República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

* B R 1 0 2 0 2 1 0 1 5 2 6 1 A 2 *

(21) BR 102021015261-3 A2

(22) Data do Depósito: 02/08/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 14/02/2023

(54) Título: DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE ALGINATO CONTENDO 1,2,4-OXADIAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE

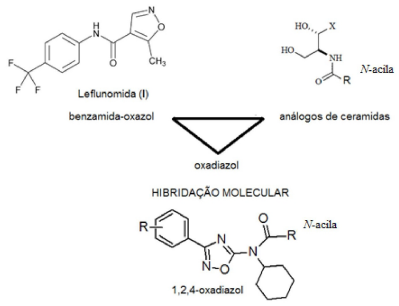
(51) Int. Cl.: A61K 47/56; A61K 47/02; A61K 31/41; A61P 17/06.

(52) CPC: A61K 47/56; A61K 47/02; A61K 31/41; A61P 17/06.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO (UFRPE).

(72) Inventor(es): MARIA EDUARDA DE FARIAS ALBUQUERQUE GASPAR DE OLIVEIRA; RONALDO NASCIMENTO DE OLIVEIRA; SEVERINO ALVES JUNIOR; IVONE ANTÔNIA DE SOUZA; VANESSA LUCÍLIA SILVEIRA DE MEDEIROS.

(57) Resumo: DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE ALGINATO CONTENDO 1,2,4-OXADIAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE. A presente invenção refere-se à preparação de um gel formado por alginato de sódio, suplementado com derivados de 1,2,4oxadiazóis, a citar: N-ciclohexil-3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C1), N -ciclohexil3-(4-metoxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C2), e N-ciclohexil-3-(4-fluor-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C3). Foram formados os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3, incolores, amorfos, com estabilidade físicoquímica, atóxicos, e com atividades biológicas antiinflamatória e cicatrizante, em modelo animal, para psoríase. Diante disso, os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3, descritos, apresentam potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica, ou em pesquisa, como tratamento tópico para lesões psoriáticas, cicatrização de feridas cutâneas ou queimaduras.



DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE ALGINATO CONTENDO 1,2,4-OXADIAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE

Campo da invenção

[001] A presente patente de invenção reporta desenvolvimento de gel formado por alginato, suplementado com derivados de 1,2,4-oxadiazóis, para o tratamento tópico da psoríase afim de reduzir os efeitos colaterais e toxicológicos da quimioterapia oral tradicional com o metotrexato, com novos potenciais antipsoriáticos.

Fundamentos da invenção

[002] A psoríase é uma doença inflamatória crônica autoimune, que afeta até 5% da população mundial. É caracterizada por hiperproliferação de queratinócitos, hiperplasia e infiltração maciça de leucócitos inflamatórios na epiderme e derme, em alguns casos pode atingir as articulações e causar artrite e/ou artrose (RAPALLI et al., 2020).

[003] Na atualidade, o tratamento da psoríase é composto por corticóides para quadros leves e localizado. Estima-se que 80 % dos casos de psoríase sejam leves existindo poucas opções terapêuticas para essa situação. Os corticoides tópicos não podem ser aplicados em áreas extensas e por períodos prolongados, pois induzem taquifilaxia, agravam a psoríase por efeito rebote e induzem efeitos adversos sistêmicos como hipertensão e síndrome de Cushing. Como primeira linha de tratamento sistêmico tem-se a fototerapia, o metotrexato (MTX) e Acitretina em casos graves ou com falha aos tópicos. A fototerapia a disponibilidade de um aparelho específico e o deslocamento do paciente para realizar o tratamento. O MTX é um antitumoral não específico que atua por citotoxicidade, provocando vários efeitos adversos toxicológicos (hepatotoxicidade, colite ulcerativa, nefrotoxicidade) que dificultam a sua aplicação terapêutica em muitos pacientes. A Acitretina é um derivado sintético da vitamina A que não pode ser utilizada em mulheres na idade fértil, em casos com alteração do colesterol e em alteração de função hepática e renal. Induz a uma xerose intensa e apresenta efeito cumulativo.

[004] O desafio para o tratamento tópico e sistémico da psoríase é a baixa penetração das drogas através da pele psoriática devido à alteração de descamação que aumenta o extrato córneo, ao espessamento anormal da epiderme e ao desequilíbrio lipídico, o que dificulta a penetração das drogas, limitando a eficácia terapêutica das mesmas. Um novo

e melhorado sistema de administração percutânea que vise superar a barreira do estrato córneo da pele psoriática é vital para o fármaco antipsoriático na terapia tópica.

[005] O avanço na tecnologia de planejamento e desenvolvimento de fármacos na química medicinal permite oportunidades para explorar moléculas sintéticas no campo da biologia, como o uso de polímeros naturais para liberação e permeação cutânea. A combinação de derivados sintéticos com biopolímeros solúveis em água como alginato de sódio, tem sido empregada para preparar hidrogéis biocompatíveis amplamente utilizados como curativos úmidos e componentes de pomadas para o tratamento de feridas secas como no caso das lesões.

[006] Dentre os materiais sintéticos utilizados para tratamentos de doenças autoimunes como a psoríase, temos a leflunomida, um oxazol (classe de heterociclo nitrogenado) conjugado com uma função amida, comumente usada como antirreumática, que tem sido uma alternativa para o metotrexato no tratamento de artrite reumatoide e recomendado em algumas condições dermatológica como psoríase e artrite psoriática (RENDON; SCHÄKEL, 2019; SEHGAL; VERMA, 2013).

[007] O sistema de anel heteroaromático é a parte fulcral de uma molécula biologicamente ativa, principalmente por fornecer similaridade com relação aos compostos bioquímicos dentro do nosso organismo, como por exemplo, todos os ácidos nucléicos, hormônios, e neurotransmissores.

[008] Os oxadiazóis são bioisósteros de amidas e ésteres , que podem contribuir com propriedades farmacocinéticas significativas como o aumento da lipofilicidade, que influencia na capacidade do fármaco alcançar o alvo por transmembranária. Os oxadiazóis possuem diversas propriedades biológicas, entre elas atividade antiinflamatória, antidepressiva, antiproliferativa, antifúngica, antibacteriana e antituberculose (CANESCHI et al., 2019; DESAI et al., 2016; KHATIK et al., 2012; MODI; MODI, 2012; PACE et al., 2015; SIRGAMALLA; BODA, 2019).

