

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

(21) **PI0704700-2 A2**



* B R P I 0 7 0 4 7 0 0 A 2 *

(22) Data de Depósito: 12/12/2007
(43) Data da Publicação: 11/08/2009
(RPI 2014)

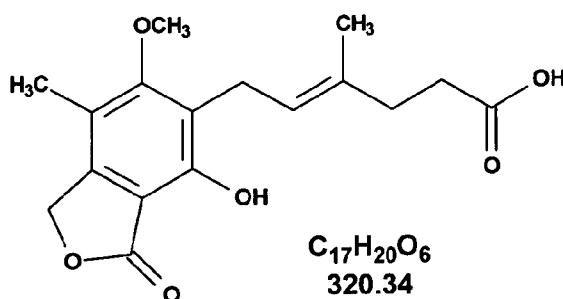
(51) *Int.Cl.:*
C12P 17/04 (2009.01)
C12P 7/42 (2009.01)
C12P 7/36 (2009.01)
C12P 7/22 (2009.01)
C12R 1/79 (2009.01)
C12N 1/14 (2009.01)
C07D 307/88 (2009.01)
B01D 11/02 (2009.01)
B01D 11/04 (2009.01)
B01D 1/00 (2009.01)
B01D 9/00 (2009.01)

(54) Título: **PROCESSO PARA PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEUS SAIS**

(73) Titular(es): Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Fundação Universidade Federal de São Carlos

(72) Inventor(es): ANGELA MARIA MONTES PERAL VALENTE, ANTONIO GILBERTO FERREIRA, EDSON RODRIGUES FILHO, ELISANGELA FABIANA BOFFO, ELKE SIMONI DIAS VILELA, ITAMAR SOARES DE MELO, JOÃO LUIZ DA SILVA, ROSELY DOS SANTOS NASCIMENTO

(57) Resumo: PROCESSO PARA PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEUS SAIS. É descrito um processo para produção e isolamento de ácido micofenólico e seus sais, o ácido micofenólico sendo cristalizado na extração líquido/líquido de um cultivo de *Penicillium sp.CASP5*, isolado do fruto do café (*Coffea arabica L.*) em coco e/ou beneficiado após assepsia. O processo compreende inocular placas em meio de cultura BDA a partir de frutos esterilizados de café em coco e/ou beneficiado, obtendo fungos após incubação a temperatura ambiente; dessas placas assim inoculadas e incubadas, isolar, repicar e cultivar o fungo *Penicillium sp. CASP5* por um período de tempo entre 4 e 20 dias; filtrar para separar micélio e filtrado e submeter o filtrado a duas extrações; reduzir a fase orgânica obtida até 25 a 10 mL e em seguida acrescentar o mesmo volume de solvente à base de hidrocarbonetos e deixar a solução em repouso para o ácido micofenólico cristalizar; e recuperar o ácido micofenólico cristalizado com grau de pureza 98%, conforme obtido do espectro de RMN de ¹H.





PI0704700-2

Relatório Descritivo de Patente de Invenção “PROCESSO PARA PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEUS SAIS”.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção pertence ao campo dos processos de produção do ácido micofenólico e seus sais, mais especificamente, a um processo de produção e isolamento do ácido micofenólico cristalizado na extração líquido/líquido de um cultivo de *Penicillium* sp.CASP5, isolado do fruto do café (*Coffea arabica* L.) em coco e/ou beneficiado após assepsia.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 O ácido micofenólico [ácido-6-(4-hidroxi-6-metoxi-7-metil-3-oxo-1,3-dihidroisobenzofurano-5-il)-4-metil-hex-4-enóico] (MPA) foi detectado pela primeira vez em uma cultura de *Penicillium* (B. Gosio, Riv. Cervejaria de Sanita de Igiene. O Ann, 7, 825-869, 1896), sendo obtido em forma de agulhas brancas, com ponto de fusão de 140°C e fórmula molecular C₁₇H₂₀O₆.

15 Subseqüentemente, o ácido micofenólico foi isolado, segundo Turner, W. B.; Aldridge, D.C. “Fungal metabolites II”. *Imperial Chemical Industries, PLC, Pharmaceuticals*, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, England, Academic Press, 1983, 631 p. em *Verticicladdella abientina, Penicillium brevicompactum, Penicillium paxilli, Penicillium roquefort, Penicillium bruneo-stoloniferum e Septoria nodorum*.

20 Em 2003, esta substância também foi isolada em vários experimentos com o *Penicillium* CATL2.3, fungo foi isolado do fruto do café (*Coffea arabica* L. variedade “Mundo Novo”) colhido no estágio cereja, seco em terreiro e limpo (beneficiado) após assepsia, conforme Valente, Ângela M. M. P. Análise de componentes fixos em frutos de *Coffea arabica* L. e dos seus produtos de fermentação. Dissertação de Mestrado - São Carlos UFSCar, 2003, 189 p.

25 O ácido micofenólico apresenta várias atividades biológicas, tais como: anti-bacteriana, conforme o artigo por Abraham, E.P. The effect mycophenolic acid on the growth of staphylococcus aureus in heart broth v. *The Journal Antibiotics* 39, p. 398-408, 1945; anti-fúngica conforme o artigo por Gilliver, K. The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic bacteria and fungi, *Annals of Botany*, N.S. Vol. 10, n. 39, p. 271-282, 1946; anti-viral, conforme Ando, Kunio; Suzuki, Seikichi; Tamura, Gakuzo And Arima, Kei “Antiviral activity of mycophenolic acid studies on antiviral and antitumor antibiotics.

