



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

(21) BR 102020015304-8 A2



(22) Data do Depósito: 27/07/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 08/02/2022

(54) Título: DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/TL-50 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA

(51) Int. Cl.: A61K 31/175; A61P 33/12.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) Inventor(es): ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; MARIA DO CARMO ALVES DE LIMA; PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; THÂMARA CAROLLYNE DE LUNA ROCHA; JÉFFERSON LUAN NUNES DO NASCIMENTO; JAMERSON FERREIRA DE OLIVEIRA; EMERSON DE OLIVEIRA SILVA; DÉBORA DOLORES SOUZA DA SILVA NASCIMENTO; ALINE SILVA FERREIRA; MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE; LUIZ CARLOS ALVES; TALITA ATANAZIO ROSA; RAFAEL JOSÉ RIBEIRO PADILHA; VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS; FÁBIO ANDRÉ BRAYNER DOS SANTOS.

(57) Resumo: DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/TL-50 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA. A presente patente de invenção refere-se à dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento da esquistossomose. Para o desenvolvimento dessa dispersão, foi utilizada a técnica de solvente e com o carreador hidrofílico PVP-K30. A partir dessa dispersão, houve uma significativa melhora na solubilidade do LQIT/TL-50. A dispersão à base de LQIT/TL-50 apresenta maior solubilidade quando comparada com o composto isolado. Essa dispersão apresentou aumento na eficiência esquistossomicida, provocando a morte de 100% dos vermes adultos utilizando 50µM, necessitando de uma quantidade menor de LQIT/TL-50, quando comparado com LQIT/TL-50 isolado, podendo ser um forte candidato a medicamento para o tratamento da esquistossomose.

DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/TL-50 PARA TRATAMENTO ESQUISTOSSOMICIDA

1. Esta invenção refere-se a uma dispersão sólida à base do LQIT/TL-50 para o tratamento da esquistossomose.
2. O LQIT/TL-50 (2-(5-bromo-1-H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il-hidrazina-carbotiamida)) é uma nova entidade química (NEQ), sendo uma tiossemicarbazona, que atua com atividade esquistossomicida.
3. Almeida Júnior, em 2019, observou que essa NEQ possui uma boa atividade esquistossomicida, promovendo a morte de 100% dos parasitas em 24h na dose 200µM.
4. O LQIT/LT-50 apresenta baixa solubilidade em água, dificultando sua absorção oral, reduzindo sua biodisponibilidade. Para que essa problemática seja solucionada, são utilizadas novas tecnologias, dentre elas destacam-se as dispersões sólidas, que são utilizadas para incremento de solubilidade dessa NEQ.
5. A tecnologia de dispersões sólidas está relacionada com a adição de um ou mais substâncias ativas em um carreador hidrofílico inerte, que vai atuar diminuindo o tamanho de partículas e o estado cristalino da droga, incrementando assim solubilidade e melhorando sua biodisponibilidade.
6. Esta invenção descreve o desenvolvimento de dispersão sólida, sua caracterização físico-química, estudo de solubilidade e estudo *in vitro* para atividade esquistossomicida.
7. O LQIT/LT-50 foi sintetizado no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LQIT). O desenvolvimento das dispersões foi realizado no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM). E a determinação da atividade *in vitro* da dispersão foi realizada no

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) Estes laboratórios fazem parte da Universidade Federal de Pernambuco.

8. Como carreador para desenvolvimento das dispersões, foi utilizado o polivinipirrolidona K-30 (PVP K-30).

9. A dispersão sólida foi preparada utilizando o LQIT/LT-50 e o PVP K-30 em uma proporção de 1:4 (p/p). Para o desenvolvimento da dispersão, o LQIT/LT-50 e o PVP K-30 foram separadamente solubilizadas no etanol. Posteriormente, a solução contendo a NEQ foi vertida sobre a solução contendo o polímero. A mistura foi homogeneizada durante 10-20 minutos, utilizando o sonicador. A remoção do etanol foi realizada por evaporação em estufa com ar circulante, sob temperatura controlada (55 - 65°C). Em seguida, o produto seco foi pulverizado, e misturado em gral de porcelana com o auxílio de um pistilo sob resfriamento, utilizando aspensão de nitrogênio líquido.