[009] No âmbito da administração tópica, os hidrogéis possuem características que os tornam ideais, devido a sua capacidade oclusiva, aumentam a umidade e a hidratação da pele, consequentemente, a permeação de medicamentos. Hidrogéis são amplamente utilizados curativos úmidos e componentes de pomadas para o tratamento de feridas secas como no caso das lesões psoriáticas (CALÓ; KHUTORYANSKIY, 2015; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

[010] Como já mencionado, o aumento do extrato córneo em geral, é uma das características da psoríase que dificultam a atuação de medicamentos, pois bloqueiam o contato do mesmo com as outras camadas da epiderme. Espera-se que a utilização de géis de alginato amoleçam as escamas, façam um efeito oclusivo e assim permitam a penetração dos derivados de 1,2,4-oxadiazóis contidos em suas estruturas, ajudando na absorção do estrato córneo e proporcionando um efeito mais rápido de cicatrização das lesões psoriáticas. Desta forma, a presente patente de invenção propõe utilizar o gel de alginato com derivados de 1,2,4-oxadiazóis (Alg@ox) para o tratamento de lesões cutâneas da psoríase. A proposta sintética tem como ponto de partida a hibridação molecular da Leflunomida (I) e análogos de ceramidas (Figura 1). Neste processo, propomos a síntese de derivados 1,2,4-oxadiazólicos 3,5-dissubistituídos, sendo na posição 3 grupos aromáticos, e na posição 5 o grupo *N*-acila, contendo uma série homóloga de carbono, visando maior lipofilia dos compostos. Nosso objetivo é preparar compostos com o grupo *N*-acila, e não acilados para obtenção de novos candidatos a fármaco com atividade antipsoriática.

Descrição da invenção

[011] A fabricação do Alg@ox ocorreu em três etapas, obtendo-se três produtos diferentes. Na primeira etapa, foi realizada a obtenção dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos. Inicialmente, reação das aril-amidoximas com o diciclohexilcarbodiimida (DCC) dissolvidos em dimetilformamida (DMF), sob irradiação de micro-ondas por 10 minutos a 120 °C. Após esta etapa, a reação de acilação com cloretos ácidos de cadeia curta e longa, formando as amidas conjugadas com o heterociclo 1,2,4-oxadiazol, contendo vários substituintes ligados ao anel fenila: *N*-Ciclohexil-3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C1**); *N*-Ciclohexil-3-(4-metoxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C2**); e *N*-Ciclohexil-3-(4-fluor-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C3**) – Figura 2.

[012] As caracterizações dos compostos foram realizadas através de análise elementar e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{1}H e ^{13}C) e infravermelho (FTIR). A terceira etapa foi realizada para preparar os géis de alginato empregando os compostos sintetizados **C1**, **C2** e **C3**. Foram preparadas as Soluções com 0,2 g de Alginato (Alg) dissolvidos em 5 mL de água deionizada em agitação constante por 1 h, a temperatura de 40°C. Após total solubilização, 10 mg de cada composto (**C1**, **C2** e **C3)**

foram solubilizados, separadamente, em 500 mL de DMSO e adicionados a solução de alginato, em agitação por 12 h. Assim foram obtidos os géis Alg@C1, Alg@C2, e Alg@C3, concentração final de 102 mmol, 411 mmol e 375mmol, respectivamente (Figura 3).

[013] Posteriormente à obtenção dos géis Alg@C1, Alg@C2, e Alg@C3, foram realizados os testes físico-químicos e avaliações biológicas *in vitro* e *in vivo*.

[014] A citotoxicidade dos géis e dos compostos foi realizada através do método de MTT – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. A linhagem celular utilizada foi a RAW 264.7 (macrófagos murinos), mantidos em meio de cultura DMEM com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 ºC em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO_2. As células RAW 264.7 (6,615 x 10^6 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 48 h. Em seguida os compostos **C1**, **C2** e **C3** foram solubilizados em 1 mL de água ultrapura e 50 µL de DMSO; e para os géis 500 µL do gel puro + 500 µL de meio. Foram adicionadas aos poços 100 µL de meio (16 mL de DMEM + 14 mL de PBS) + 100 µL de amostra nas concentrações de 100 a 3,125 µg/mL. Após 48 h de reincubação, foram adicionados 25 µL de MTT (5.000 µg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado em cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicada e a concentração inibitória 50 % (IC50) foi calculada a partir da curva concentração-resposta de cada composto, utilizando-se o software GraphPad Prism 7. A IC50 é a potência do fármaco ou a concentração em que o fármaco produz 50% de seu efeito máximo.

[015] Ainda nos testes *in vitro*, foram realizados testes de hemólise a fim avaliar o efeito tóxico dos compostos em contato com células sanguíneas. Foram coletados 5 mL de sangue humano por punção venosa em tubo com anticoagulante, contendo em cada tubo um tipo sanguíneo dos quatro do sistema ABO (A, B, AB e O) com Rh positivo (Comitê de ética - CAAE 38726620.6.000.5048). Em seguida é preparada uma solução de hemácias, onde o sangue total é centrifugado a 3.500 rpm por 5 minutos, depois o sobrenadante (plasma e a camada leucocitária) é aspirado e descartado. Após a remoção total do sobrenadante, foi adicionado uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) no mesmo volume do sobrenadante que foi removido e novamente

centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos (repetido por o procedimento por duas vezes). Após as lavagens, a solução de hemácias foi preparada á 0,5%, com 250 µl de hemácias adicionados em 50 mL de solução salina e homogeneizado.

[016] Para o ensaio hemolítico, foi realizada uma microdiluição onde no primeiro eppendorf possui 200µl dos compostos mais 200µl de solução salina e homogeneizados. Nos demais eppendorfs foi adicionado previamente 200µl de solução salina, e sem seguida mais 200µl do 1º eppendorf para realização da microdiluição. No último eppendorf, serão desprezados 200µl, para um volume final de 400µl em cada eppendorf. Após a realização da microdiluição, foi adicionado em cada 200µl da solução de hemácias em cada eppendorf e postos para incubação por 1h a 37 °C. Passado o período de incubação, os eppendorfs foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Após centrifugação, retirado 100µl do sobrenadante de cada concentração testada e adicionar em uma placa de 96 poços para leitura da absorbância (540nm). O controle negativo foi à solução salina (400µl da solução de hemácias + 400µl da solução salina) e o controle positivo foi o Triton X-100 (400µl da solução de hemácias + 400µl da solução de Triton).

[017] O teste foi realizado em duplicada com duas repetições independentes (repetição realizada em dias diferentes com o mesmo tipo sanguíneo, porém de origem diferente – humano diferente da primeira análise). Para obtenção da porcentagem de hemólise, é realizado um cálculo descrito abaixo:

Porcentagem de Hemólise:

% Hemólise: ABS teste X 100 / ABS C+ ou C-

Onde: ABS teste é a absorbância das amostras teste, multiplicado por cem e dividido pela média da absorbância dos controles (ABS C+ ou C-).

[018] Foram realizados testes *in vivo* (Comitê de ética - Processo nº 0005/2019) a fim de avaliar o potencial antipsoriático dos géis. Os ensaios *in vivo* foram realizados com 21 camundongos albinos BALB/c, machos, com 8 semanas de idade, divididos em 7 grupos com 3 animais cada. Os animais foram alojados sob condições específicas isentas de agentes patogénicos a níveis constantes de humidade e temperatura em ciclos claro / escuro de 12 h, fornecidos com água e alimentos à vontade. Os animais foram

anestesiados com Ketamina associada à Xilazina 2:1, sob administração subcutânea (Dose determinada pelo peso corporal do animal - 10%). A pele então foi tricotomizado para retirada total dos pelos, 1 cm^2, e depois a dermatite psoriática foi induzida pela aplicação tópica de imiquimode (®Modik - IMQ). Os animais tratados topicamente com 50 mg/g de um creme comercial contendo 5 % de IMQ (Modik, Germed) traduzindo em dose diária de 2,5 mg do composto ativo, no dorso do animal por 4 dias consecutivos até uma pele semelhante à inflamação da psoríase seja aparente (Figura 4).