IV” *The Journal of antibiotics*, **21**(11): 649-652,1968; Williams, R. H.; Lively, D. H. and Delong, D. C.; line J. C.; Sweeney, M.J.; Poore G. A. and Larsen, S.H. Mycophenolic acid: antiviral and antitumor properties *The Journal of Antibiotics*, vol. **21**, n. 7 p. 463-464, 1968; anti-tumoral, mesma referência de Ando, K. et al, acima; anti-psoriática, conforme Jones, E. L.; Epinette, W. W., Hackney, V. C.; Menéndez, L. And Frost, P. Treatment of psoriasis with oral mycophenolic acid *The Journal of Investigative Dermatology* v. 65, n. 6, p. 537-542, 1975 e imunossupressora, conforme Mitsui, A.; Suzuki S. Immunosuppressive effect of mycophenolic acid *The Journal of Antibiotics*, vol. 22, n.8, p. 358-363, 1969.

10 A sua atividade imunossupressora somente foi reconhecida em 1982, quando A. Allison (Farmacêutica Syntex) começou a trabalhar com pesquisa de drogas imunossupressoras, vide Allison A. C.; Almquist, S. J.; Muller, C. D. and Eugui E. M. In vitro immunosuppressive effects of mycophenolic acid and ester prodrug, RS-61443. *Transplant Proc.* Vol. 23, p. 10-12, 1991.

15 O mecanismo de ação do ácido micofenólico se dá com a inibição da enzima Inosina Monofosfato Dehidrogenase (IMD), importante na síntese de inosina monofosfato, que é um precursor das purinas, vide o artigo de Pankiewicz, K. W. NAD Analogues Designed as Potential Anticancer Agents. Quest for Selective Inhibition of Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH). *Pharmacol. Ther.*, **75**, 1-12, 1997.

20 O éster do ácido micofenólico, Micofenolato Mofetil – MMF, aumenta em duas vezes a sua biodisponibilidade.

A literatura de patentes apresenta vários documentos sobre o assunto.

25 O pedido brasileiro PI0503193-1 relata a produção do ácido micofenólico numa fermentação submersa de um mutante do *Penicillium brevicompactum* (ATCC160024) em condições aeróbias. A produção utiliza duas ou mais fermentações seqüenciais, uma ou mais fermentações de germinação e uma fermentação de produção. Durante a fermentação de produção a temperatura e/ou pH são alterados. O processo de separação da biomassa compreende um passo cromatográfico utilizando uma resina de adsorção. Após a eluição, utilizando-se um solvente orgânico, segue um passo para precipitação utilizando água refrigerada (pH baixo), e o precipitado é centrifugado e seco em estufa.

30 O pedido brasileiro PI0303184-5 relata a produção do ácido micofenólico em meio Czapek da cultura do *Penicillium* sp (Cat12.3) isolado do café (*Coffea arabica* L.)

beneficiado após assepsia. Após 20 dias de incubação, foram adicionados 350 mL de diclorometano e metanol na proporção de 7:3 v/v por (24 horas), seguido de uma filtração comum e a fase orgânica foi separada e concentrada e a fase aquosa foi submetida novamente a uma partição líquido/líquido com diclorometano e, em seguida, concentrado.

5 O extrato obtido foi filtrado em uma coluna de placa sinterizada sob vácuo e eluída no seguinte sistema de gradiente: Hexano 100%; Hexano/Acetato de Etila (7:3); Hexano/Acetato de Etila (4:6); Acetato de Etila 100%; Acetato de Etila/Metanol (9:1); Acetato de Etila/Metanol (6:4); Acetato de Etila/Metanol (4:6); Metanol 100%; Metanol/H₂O (9:1). Na fração acetato de Etila 100% obteve-se o ácido micofenólico.

10 O pedido norte-americano US2005250952 descreve um processo de isolamento de ácido micofenólico que compreende as etapas de: a) prover uma mistura alcalina concentrada contendo ácido micofenólico; b) misturar a mistura com um primeiro solvente imiscível em água para formar uma fase aquosa e uma primeira fase imiscível em água, a pH entre 8 e 11; c) separar a fase aquosa; d) misturar a fase aquosa com um segundo
15 solvente imiscível em água a pH inferior a cerca de 7 para formar uma fase aquosa e uma segunda fase imiscível em água; e) separar a segunda fase imiscível em água; f) concentrar a segunda fase imiscível em água; e g) cristalizar o ácido micofenólico. Os solventes compreendem ésteres ou cetonas em C₄ –C₇ ou misturas dos mesmos, tais como acetato de etila, acetato de isobutila, acetato de n-butila ou misturas dos mesmos. Diclorometano
20 também pode ser usado.

A publicação internacional WO0034503 descreve processos para a manufatura de Micofenolato mofetil e síntese por via bioquímica usando ácido micofenólico e 2-morfolino etanol com auxílio de uma enzima. O éster também pode ser sintetizado por via química de modo não catalítico refluxando o ácido micofenólico com 2-morfolino etanol
25 em ausência de um terceiro solvente ou um catalisador.