10. Para realizar a caracterização físico-química da dispersão, foram utilizadas as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Difração de Raios-X (DRX), estudos térmicos, por meio das técnicas de Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), além de espectroscopia de Raman e estudo *in vitro* para avaliação esquistossomícida.

11. Na MEV, foi avaliada a morfologia da dispersão através de imagens, operando em 10 kV.

12. Na DRX, foi utilizado um intervalo de ângulo de 5-70° e uma velocidade de varredura de 0,03° por segundo.

13. Na análise termogravimétrica, foi utilizada uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹), num intervalo de temperatura de 30°C a 600°C. Os

experimentos foram realizados utilizando massa de amostras de $5,00 \pm 0,5\text{mg}$ em suporte de amostras de platina.

14. Na análise calorimétrica, foi utilizada uma razão de aquecimento de $20^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ($50\text{ mL}.\text{min}^{-1}$) e intervalo de temperatura de 25°C a 250°C . Para a realização dos ensaios, foram utilizadas amostras de $2,00 \pm 0,1\text{ mg}$ em porta-amostras de alumínio fechados. Antes dos ensaios, foram obtidas curvas em branco para avaliar a linha de base do sistema. Para a calibração da célula do DSC, foi empregado o índio metálico ($T_{\text{fusão}}=156,6^\circ\text{C}$; $H_{\text{fusão}}=28,7\text{ J}.\text{g}^{-1}$) com pureza de 99,99%.

15. A espectroscopia de Raman foi realizada para comprovar a integridade estrutural das moléculas de LQIT/LT-50 nas dispersões sólidas, equipado com objetivas de 50 e 100X. Os espectros Raman foram excitados por um laser de 532 nm, com intensidade de 5 mW e um tempo de integração de 10 segundos e 10 acumulações.

16. O estudo *in vitro* para avaliação esquistossomicida da dispersão sólida foi realizada através da infecção de caramujo, obtenção de cercárias e infecção de camundongos com *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Para realizar essas avaliações, fezes de camundongos infectados foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea ou Hoffman. Em seguida, o sedimento foi exposto à iluminação e à temperatura de 28°C , até que pudesse haver eclosão dos miracídios de *Schistosoma mansoni*. Os miracídios foram postos em contato com caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, permanecendo expostos à luz e ao calor por no mínimo 2 horas. Após a infecção, os moluscos foram postos em aquários e livres de exposição luminosa (Standen, 1952). Passados trinta dias, os moluscos infectados foram novamente expostos à luminosidade, para a eliminação das cercárias. Após 1 hora de exposição, foi obtida a

suspensão cercariana. Os camundongos previamente anestesiados com Xilasina e Ketamina foram infectados por via, por cutânea, com uma fração da suspensão cercariana contendo em média de 120 cercárias. Os animais permaneceram em contato com a suspensão por aproximadamente 30 minutos, sob luminosidade, para a penetração das cercárias. Recuperados do processo anestésico, os animais foram devolvidos para suas respectivas gaiolas (Smithers e Terry, 1965; Lombardo *et al.*, 2019).

17. Para avaliação da susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, após 50 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e, após perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos, os vermes adultos foram recuperados e lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100µg/mL) e soro bovino fetal a 10%. Em seguida, os vermes foram transferidos para placas de cultura de tecidos com 24 poços contendo 2 mL do mesmo meio suplementado. Cada poço recebeu dois casais de vermes adultos e, em seguida, foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Lombardo *et al.*, 2019).

18. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, foram adicionados nas placas o LQIT/LT50 e a dispersão LQIT/LT50:PVP-K30 (1:4 p/p) nas concentrações que nortearam de 200-12,5µM. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições. O monitoramento dos vermes foi estabelecido dentro do intervalo de 24 horas, sendo avaliados durante 5 dias de exposição às NEQs. Com auxílio do microscópio invertido, os parâmetros avaliados foram atividade motora, alterações de tegumento e taxa de mortalidade. Foram considerados mortos os vermes que não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação. A

motilidade foi classificada utilizando o sistema de pontuação em uma escala de 0-3. Sendo: 3, o movimento do corpo completo; 2, o movimento do corpo parcial; 1, indica corpo paralisado movendo apenas as extremidades; e 0, morto (Manneck *et al.*, 2010).

19. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração utilizada. Meios de cultura contendo a dispersão PVP-K30 a 90% e 80% e DSMO a 1,6% livre na concentração máxima avaliada e meio livre foram utilizados como controles negativos. O praziquantel na concentração de 10 μ M foi utilizado como controle positivo.

20. Na caracterização físico-química da dispersão, no teste de microscopia eletrônica de varredura, foi observado uma mudança estrutural, sugerindo uma mistura homogênea, não sendo possível realizar a separação visual entre a NEQ e o PVPK-30, indicando que ocorreu mudança no seu perfil cristalino, devido a possíveis interações químicas. Nas análises de difratometria de raios-X, foi possível observar redução dos picos cristalinos das NEQs.

21. Nos estudos térmicos da dispersão, na análise de DSC o pico endotérmico em 212 °C do LQIT/LT-50 não pode ser observado após a obtenção da dispersão, sugerindo a diminuição da cristalinidade da NEQ. Nessa mesma faixa de temperatura, no TG, inicia o evento degradação. Esses resultados corroboram com os dados obtidos nas análises de DRX e MEV. No estudo de espectroscopia Raman da dispersão, foi observado que as principais bandas da NEQ foram mantidas.

22. A dispersão de LQIT/LT-50 apresenta maior solubilidade, devido à dispersão da NEQ no carreador hidrofílico, o que dificulta sua cristalização.

23. Nos estudos *in vitro*, observou-se que a dispersão sólida melhorou a atividade esquistossomicida quando comparada com a NEQ

isolada, pois as dispersões promoveram morte de 100% dos vermes adultos em 24h, utilizando 50 μ M. Isso pode ter ocorrido devido ao aumento de solubilidade do LQIT/LT-50 nas dispersões.

24. A dispersão de LQIT/LT-50 pode ser utilizada para o desenvolvimento de formas farmacêuticas orais, para o tratamento da esquistossomose.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, **caracterizado por** conter como nova entidade química (NEQ) o LQIT/TL-50 (2-(5-bromo-1-H-indol-3-il-metileno)-N-(naftaleno-1-il-hidrazina-carbotiamida)).
- 2) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** utilizar o PVP-K30 como carreador hidrofílico.
- 3) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com as Reivindicações 1 e 2, **caracterizado por** melhorar a solubilidade e consequentemente a biodisponibilidade.
- 4) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com as Reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** compreender LQIT/LT-50: PVP-K30, em uma proporção de 1:4 (p/p).
- 5) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com as Reivindicações 1 a 4, **caracterizado por** utilizar a técnica de solvente.
- 6) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com as Reivindicações 1 a 5, **caracterizado por** apresentar maior solubilidade.
- 7) Dispersão sólida à base de LQIT/TL-50 para tratamento esquistossomicida, de acordo com as Reivindicações 1 a 6, **caracterizado por** apresentar atividade esquistossomicida *in vitro*, provocando a morte de 100% dos vermes adultos em 24h, utilizando 50 µM, tornando essa dispersão um promissor candidato a insumo farmacêutico ativo com atividade esquistossomicida.

RESUMO**DISPERSÃO SÓLIDA À BASE DE LQIT/TL-50 PARA TRATAMENTO
ESQUISTOSSOMICIDA**

A presente patente de invenção refere-se à dispersão sólida à base de LQIT/LT-50 para tratamento da esquistossomose. Para o desenvolvimento dessa dispersão, foi utilizada a técnica de solvente e com o carreador hidrofílico PVP-K30. A partir dessa dispersão, houve uma significativa melhora na solubilidade do LQIT/LT-50. A dispersão à base de LQIT/LT-50 apresenta maior solubilidade quando comparada com o composto isolado. Essa dispersão apresentou aumento na eficiência esquistossomicida, provocando a morte de 100% dos vermes adultos utilizando 50µM, necessitando de uma quantidade menor de LQIT/LT-50, quando comparado com LQIT/LT-50 isolado, podendo ser um forte candidato a medicamento para o tratamento da esquistossomose.