[019] Após a indução da patologia, foi realizado o tratamento das lesões com os géis fabricados. Os grupos foram tratados (cada um com Alg@C1/Alg@C2/Alg@C3/Alg/MTX) por 4 dias consecutivos com doses iguais de 1 mg/g do gel sobre as lesões psoriáticas. O controle negativo (animal branco) foi o animal sem indução da psoríase. Dois controles positivos, um com o animal induzido sem tratamento e o outro tratado apenas com Dipropionato de Betametasona (®Daivobet - Leo Pharma/ PI000995-2), gel tópico utilizado no tratamento convencional.

[020] Após 24h de tratamento os animais foram novamente anestesiados e realizados a punção cárdica do sangue total para análises bioquímicas e hematológicas. Foram retirados os órgãos pra análise histológica (pele, fígado, rim e baço). As carcaças foram esterilizadas por autoclavação a 121 ºC durante 30 minutos.

[021] Para os géis Alg@C1/Alg@C2/Alg@C3 foram feitas análises de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, difração de Raio-X (DRX), termogravimétrica (TGA).

Exemplos de concretizações da invenção

[022] A seguir, será apresentado o detalhamento das evidências para a presente patente de invenção.

[023] Na avaliação citotóxica dos oxadiazóis, a molécula que apresentou maior citotoxicidade foi C1 com uma IC50 de 4,6 µg/mL, o composto C2 não apresentou toxicidade nas células testadas com 182 µg/mL e o composto C3 apresentou uma citotoxicidade moderada com IC50 83 µg/mL (Figura 5). O gel de Alginato e os derivados Alg@C1, Alg@C2, Alg@C3 não apresentaram citotoxicidade nas células de estudo (RAW 264.7), ambos com IC50 acima de 300 µ/ml.

[024] Em alguns estudos, foram observados que a citotoxicidade de aril-oxadiazóis está

relacionada com o grupo substituinte do anel aromático. Estudos de SAR revelaram que a atividade aumenta com a presença de grupos retiradores de elétrons na seguinte ordem: F> Cl > Br > NO_2 > CH_3 > CH_3O (CANESCHI et al., 2019; KAVITHA; KANNAN; GNANAVEL, 2017; SIRGAMALLA; BODA, 2019).

[025] No estudo hemolítico (Figura 6), observamos que o MTX possui uma atividade hemolítica baixa e diferente nos quatro tipos sanguíneos, tendo mais efeito hemolítico nos grupos A+ e AB+. Um composto só é considerado hemorrágico, quando o mesmo apresenta uma porcentagem de hemólise igual ou maior que 5%.

[026] O MTX é um pró-fármaco, como tal precisa ser metabolizado para que possa ter sua molécula ativa, sendo assim não apresentando efeitos tóxicos *in vitro* como observados em nossos resultados. No entanto, o MTX quando misturado no Gel de alginato, obteve efeitos hemolíticos ainda menores do que o fármaco puro. Por ser um biopolímero natural e atóxico, o alginato não apresentou hemólise nos eritrócitos dos quatro tipos de ABO e diminuiu a toxicidade do MTX (CHOI et al., 2011; PANONNUMMAL; SABITHA, 2018).

[027] Analisando os nossos compostos Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3 apresentaram atividade hemolítica ≤ 5%, sendo menores também que os resultados do MTX puro. O composto Alg@C3 possuiu a menor capacidade de produzir hemólise nos eritrócitos, se aproximando dos resultados observados do gel de alginato puro (Figura 6), o que amplia o uso biológico e a via de administração do produto.

[028] Na avaliação *in vivo*, as lesões evoluíram para grau 4 (psoríase nível grave) após 4 dias de indução da patologia. As lesões foram tratadas durante 4 dias consecutivos, sendo avaliadas a cada 24 horas. Os animais do grupo C- (controle negativo) desenvolveram lesões abertas na pele, perda de peso, dificuldade motora (possível inflamação das articulações) e a pele estava histológicamente com hiperqueratinização, descaracterização morfológicada epiderme, infiltrado inflamatório (Figura 7 - **a**), características patológicas da psoríase.

[029] Seguindo o protocolo de não sofrimento animal recomendado pelo comitê de ética, todos os animais do controle negativo foram eutanasiados antes do fim do experimento. O grupo C+ (controle positivo) foi tratado durante 4 dias com a medicação tópica comercial utilizada no tratamento padrão para de casos moderados da psoríase. Os animais do grupo C+ (Figura 7 - **b**) desenvolveram descamação moderada da pele,

sem perda de peso e comprometimento motor, ao fim do último dia de experimento os animais ainda apresentavam descamação na pele. Na histologia foi observado paraqueratose, descaracterização morfológicada da epiderme, edema e hipergranulações (WAGNER et al., 2010).

[030] O grupo tratado com Alg@MTX (Figura 7 - **c**) desenvolveram lesões e descamação moderada, com perda de peso, desidratação, urina esverdeada, flacidez do tecido. A histologia apresentou hiperqueraquose, hipergranulação e microabscessos de Munro (acúmulo de neutrófilos na epiderme). Com a conjugação do gel de alginato, o fármaco foi rapidamente absorvido passando pela espessa camada do estrato córneo. Como já relatado anteriormente, o MTX é um pró-fármaco (ativado somente após biotransformação) e nos testes *in vivo* foi metabolizado com efeitos toxicológicos severos ao organismo (AICKARA et al., 2020; KHAFAGA; EL-SAYED, 2018).

[031] Os efeitos adversos no organismo já são conhecidos na literatura com administração do MTX via oral e intravenoso citados aqui no início da patente. O grupo tratado com gel de alginato puro (Figura 7 - **d**) não apresentou diminuição da descamação, nem efeitos toxicológicos foram observados. Na histologia, o tecido apresentou pouca queratinização, descaraterização morfológica da epiderme, hipergranulação, mas sem infiltrado inflamatório.

[032] O Alginato vem sendo bastante utilizado na indústria farmacêutica por suas propriedades como compensação de toxicidade, tais como encontrados em algumas patentes descritos como membranas de alginato para incorporação de fármacos (BRPI1004841-3 - 19/03/2013) em cicatrização de lesões por pressão, em forma de hidrogel contendo vitaminas do complexo B para cicatrização de feridas na pele (BRPI 1107193-1 - 29/05/2018), fibras de alginato para tratamento e higienização de feridas úmidas na pele (BR 10 2014 027123-6), entre outros. Além disso, é hipoalérgico e atóxico, por isso utilizado aqui como material para base dos nossos géis de liberação tópica (GOMBOTZ; PETTIT, ; URZEDO et al., 2020).

[033] Os melhores resultados observados *in vivo* foram os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3. O grupo tratado com Alg@C1 (Figura 7 - **e**) apresentou regressão da descamação na pele em 4 dias, os animais ganharam peso e na análise histológica havia uma queratinização normal do tecido, contudo ainda tinha espessamente da epiderme. O grupo Alg@C2 (Figura 7 - **f**) apresentou efeito de cicatrização de feridas em grau 3,

sem sinais de infecção ou toxicidade sistêmicas (Figura 8). Foi observado na histologia um tecido cicatrizado, sem espessamento da epiderme, nem presença de células inflamatórias. Os animais do grupo Alg@C3 (Figura 7 - **g**), obtiveram lesões regredidas em 3 dias, observado na histologia uma pele saudável com vários folículos pilosos emergindo.