A fermentação para produção de ácido micofenólico é objeto da patente GB 1157099, a partir de espécies ativas de *Penicillium*, tais como as cepas *Penicillium brevicompactum*, depositadas no The Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, e numeradas I.M.I. 40225, 92034, 92044, 92262, 92274 e 94149 e cepas descritas
30 como *Penicillium stoloniferum*, por exemplo, I.M.I. 39824, 91960, 92219d] e 126540, e cepas descritas como *Penicillium viridicatum*, por exemplo, I.M.I. 49096. Esta patente afirma que bons rendimentos em ácido micofenólico são obtidos com um processo de

cultura aeróbica submersa no qual uma fonte de magnésio está presente no meio de cultura durante a duração do processo. O magnésio está presente no meio nutriente no início do processo em concentração de 10-300 mg de magnésio por litro, de preferência 10-100 mg de magnésio por litro.

5 O isolamento de ácido micofenólico de caldos de fermentação está descrito nos documentos WO0121607, WO01/64931 e patente britânica GB1158387.

A esterificação do ácido micofenólico está descrita nos documentos de patente US4.753.935, US5.543.408, US5.247.083, e publicações internacionais WO0034503 e WO 02100855.

10 A publicação internacional WO2006038218 descreve a produção do ácido micofenólico sob parâmetros otimizados para de fermentação usando um mutante do *Penicillium arenicola* 7673 BICC seguindo os passos: preparação do inóculo de uma cepa do *Penicillium arenicola*; transferência do inóculo para o meio de produção; fermentação; extração de MPA da biomassa e isolamento de MPA.

15 A publicação internacional WO2006031665 relata o isolamento do ácido micofenólico de uma fermentação líquida com baixo consumo de solvente orgânico. O ácido micofenólico é produzido com um alto grau de pureza. O processo pode ser realizado por adição de uma base conveniente no meio de fermentação, aumentando o pH da fase líquida de aproximadamente 9 para 13. O ácido micofenólico é extraído do micélio, passando para a fase líquida e, depois de exaustivas extrações, o micélio é separado por
20 filtração. A fase líquida é então acidificada com um ácido por volta de pH 4,5 para pH 1,5 para precipitar o ácido micofenólico na solução, que é separado, seco e recristalizado em tolueno, obtendo-se o produto com uma pureza de 99%.

Na publicação internacional WO2005105768 o processo para isolar o ácido
25 micofenólico segue os seguintes passos: a cultura fornece uma mistura alcalina concentrada contendo ácido micofenólico; adiciona-se à mistura um primeiro solvente imiscível em água para formar 2 fases; separa-se a fase aquosa; adiciona-se a fase aquosa um segundo solvente imiscível em água num pH menor que 7 para formar uma fase aquosa e uma orgânica; separa-se a segunda fase imiscível em água; concentra-se a fase orgânica e
30 cristaliza-se o ácido de micofenólico.

A publicação internacional WO0121607 relata um processo microbiológico para preparação do composto de fórmula (I) EMI24.1 onde: R₁ é grupo metil ou hidroximetil e

R₂, um grupo padrão hidroxila ou amina. O fungo *Penicillium waksmani* tem a habilidade de biotransformar o ácido micofenólico quando cultivado em um meio de cultura contendo carbono, nitrogênio e sais minerais a uma temperatura de 22 a 30 °C, separando o composto de fórmula geral (I) em que R₁ é um grupo metila e R₂ uma hidroxila do meio de fermentação e, se desejado, purifica-o. No caso de se desejar fazer uma bioconversão usa-se uma cultura de *Streptomyces griseoruber* para a obtenção do composto onde R₁ é uma metoxila e R₂ um grupo amina.

A publicação internacional WO0164931 relata a produção do ácido micofenólico por fermentação no estado sólido de *Penicillium brevicompactum* em um bio-reator sob condições ótimas de fermentação com subseqüentes etapas de purificação.

A publicação JP60087795 apresenta produção do ácido micofenólico com alta eficiência utilizando um mutante do gênero *Penicillium* (mutante do *Penicillium brevicompactum* AJ117096) que requer ácido L-glutâmico ou ácido L-aspártico para ser capaz de produzir o ácido micofenólico em condições aeróbicas a uma temperatura de 20 a 35 °C, com o objetivo de passar o ácido micofenólico para o meio líquido.

A publicação JP60078584 refere-se à obtenção de um composto útil como agentes antimicrobianos, antiviral, antitumor, antifúngico e um remédio para psoríase, com o cultivo de um mutante do gênero *Penicillium*, capaz de promover o crescimento em mioinositol (isômero da glicose), preferencialmente o *Penicillium brevi-compactum* FERM-P AJ117122.

A publicação internacional JP59011189 tem por objetivo preparar o ácido micofenólico com alto rendimento, cultivando um fungo do gênero *Penicillium* utilizando um variante como *Penicillium brevicompactum* AJ117112 (FERM- P 6619), capaz de produzir o ácido micofenólico em um meio contendo metionina, sob condições aeróbicas a uma temperatura de 20-35 °C por 100-500 horas.

A publicação JP59091891 relata o preparo do ácido micofenólico com alto rendimento, através do cultivo de fungos capazes de produzi-lo em um meio de cultura contendo um material poroso como alumínio, carbono ativado ou zeólita, numa concentração de 1-50 g/L, que é adicionado ao meio de cultura contendo 1% de glucose, 0,2% de peptona, 0,1% de extrato de malte, 0,1% de extrato de fermento e 1,5% de agar. Um fungo como o *Penicillium brevicompactum* QM-8406 (ATCC16024), pertencente ao gênero *Penicillium*, tem a capacidade de produzir o ácido micofenólico, quando inoculado

no meio de cultura citado acima e mantido sob condições de aproximadamente 20-30 °C, pH entre 2-10 por 4-20 dias. O ácido micofenólico é então separado por métodos convencionais.

