliação do potencial fungicida foi feita frente aos fungos do gênero *Candida* e variáveis: *albicans*, *utilis* e *krusei*; e os resultados de concentração mínima inibitória para as levanas modificadas ficaram entre 78,1 – 1250 µg/mL; sendo consideradas ativas e moderadamente ativas. A presente invenção apresenta diversas soluções acerca dos problemas apresentados na maioria dos fungicidas comercial ou sintéticos, como, a toxicidade e solubilidade em água.