[034] Os 1,2,4-oxadiazóis são bioisósteros de amidas e ésteres, que podem contribuir com propriedades farmacocinéticas significativas devido à presença do grupo azole (N–, C–, O–) no núcleo oxadiazol, o que aumenta a lipofilicidade, que influencia a capacidade do fármaco para alcançar o alvo por difusão transmembranária e pode potencializar a atividade biológica como antiinflamatória, antiproliferativo e antibacteriano. Tais características influenciaram os resultados *in vivo* apresentados nesta patente, e que conjugados com o gel de alginato teve um aumento na cicatrização em menor tempo, controle da inflamação das lesões psoriáticas e sem sinais toxicológicos fisiológicos - Figura 8 (BAJAJ et al., 2015; KAVITHA; KANNAN; GNANAVEL, 2017; MODI; MODI, 2012).

[035] Os espectros de RMN e FTIR comprovam as estruturas dos derivados 1,2,4-oxadiazólicos (DE OLIVEIRA et al., 2018).

[036] Na análise de FTIR, dos géis Alg@C1/Alg@C2/Alg@C3 foi observado uma interação por pontes de hidrogênio (Figura 9).

[037] Nas análises de DRX (Figura 10) foi observado que todas as amostras mantiveram o perfil de material amorfo, característica comum de polímeros como alginato e sem sinais de cristalização dos oxadiazóis, provavelmente devido ao Alginato de sódio estar em maior quantidade sobrepondo as demais moléculas (YU et al., 2009).

[038] Nas análises termogravimétricas, observamos primeiro evento identificado do gel de alginato relacionado com uma pequena perda de massa abaixo de 110°C, atribuída à perda de água devido à desidratação e depois em 150 °C estabiliza ficando apenas a massa residual carbonizando. O composto Alg@C1 é o que possui os eventos diferentes dos demais, o primeiro evento foi em torno de 110 °C devido a desidratação e o segundo em 224 °C referente à perda de massa inicial, atribuída à degradação térmica do biopolímero conjugado ao oxadiazol, um terceiro estágio foi observado referente à decomposição do Na_2CO_3 (Figura 11). Os compostos Alg@C2 (*p*-OCH_3) e Alg@C3 (*p*-F) apresentaram eventos termogravimétricos semelhantes, com o primeiro

evento em 210 °C e o segundo em 240 °C. Esses resultados são um importante indicado no controle de qualidade e estabilidade de potenciais produtos industriais, no qual é monitorada a variação da massa do produto em função de temperaturas variadas.

Breve descrição dos desenhos

[039] A seguir, será apresentada uma breve descrição das figuras utilizadas nesta patente de invenção. As características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes na descrição detalhada das características e resultados da invenção, com referências às figuras anexas. Figura 1 Hibridação molecular da Leflunomida (I) com 1,2,4-oxadiazólicos, na posição 3 grupos aromáticos e na posição 5 o grupo *N*-acila. Figura 2 representa de forma esquemática a síntese dos oxidiazóis C1, C2 e C3. Figura 3 mostra os Géis Alg@C1, Alg@C2, e Alg@C3 após o processo de síntese. Figura 4 mostra o esquema visual da avaliação *in vivo* com Balb/C. Modelo animal para psoríase, induzida por 4 dias com imiquimode (IMQ). Figura 5 apresenta a estrutura molecular dos 1,2,4-Oxadiazóis (C1 *N*-ciclohexil-3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina; C2 *N*-Ciclohexil-3- (4-metoxifenil)-; C3 *N*-Ciclohexil-3-(4-fluorofenil)-) e suas respectivas atividades citotóxicas em macrófagos (Raw 264.7). Figura 6 mostra a representação em gráfico dos testes hemolíticos com o percentual de hemólise nas concentrações de 15µg/mL - 500 µg/mL dos compostos MTX, Alg@MTX, ALG, Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3 nos quatro tipos de sangue AB+, B+, A+ e O+. Figura 7 mostra com detalhes as observações do modelo animal para tratamento tópico da psoríase com o resultado histológico em destaque ao lado, onde é possível observar que os animais tratados com os nossos géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3 (e), f) e g), respectivamente) obtiveram melhor cicatrização e resultados quando comparados com os controle positivo (b) e o MTX (c). Figura 8 mostra o resultado da análise fisiológica dos géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3 e controle 24 h após a última aplicação tópica nos animais. Figura 9 apresenta os espectros de FTIR do gel de Alginato (Alg) puro e dos Géis Alg@**C1**, Alg@**C2** e Alg@**C3**. Figura 10 apresenta os resultados dos espetros de DRX dos compostos em gel alginato puro, e os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3. Figura 11 são observados os espectros obtidos na análise termogravimétrica do gel alginato puro, e géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3.

Referências

[040] AICKARA, D. et al. Topical methotrexate in dermatology: a review of the literature. **Journal of Dermatological Treatment**, 2020.

[041] BAJAJ, S. et al. 1,3,4-Oxadiazoles: An emerging scaffold to target growth factors, enzymes and kinases as anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 124–141, 2015.

[042] CALÓ, E.; KHUTORYANSKIY, V. V. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252–267, 1 abr. 2015.

[043] CANESCHI, W. et al. Synthesis and anticancer evaluation of new lipophilic 1,2,4 and 1,3,4-oxadiazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 18–30, 2019.

[044] CHOI, J. et al. Physicochemical Characterization and In Vitro Hemolysis Evaluation of Silver Nanoparticles. **Toxicological Sciences**, v. 123, n. 1, p. 133–143, 1 set. 2011.

[045] DE OLIVEIRA, V. N. M. et al. Focused microwave irradiation-assisted synthesis of N-cyclohexyl-1,2,4-oxadiazole derivatives with antitumor activity. **Synthetic Communications**, v. 48, n. 19, p. 2522–2532, 2018.

[046] DESAI, N. C. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular docking study of some novel indole and pyridine based 1,3,4-oxadiazole derivatives as potential antitubercular agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 7, p. 1776–1783, 2016.

[047] GOMBOTZ, W. R.; PETTIT, D. K. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. **Bioconjugate chemistry**, v. 6, n. 4, p. 332–51, jan. .

[048] KAVITHA, S.; KANNAN, K.; GNANAVEL, S. Synthesis, characterization and biological evaluation of novel 2,5 substituted-1,3,4 oxadiazole derivatives. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 3, p. 337–345, 2017.

[049] KHAFAGA, A. F.; EL-SAYED, Y. S. Spirulina ameliorates methotrexate hepatotoxicity via antioxidant, immune stimulation, and proinflammatory cytokines and apoptotic proteins modulation. **Life Sciences**, v. 196, p. 9–17, 1 mar. 2018.

[050] KHATIK, G. L. et al. 1,2,4-Oxadiazoles: A new class of anti-prostate cancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 5, p. 1912–1916, 1 mar. 2012.