5 A publicação japonesa JP59025693 mostra a obtenção do ácido micofenólico produzido por microrganismos com alta produtividade com um mutante do *Penicillium brevicompactum*, resistente ao ácido monofluoroacético, sendo este responsável pela produção do ácido micofenólico.

10 A publicação japonesa JP58107196 relata a preparação do ácido micofenólico eficientemente, através do cultivo de um fungo pertencente ao gênero *Penicillium* inoculado num meio nutritivo que contenha um ácido nucléico do tipo purina (guanosina). O *Penicillium brevi-compactum* (QM 8406 FERM-P 5414) pertencente ao gênero *Penicillium* é capaz de produzir o ácido micofenólico, jogando-o para o meio de cultura que contém o ácido nucléico. O cultivo é aeróbico a uma temperatura de 20-35 °C por 100-500 horas. O ácido micofenólico se forma na solução de cultura.

15 A patente US4.452.891 ensina a produção de ácido micofenólico aerobicamente em um meio de cultura quando inoculado com um mutante do gênero *Penicillium*. O mutante dito é resistente a *clofibrat*, o que faz com que o ácido micofenólico se acumule no meio de cultura.

20 A publicação JP57050889 relata um processo para obter uma grande quantidade do ácido micofenólico através do cultivo de um fungo do gênero *Penicillium* resistente à cerulenina (*Penicillium brevi-compactum* AJ117092 FERM-P No. 5689) e, deste modo, é capaz de produzir a substância.

25 Portanto, a técnica ainda necessita de um processo de produção e isolamento do ácido micofenólico cristalizado em uma etapa na extração e com alto grau de pureza do cultivo em meio líquido do *Penicillium* CASP5, isolado do café (*Coffea arabica* L.) em coco e/ou beneficiado, tal processo sendo descrito e reivindicado no presente pedido.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

De um modo amplo, o processo para produção e isolamento de ácido micofenólico e seus sais compreende:

30 a) inocular placas em meio de cultura BDA a partir de frutos esterilizados de café em coco e/ou beneficiado, obtendo fungos após incubação a temperatura ambiente;

- b) dessas placas assim inoculadas e incubadas, isolar, repicar e cultivar em meio líquido o fungo *Penicillium* sp.CASP5 por um período de tempo de 4 a 20 dias;
- c) separar o micélio e a fase aquosa através de uma filtração comum,
- d) submeter o filtrado (fase aquosa) a duas metodologias de extração:
- 5 e) metodologia **A** - acidificar a fase aquosa de pH = 7,0 para pH 3,0 a 1,0;
- f) realizar a primeira extração com solvente imiscível em água;
- g) metodologia **B-1** - o filtrado tendo pH em torno de 6,80 a 7,00, e elevar o pH em torno de 7,1 a 8,5;
- h) realizar a primeira extração com solvente imiscível em água (Extração de
10 Limpeza);
- i) metodologia **B-2** acidificar a fase aquosa após a extração de limpeza para pH = 6,5 a 1,0 e realizar uma nova extração com solvente imiscível em água (Extração Principal);
- j) reduzir a fase orgânica até 25 a 10 mL no rota-evaporador e, em seguida
15 acrescentar o mesmo volume de solvente à base de hidrocarbonetos e deixar a solução em repouso para o ácido micofenólico cristalizar.
- i) após a cristalização fazer uma lavagem dos cristais com água destilada acidificada (pH = 5,0 a 1,0) para remoção do pigmento, obtendo deste modo o ácido micofenólico cristalizado com alto grau de pureza.
- 20 Alternativamente é obtido o sal farmacêuticamente aceitável do ácido micofenólico.

Ainda alternativamente, é obtido o éster do ácido micofenólico, micofenolato mofetil.

Assim, a invenção provê um processo para produção e isolamento de ácido
25 micofenólico com 98% de pureza, seus sais ou o micofenolato mofetil, dito ácido sendo cristalizado na extração líquido/líquido de um cultivo de *Penicillium* sp. CASP5, isolado do fruto do café (*Coffea arabica* L.) em coco e/ou beneficiado após assepsia.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIGURA 1 anexa ilustra a fórmula do ácido micofenólico.

30 A FIGURA 2 anexa ilustra a fórmula do éster do ácido micofenólico, Micofenolato Mofetil – MMF.

A FIGURA 3 anexa ilustra o espectro de RMN ^1H do ácido micofenólico obtido pelo processo da invenção, utilizando como padrão interno a DMF em CDCl_3 .

A FIGURA 4A anexa ilustra o H-6 utilizado na integral da fórmula do ácido micofenólico enquanto a FIGURA 4B anexa ilustra a metila utilizada na integral da DMF no espectro do RMN de ^1H para o cálculo do grau de pureza.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

De acordo com a invenção, o meio BDA compreende Dextrose; Caldo de Batata, Agar; Sulfato de Estreptomicina.

O meio de cultura é o meio Czapek: $[(\text{NaNO}_3 (3,0 \text{ g/L}); \text{K}_2\text{HPO}_4 (1,0 \text{ g/L}); \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,5 \text{ g/L}); \text{KCl} (0,5 \text{ g/L}); \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} (0,01 \text{ g/L}); \text{Glucose} (10,0 \text{ a } 30,0 \text{ g/L}); \text{Extrato de Levedura} (8 \text{ a } 20 \text{ g/L}) \text{ e água destilada.}$

Alternativamente é possível usar águas minerais naturais com adição de uma fonte de carbono e aminoácidos ou proteínas.

Este meio de cultura útil compreende águas de fontes minerais naturais com adição de uma fonte de carbono, tais como, monossacarídeos, dissacarídeos, glicerol (10,0 a 30,0 g/L) e aminoácidos ou proteína (extrato de levedura 8 a 20 g/L).

A Tabela 1 a seguir ilustra as composições de algumas águas minerais naturais úteis no processo da invenção.

TABELA 1

Meio de Cultura	Ca	Fe	K	Mg	Na	S	Si	Sr
Sta Júlia	3,66	0	1,30	1,17	2,24	0	1,57	0,10
Vilella	0,51	0	1,38	0,08	1,89	0	4,53	0,07
Platina	5,53	0	3,38	1,04	40,64	9,74	28,00	0,89
Paiol	2,46	0	7,43	1,98	115,18	46,00	17,19	0,66
Vitória	11,04	0,01	10,41	6,65	118,20	61,46	18,65	0,88
Juventude	10,21	0	9,39	7,58	124,72	68,93	22,34	1,12
Meio/Czapek	0	2,01	710,03	48,78	811,18	66,04	0	0

*Concentração em mg/L

Nos experimentos com as águas minerais, foi adicionada somente uma das fontes de carbono e proteína, podendo ser monossacarídeos ou dissacarídeos ou ainda glicerol. Vantajosamente, esse procedimento reduz o tempo de preparo do meio de cultura, bem como o custo de produção, visto que alguns sais são caros.

Nos experimentos realizados com as águas observou-se uma produção de ácido micofenólico praticamente igual para todas as águas minerais em comparação com o cultivo no meio Czapek o que constitui uma vantagem competitiva da presente invenção.

Um aspecto da invenção é o cultivo do fungo *Penicillium* sp (CASP5) em águas minerais acrescidas de monossacarídeos, ou dissacarídeos ou glicerol e aminoácidos ou proteína (extrato de levedura).

Um outro aspecto da invenção é a produção do ácido micofenólico pelo dito fungo *Penicillium* sp. (CASP5) isolado a partir dos frutos do café em coco e/ou beneficiado após assepsia.

Um outro aspecto é um método para quantificação do ácido micofenólico na extração a partir de cálculos efetuados com base em um espectro de RMN ¹H dessa substância.

Os frutos do café são coletados da planta no estágio “cereja” e/ou “seco e colhido na planta” de maturação e armazenados em frascos plásticos em temperatura ambiente (umidade de 11%).

Em Laboratório de Microbiologia Ambiental (Embrapa Meio Ambiente) os frutos são inoculados. Os frutos são plaqueados em placas de Petri com BDA.

A esterilização dos frutos (café em coco e/ou beneficiado) seguiu a seguinte ordem de imersão: 5 a 60 segundos em um Becker de 100 mL com álcool 70%; na seqüência, passa-se os frutos por uma solução de hipoclorito a 2% ou imersão de 1 a 4 minutos e finalmente uma lavagem ou imersão por 1 minuto em água destilada e, em seguida os frutos são colocados dentro das placas com o meio de cultura (BDA). Todas as lavagens são feitas em câmara de fluxo laminar. As placas inoculadas com os frutos foram colocadas em uma sala de incubação (temperatura de 22-27 °C ± 1 °C).

Em seguida, são isolados e purificados todos os fungos que cresceram dos frutos. De várias placas inoculadas, somente em uma delas, cresceu o fungo (CASP5). Desta placa, foi retirado um pedaço da sua extremidade e colocado no centro de uma nova placa com meio BDA. Após 3 a 5 dias de incubação, fez-se o repique em várias placas com o mesmo meio de cultura e, estas são colocadas na sala de incubação para crescimento do fungo por 5 dias e conservados em meio Castelani, e o micélio após o cultivo de 7 a 8 dias a -80 °C.

O fungo CASP5 foi identificado por microscopia eletrônica de varredura no Laboratório de Microscopia da Embrapa. Através desta técnica, foi possível identificá-lo somente até gênero. O fungo CASP5 pertence ao gênero *Penicillium* e sua espécie será identificada através do seqüenciamento de DNA.

5 O *Penicillium* sp. CASP5 foi cultivado em Erlenmeyer (500 mL) com 200 mL de meio Czapek e/ou no meio com águas minerais e autoclavado por 10-20 minutos a 1 atm. Após o meio atingir a temperatura ambiente, fez-se a inoculação do fungo com uma suspensão de esporos 10-50 µL ou 1-5 discos (0,3 cm de diâmetro) por Erlenmeyer e, em seguida, os Erlenmeyer são levados à sala de incubação (25 a 27 °C) por 4 a 20 dias (maior
10 produção 11 dias) no modo estático ou com agitação mecânica.

Após o período de incubação, uma filtração comum (algodão) é efetuada para separação do micélio e o meio líquido ou filtrado, este é submetido a duas metodologias de extração:

Metodologia A: consiste em acidificar o meio aquoso após a filtração com o auxílio
15 de um ácido inorgânico como H₂SO₄, HCl ou similar, de pH = 7,0 para pH 3,0 a 1,0; e realiza-se uma extração com um solvente imiscível em água, como um éster ou cetona em C₄-C₇, ou diclorometano (3 x 200 mL).

Alternativamente é utilizada a *Metodologia B-1* - o filtrado apresenta pH em torno de 6,8 a 7,0 e, em seguida eleva-se o pH em torno de 7,1 a 9,0 e, realiza-se a primeira
20 extração (**Extração de Limpeza**) com um solvente imiscível em água, como um éster ou cetona em C₄-C₇, ou diclorometano (2x 200 mL).