[051] LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

[052] MODI, V.; MODI, P. Oxadiazole: Synthesis, characterization and biological activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 16, n. 3, p. 327–332, 2012.

[053] PACE, A. et al. Recent Advances in the Chemistry of 1,2,4-Oxadiazoles. **Advances in Heterocyclic Chemistry**, v. 116, p. 85–136, 2015.

[054] PANONNUMMAL, R.; SABITHA, M. Anti-psoriatic and toxicity evaluation of methotrexate loaded chitin nanogel in imiquimod induced mice model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 110, p. 245–258, 2018.

[055] RAPALLI, V. K. et al. **Psoriasis: pathological mechanisms, current pharmacological therapies, and emerging drug delivery systemsDrug Discovery Today**Elsevier Ltd, , 1 dez. 2020.

[056] RENDON, A.; SCHÄKEL, K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 6, p. 1475, 23 mar. 2019.

[057] SEHGAL, V. N.; VERMA, P. Leflunomide: dermatologic perspective. **Journal of Dermatological Treatment**, v. 24, n. 2, p. 89–95, 2013.

[058] SIRGAMALLA, R.; BODA, S. Synthesis, characterization, molecular docking and biological evaluation of novel 6-halo-2-(4-((5-phenyl-1, 3, 4-oxadiazol-2-yl)methoxy)Substituted phenyl)-1 H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. **Chemical Data Collections**, v. 22, p. 100248, 2019.

[059] URZEDO, A. L. et al. Materials Science & Engineering C Multifunctional alginate nanoparticles containing nitric oxide donor and silver nanoparticles for biomedical applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 112, n. March, p. 110933, 2020.

[060] WAGNER, E. F. et al. Psoriasis: what we have learned from mouse models. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 704–714, 28 dez. 2010.

[061] YU, C.-Y. et al. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 68, n. 2, p. 245–249, fev. 2009.

REIVINDICAÇÕES

1) Gel de alginato **caracterizado** por ser constituído **pela** suplementação de derivados de 1,2,4-oxadiazóis (Alg@ox – C1, C2, C3) e suas respectivas atividades citotóxicas em macrófagos (Raw 264.7) e antipsoriáticas *in vivo* com camudongos albinos BALB/c.

2) Gel de alginato, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** formulação preferencial da suplementação com as moléculas *N*-Ciclohexil-3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C1**); *N*-Ciclohexil-3-(4-metoxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C2**); e *N*-Ciclohexil-3-(4-fluor-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (**C3**).

3) Gel de alginato, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** formulação da suplementação da hibridação molecular da Leflunomida com os derivados 1,2,4-oxadiazólicos 3,5-dissubistituídos, com a substituição na posição 3 contendo grupos aromáticos, e na posição 5 pelo grupo *N*-acila, de cadeia curta e longa (metila, etila, propila, n-butila, n-pentila, n-decano, n-dodecano, etc), contemplando uma nova série de derivados na obtenção de candidatos a fármaco com atividade antipsoriática.

4) Uso do gel de alginato (Alg@ox – C1, C2, C3) definido na reivindicação 01, **caracterizado por ser utilizado** na terapia tópica de lesões psoriáticas, cicatrização de lesões epiteliais, lesões infecciosas, tratamento de inflamações cutâneas e queimaduras.

DESENHOS

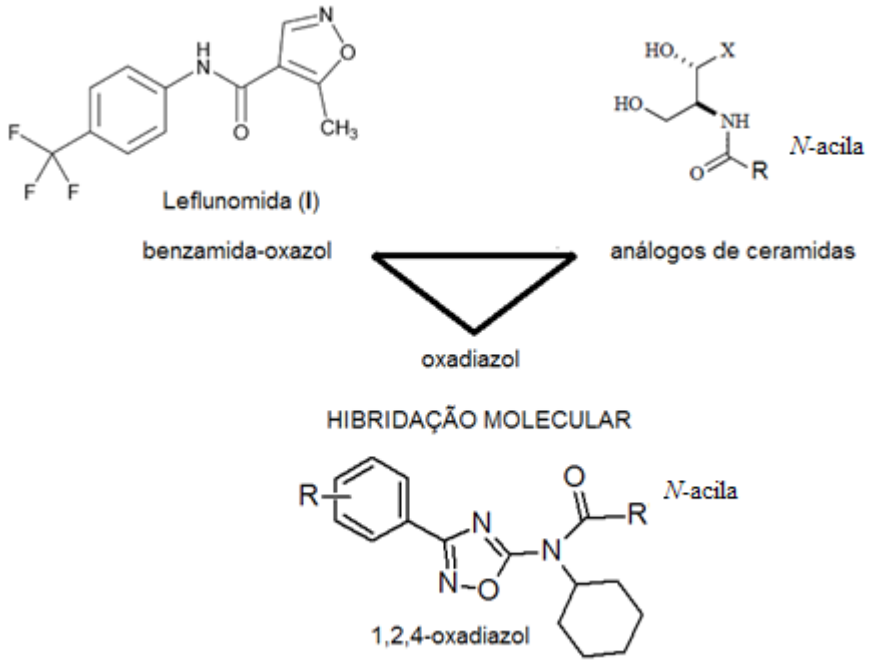


Figura 1

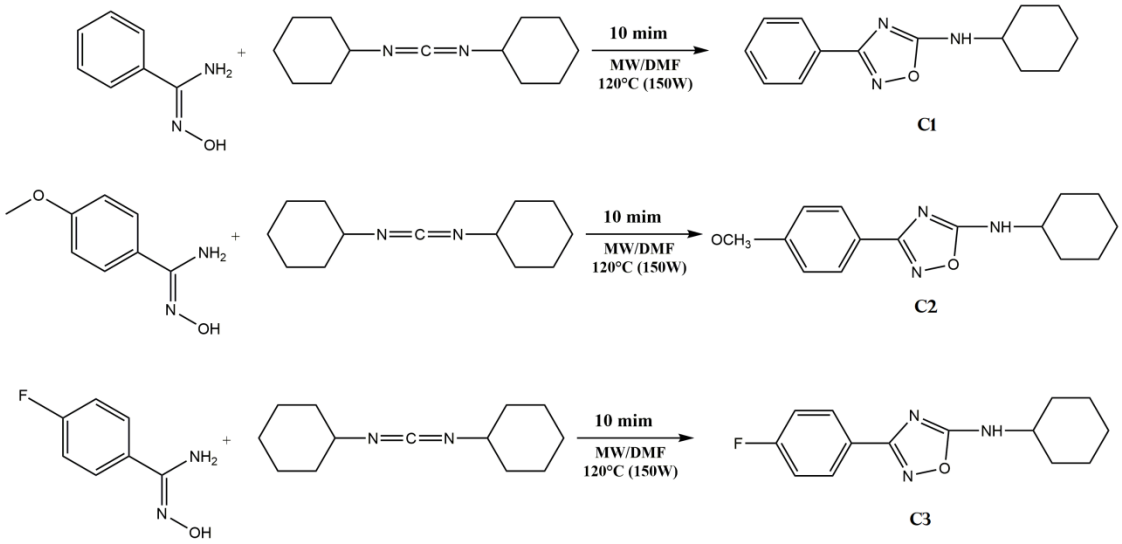


Figura 2

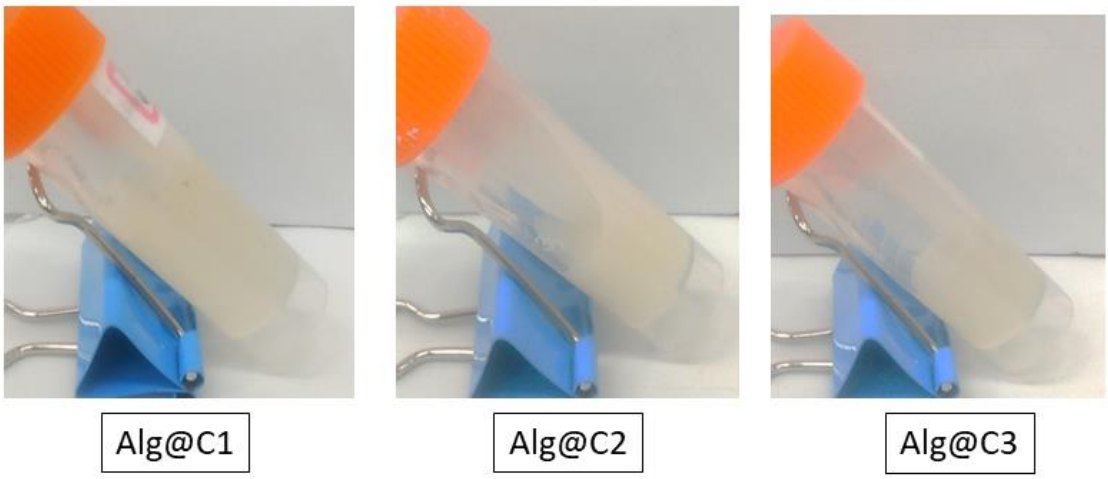


Figura 3

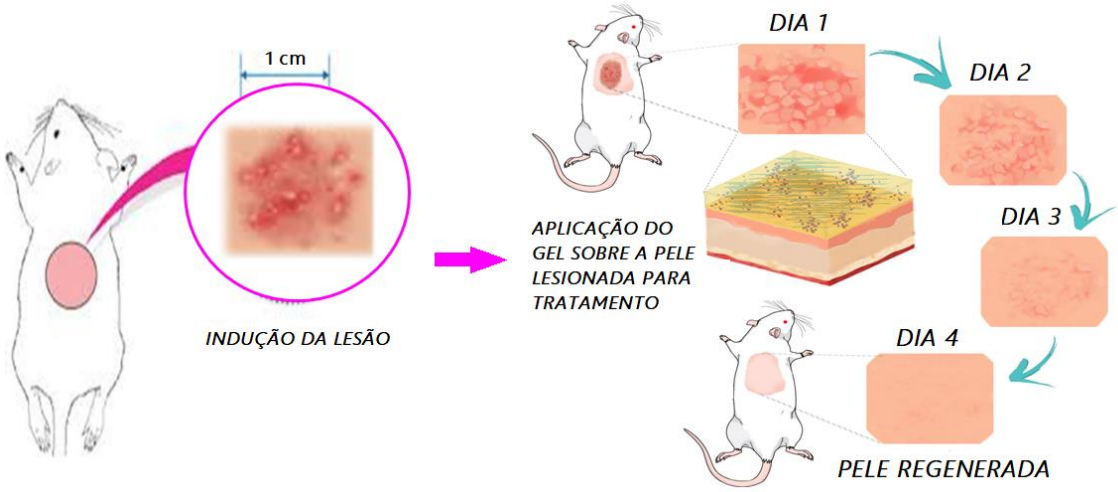


Figura 4

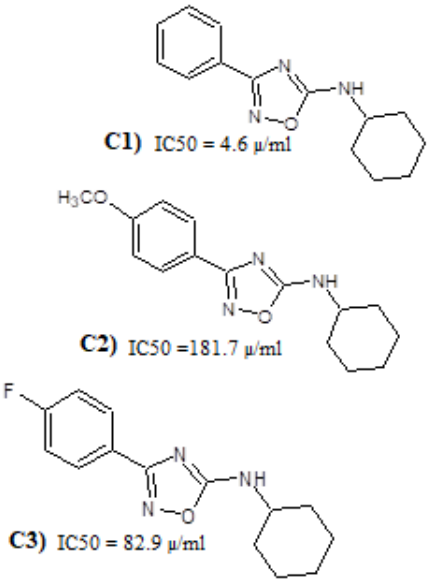


Figura 5

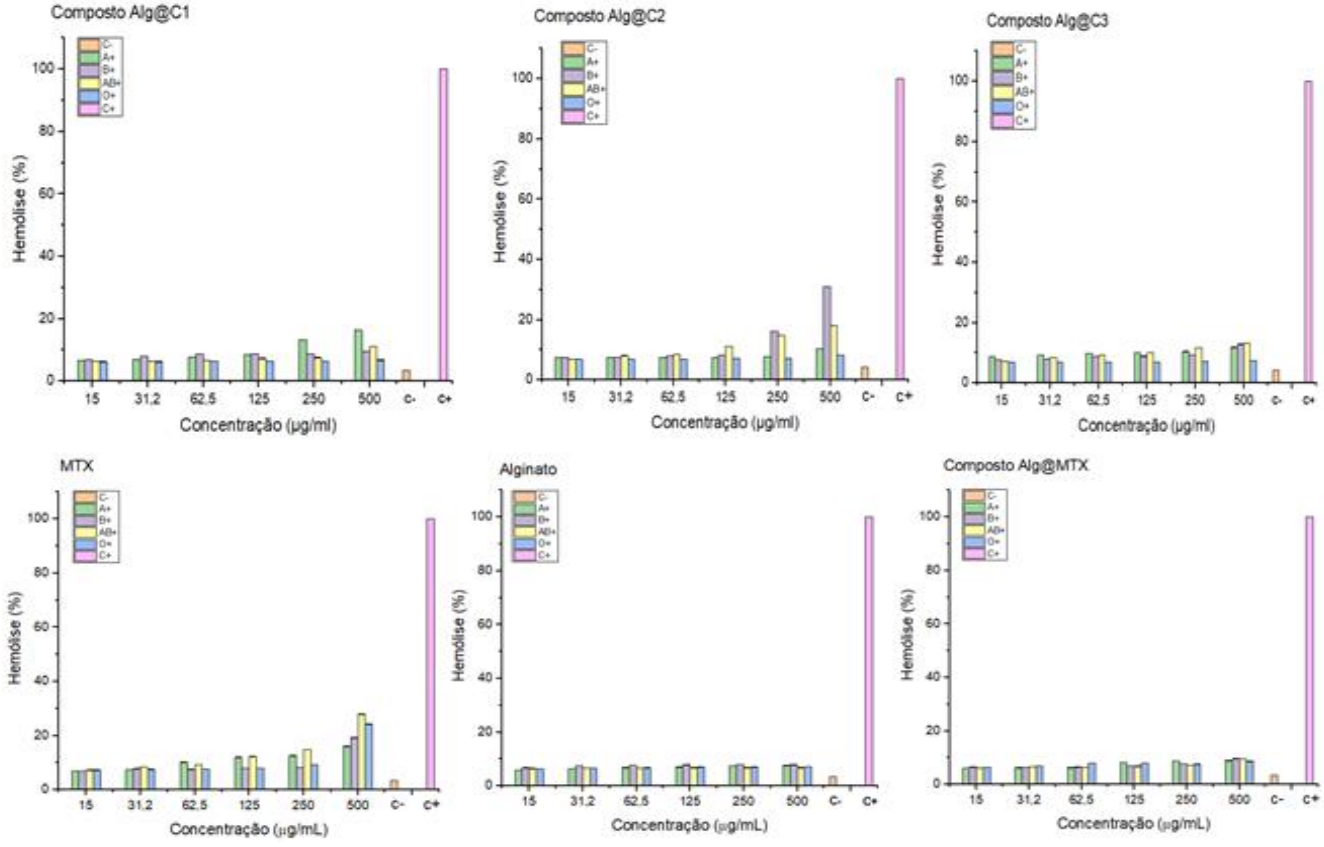


Figura 6

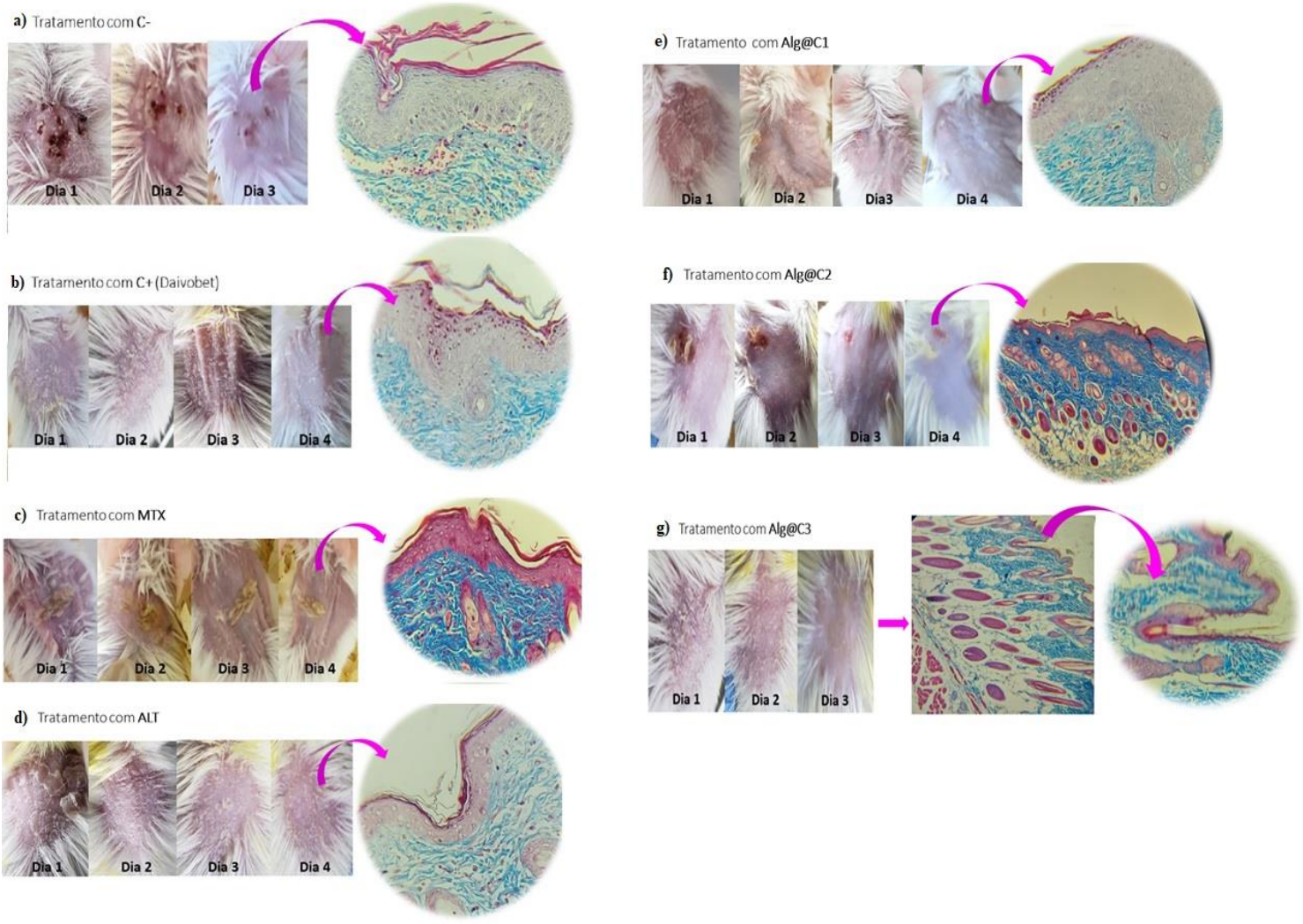

a) Tratamento com C-
Dia 1
Dia 2
Dia 3
b) Tratamento com C+ (Daivobet)
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
c) Tratamento com MTX
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
d) Tratamento com ALT
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
e) Tratamento com Alg@C1
Dia 1
Dia 2
Dia3
Dia 4
f) Tratamento com Alg@C2
Dia 1
Dia 2
Dia 3
Dia 4