A segunda extração da *Metodologia B-2*, chamada de **Extração Principal**, consiste em acidificar com o auxílio de um ácido inorgânico como H₂SO₄, HCl, ou similar, a fase aquosa após a extração de limpeza para pH = 5,0 a 1,0 e realiza-se uma nova extração com
25 um solvente imiscível em água, como um éster ou cetona em C₄-C₇, ou diclorometano (3 x 200 mL).

As fases orgânicas obtidas das extrações das metodologias *A e B-2* são reduzidas até 25 – 10 mL no rota-evaporador e, em seguida acrescentam-se o mesmo volume de hidrocarboneto como n-hexano e depois a solução é deixada em repouso para o ácido
30 micofenólico cristalizar.

Alternativamente, após a cristalização faz-se uma lavagem dos cristais com água destilada acidificada (pH = 5,0 a 1,0) para remoção do pigmento, obtendo-se deste modo, o

ácido micofenólico cristalizado com alto grau de pureza como mostra o espectro de RMN de ^1H

A Figura 3 é um espectro de RMN de ^1H obtido em um equipamento Bruker DRX400 de 9,4 Tesla (400,13 MHz para frequência do hidrogênio), utilizando uma sonda de 5 mm com detecção inversa (BBI) e gradiente de campo na direção do eixo z conforme o processo da invenção.

O espectro de RMN de ^1H do ácido micofenólico apresenta sinais de hidrogênios metílicos em 1,81 ppm (3H, *s*) e em 2,14 ppm (3H, *singleto*); um sinal de metoxila em 3,76 ppm (3H, *singleto*); sinais de hidrogênios metilênicos na região de 2,24 a 2,32 ppm, um *multiplete* largo (2H, *ml*), referente aos hidrogênios H-3a e H-3b; na região que compreende de 2,38 a 2,47 ppm um *multiplete* (2H, *m*), referente aos hidrogênios H-2a e H-2b; em 3,39 ppm o H-6 um *dublete* largo (2H, *d*); em 5,18 ppm H-1'a e H-1'b (2H, *sl*); um hidrogênio olefínico de 5,23 a 5,28 ppm referente ao H-5 um *multiplete* (1H, *m*).

No espectro de RMN de ^1H , a substância padrão (N,N-dimetilformamida) apresenta três sinais, sendo um em 7,89 ppm, sinal referente ao hidrogênio do grupo aldeído, e os outros dois sinais em 2,98 e 2,88 ppm, referentes às duas metilas.

Para o cálculo da pureza do ácido micofenólico em mg/mL foi utilizada a seguinte fórmula:

$$[\text{ác. micofenólico}] = [\text{DMF}]_{\text{mol/mL}} \frac{N_{\text{DMF}} \times A_{\text{ác. micofenólico}} \times MM_{\text{ác. micofenólico}}(\text{mg/mol})}{N_{\text{ác. micofenólico}} \times A_{\text{DMF}}}$$

onde:

N_{DMF} representa o número de hidrogênio relativo ao sinal do hidrogênio da metila em 2,98 ppm do padrão (DMF), utilizado na integral (igual a 3 hidrogênios) (FIGURA 4);

A_{DMF} representa a área da integral do padrão (DMF) no espectro de RMN de ^1H , calibrado em 1;

$A_{\text{ácido micofenólico}}$ representa a área da integral do hidrogênio H-6 (*dublete* em 3,39 ppm) no espectro de RMN de ^1H ;

$N_{\text{ácido micofenólico}}$ representa o número de hidrogênio relativo ao sinal do hidrogênio H-6 (CH_2 e 3,39 ppm) do ácido micofenólico (igual a 2 hidrogênios) (FIGURA 4).

Assim,

$[\text{DMF}] = 0,04703 \times 10^{-3} \text{ mol/mL}$;

$$N_{\text{DMF}} = 3;$$

$$A_{\text{DMF}} = 1;$$

$$A_{\text{ácido micofenólico}} = 0,47485;$$

$$N_{\text{ácido micofenólico}} = 2;$$

$$5 \quad MM_{\text{ácido micofenólico}} = 320.340,00 \text{ mg/mol.}$$

A Concentração calculada = 10,73 mg/mL ou 98% de ácido micofenólico presente em 11g de extrato.

Industrialmente, a filtração pode ser efetuada utilizando os dispositivos citados na publicação US2005250952.

10 A invenção será ilustrada adicionalmente pelos seguintes Exemplos não limitativos.

EXEMPLO 1

Este Exemplo ilustra as diferentes massas de ácido micofenólico que podem ser obtidas a partir de meios de cultura diversos: meio Czapek e a série de águas minerais. A Tabela 2 a seguir lista os resultados obtidos.

15

TABELA 2

Meios de Cultura	mg/50mL de meio de cultura 7 dias de fermentação do <i>Penicillium</i> sp. Casp5
Juventude	13,57
Paíol	14,08
Platina	13,89
Sta Júlia	14,86
Villela	15,38
Vitória	14,20
Czapek	16,11

EXEMPLO 2

Este é um Exemplo Comparativo. O *Penicillium* sp. CASP5 é cultivado em café moído com nitrogênio líquido e acrescido com 80 mL de água destilada, autoclavado por 15 minutos, inoculado com 3 discos os quais são incubados por 18 dias a temperatura ambiente. A extração é feita com diclorometano/ metanol ou acetato de etila/ metanol numa proporção de (7:3) por 24 h e em seguida realiza-se uma filtração comum e concentrado em rota-evaporador. O extrato obtido é analisado por RMN de ^1H e não apresenta nenhum sinal característico do ácido micofenólico, quando analisado por RMN de ^1H .

20

25

Vantajosamente, a espécie de fungo CASP5 produz a substância desejada liberando-a para o meio líquido, facilitando, deste modo, o seu isolamento já no processo de extração.

5 Outro aspecto relevante da presente invenção é a concentração da fase orgânica, em que o volume da fase orgânica é reduzido para 25 a 10 mL e o mesmo volume de hidrocarboneto como n-hexano é acrescentado. Neste momento, garante-se que a substância esteja totalmente solúvel, devido à temperatura do banho no rota-evaporador e quando o n-hexano é adicionado, a solubilidade e a temperatura são reduzidas e com o decorrer do tempo, ocorre a cristalização do ácido micofenólico. Portanto, a técnica de
10 isolamento e cristalização do ácido micofenólico ocorre em uma única etapa.

Após a cristalização, lavam-se os cristais com água destilada (pH = 5,0 – 1,0) para remoção do pigmento.

O processo proposto na invenção elimina etapas de purificação por meio de filtrações e/ou de recristalização como é feita na maioria das patentes relevantes
15 encontradas na busca de anterioridade.

Dentre as vantagens do presente processo pode-se citar as seguintes:

- ✓ O *Penicillium* sp. CASP5 produz a substância e a libera o meio de cultura.
- ✓ O processo de isolamento do ácido micofenólico é muito simples e não requer nenhuma técnica cromatográfica.
- 20 ✓ A utilização de um único solvente orgânico como o diclorometano, que facilita a sua recuperação para que ele possa ser reutilizado e, com isso, eliminam-se vários problemas em relação ao meio ambiente.
- ✓ A extração e a cristalização uma única etapa.
- ✓ A remoção do pigmento é muito simples, permitindo desse modo a obtenção do
25 ácido micofenólico com 98% de pureza.
- ✓ A maior produção do ácido micofenólico se dá em apenas 11 dias de fermentação.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção e isolamento de ácido micofenólico e seus sais a partir de frutos esterilizados de café em coco e/ou beneficiado após assepsia, caracterizado pelo dito processo compreender as seguintes etapas:
 - 5 a) inocular placas em meio de cultura BDA a partir de frutos esterilizados de café em coco e/ou beneficiado, obtendo fungos após incubação a temperatura ambiente;
 - b) dessas placas assim inoculadas e incubadas, isolar, repicar e cultivar em meio líquido o fungo *Penicillium* sp.CASP5 por um período de tempo de 4 a 20 dias;
 - c) após o cultivo em b), separar o micélio e a fase aquosa através de uma filtração
10 comum;
 - d) submeter o filtrado (fase aquosa) a duas metodologias de extração:
 - e) metodologia A - acidificar a fase aquosa de pH = 7,0 para pH 3,0 a 1,0 ;
 - f) realizar a primeira extração com solvente imiscível em água;
 - g) metodologia B-1 - o filtrado tendo pH em torno de 6,80 a 7,00, elevar o pH em
15 torno de 7,1 a 8,5;
 - h) realizar a primeira extração com solvente imiscível em água (Extração de Limpeza);
 - i) metodologia B-2 acidificar a fase aquosa após a extração de limpeza para pH = 6,5 a 1,0 e realizar uma nova extração com solvente imiscível em água (Extração
20 Principal);
 - j) reduzir a fase orgânica até 25 a 10 mL por evaporação rotatória e, em seguida acrescentar o mesmo volume de solvente à base de hidrocarbonetos e deixar a solução em repouso para o ácido micofenólico cristalizar; e
 - k) recuperar o ácido micofenólico cristalizado.
- 25 2. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por alternativamente após a cristalização fazer uma lavagem dos cristais com água destilada acidificada (pH = 5,0 a 1,0) para remoção do pigmento, obtendo assim o ácido micofenólico cristalizado com alto grau de pureza.
- 30 3. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo meio líquido da etapa b) ser o meio Czapek.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo meio líquido da etapa b) ser alternativamente constituído de águas minerais com a adição de uma única fonte de carbono e aminoácidos ou proteína.
5. Processo de acordo com a reivindicação 4 caracterizado pela fonte de carbono ser alternativamente um monossacarídeo, um dissacarídeo, ou glicerol em concentração entre 10,0 a 30,0 g/L e proteína, sob forma de extrato de levedura com 8 a 20 g/L.
6. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo tempo de cultivo da etapa b) ser de 11 dias.
10. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por permitir a quantificação do ácido micofenólico na extração a partir de cálculos efetuados com base em um espectro de RMN ^1H dessa substância.