g) Tratamento com Alg@C3
Dia 1
Dia 2
Dia 3

Figura 7

HEMOGRAMA	C-	C+	Alg@C1	Alg@C2	Alg@C3
H (Milhões/uL)	5430000	5780000	5480000	5380000	5280000
Hb (g/dL)	16,6	17,6	16.6	16,3	15,6
Htc (%)	50	53	50	49	47
VCM (fL)	92,5	94,5	92,5	92,5	90,3
HCM (pg)	30,1	30,2	30,1	30,1	30
CHCM (g/dL)	33,2	33,3	33,2	33,2	33,1
L (uL)	8000	5000	7000	4000	6000
S (%) (uL)	39 - 3.120	40 - 2.000	44 - 3.080	44 - 3.080	45 - 2.700
E (%) (uL)	6 - 480	4 - 200	3 - 210	3 - 210	3 - 180
M (%) (uL)	4 - 320	3 - 150	2 - 140	1 - 70	2 - 120
Lt	51 - 4.080	53 - 2.650	51 - 3.570	52 - 3.640	50 - 3.000
Pl (uL)	261000	168000	136000	287000	177000
BIOQUÍMICA					
U (mg/dL)	28	23	18	30	22
Cr (mg/dL)	0,7	0,6	0,3	0,6	0,4
TGO (mg/dL)	21	28	15	10,5	15,8
TGP (mg/dL)	26	36	17	13,8	17,6