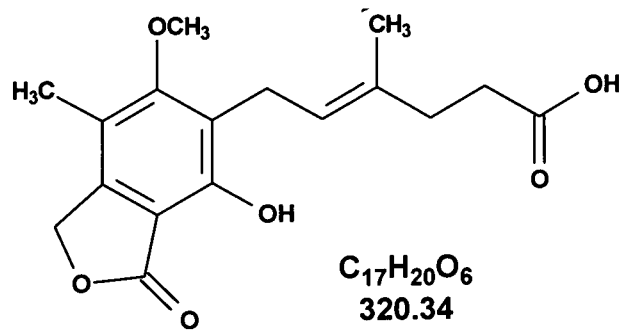
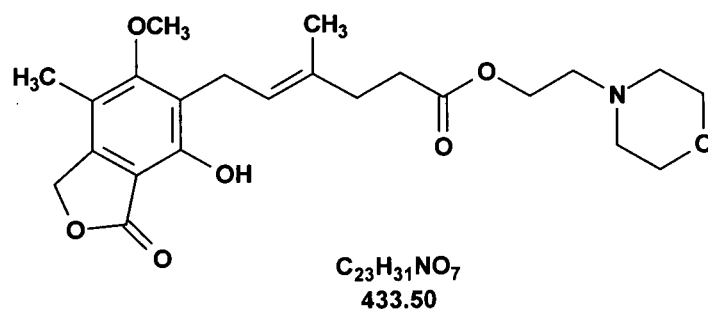
FIG. 1**FIG. 2**

FIG.3

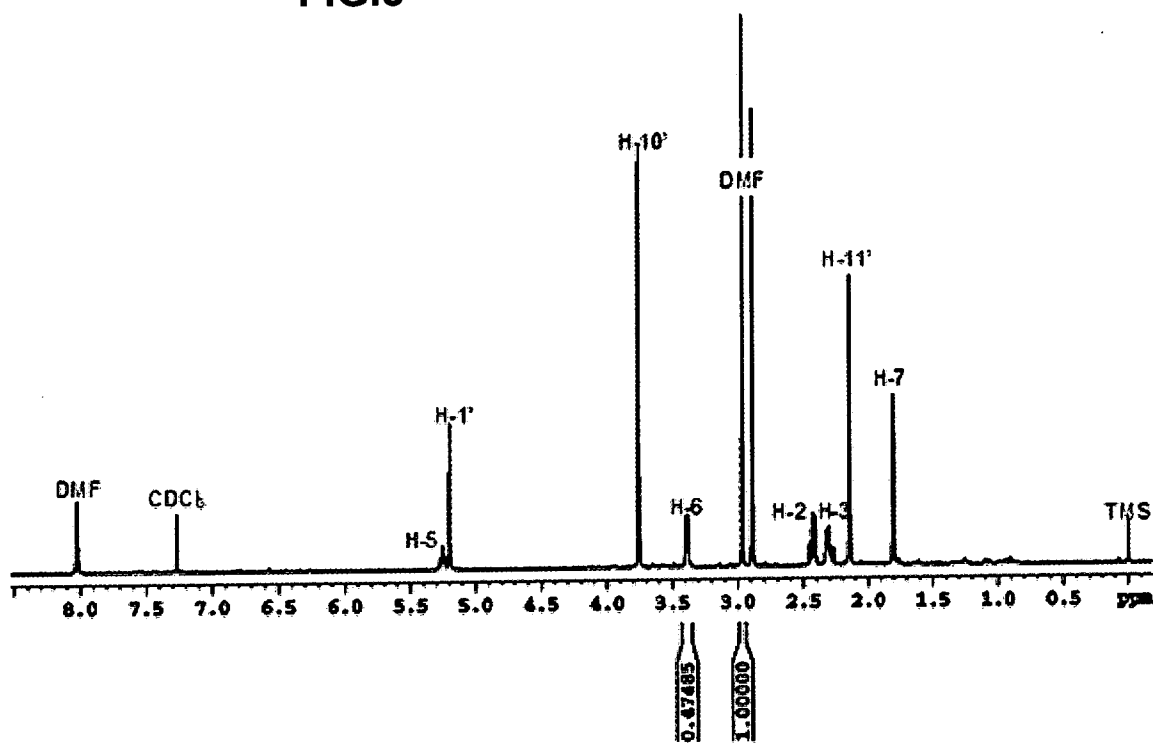


FIG.4A

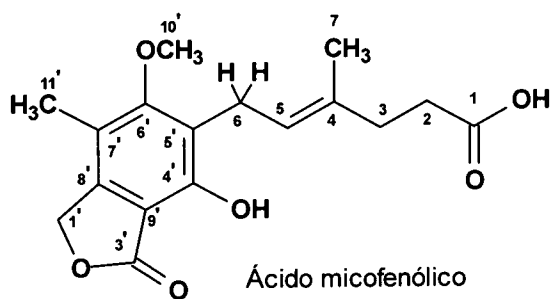
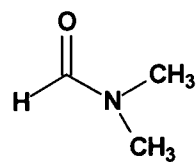


FIG. 4B



N,N-Dimetilformamida (DMF)

RESUMO

PL 070470-2

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO E ISOLAMENTO DE ÁCIDO MICOFENÓLICO E SEUS SAIS”.

É descrito um processo para produção e isolamento de ácido micofenólico e seus sais, o ácido micofenólico sendo cristalizado na extração líquido/líquido de um cultivo de *Penicillium* sp.CASP5, isolado do fruto do café (*Coffea arabica* L.) em coco e/ou beneficiado após assepsia. O processo compreende inocular placas em meio de cultura BDA a partir de frutos esterilizados de café em coco e/ou beneficiado, obtendo fungos após incubação a temperatura ambiente; dessas placas assim inoculadas e incubadas, isolar, repicar e cultivar o fungo *Penicillium* sp. CASP5 por um período de tempo entre 4 e 20 dias; filtrar para separar micélio e filtrado e submeter o filtrado a duas extrações; reduzir a fase orgânica obtida até 25 a 10 mL e em seguida acrescentar o mesmo volume de solvente à base de hidrocarbonetos e deixar a solução em repouso para o ácido micofenólico cristalizar; e recuperar o ácido micofenólico cristalizado com grau de pureza 98%, conforme obtido do espectro de RMN de ^1H .