Figura 8

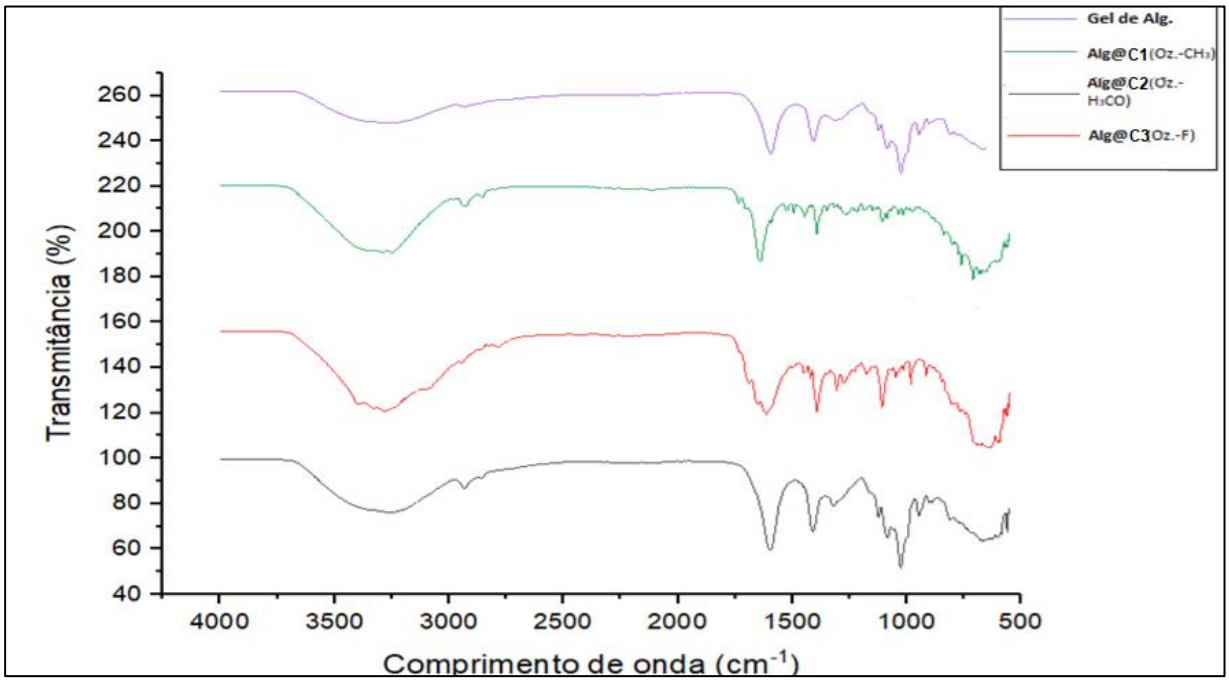


Figura 9

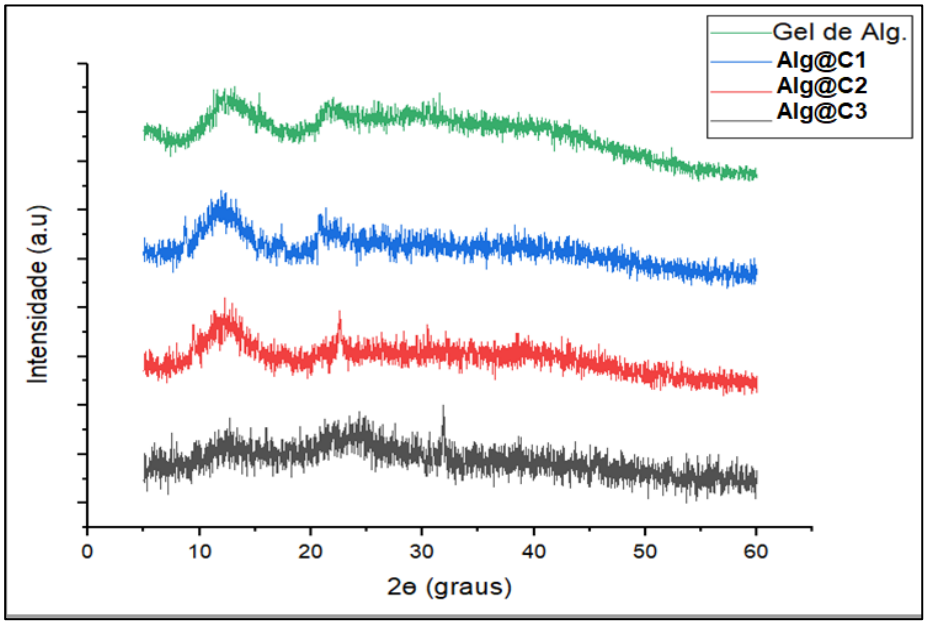


Figura 10

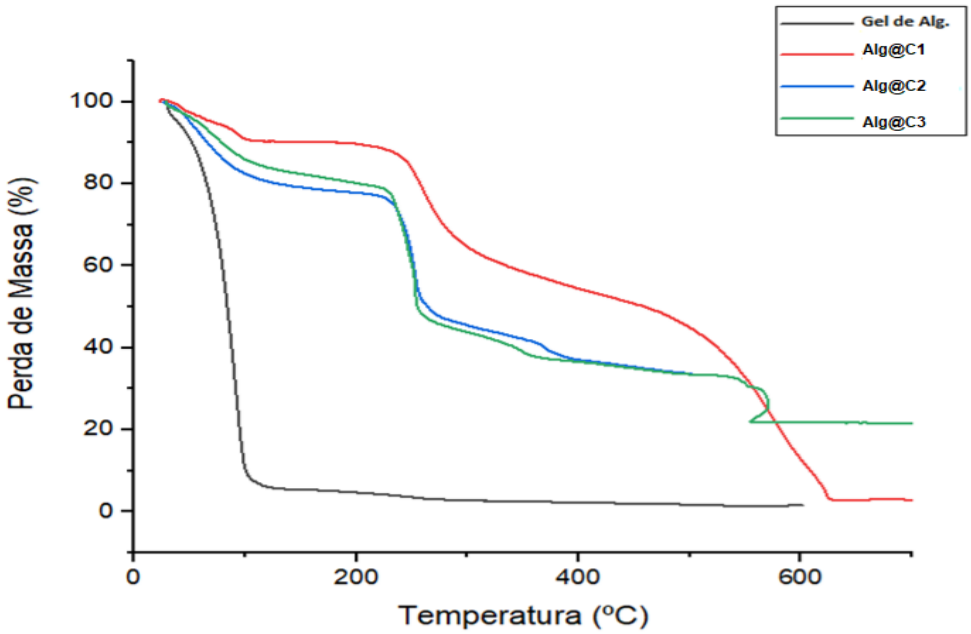


Figura 11

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UM GEL DE ALGINATO CONTENDO 1,2,4-OXADIAZOL PARA TRATAMENTO TÓPICO DA PSORÍASE

A presente invenção refere-se à preparação de um gel formado por alginato de sódio, suplementado com derivados de 1,2,4–oxadiazóis, a citar: N-ciclohexil-3-(fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C1), N-ciclohexil-3-(4-metoxi-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C2), e N-ciclohexil-3-(4-fluor-fenil)-1,2,4-oxadiazol-5-amina (C3). Foram formados os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3, incolores, amorfos, com estabilidade físico-química, atóxicos, e com atividades biológicas antiinflamatória e cicatrizante, em modelo animal, para psoríase. Diante disso, os géis Alg@C1, Alg@C2 e Alg@C3, descritos, apresentam potencial para serem utilizados na indústria farmacêutica, ou em pesquisa, como tratamento tópico para lesões psoriáticas, cicatrização de feridas cutâneas ou queimaduras.