



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

(21) BR 132020016849-4 E2



(22) Data do Depósito: 19/08/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 22/02/2022

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PROCICATRIZANTE CONTENDO SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MUCO DE PEIXE, PROCESSO E USOS

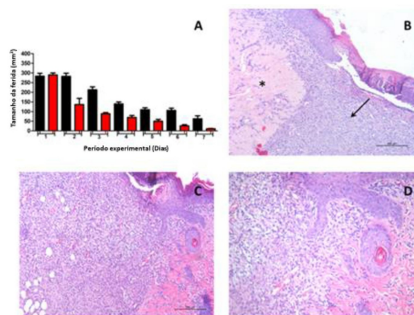
(51) **Int. Cl.:** A61K 35/60; B82Y 5/00; A61K 47/00; A61K 9/14; A61K 35/00; (...).

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** IVES CHARLIE DA SILVA; LETICIA GOMES DE PONTES; KATIA DA CONCEIÇÃO; JOSÉ DIAS CORRÊA JUNIOR; LEONARDO FERNANDES FRACETO; ANDREA DE CASTRO PEREZ; DANIEL PORTELA DIAS MACHADO; JULIANA MOREIRA MENDONÇA GOMES; SILAS FERNANDES ETO; DAYANNE CARLA FERNANDES; MARCO ANTONIO DE ANDRADE BELO; FELIPE PIEREZAN; RONALD KENNEDY LUZ.

(61) **Pedido original do CA:** BR102018073304-4 - 12/11/2018

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PROCICATRIZANTE CONTENDO SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MUCO DE PEIXE, PROCESSO E USOS. A presente tecnologia trata de uma composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante contendo sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe, do processo de preparação dos sistemas nanoestruturados e do uso da composição na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas, na preparação de enxertos e como veículo para carregar drogas.



“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE CONTENDO SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MUCO DE PEIXE, PROCESSO E USOS”

[01] A presente tecnologia é um Certificado de Adição ao pedido de Patente de Invenção BR1020180733044, depositado em 12 de novembro de 2018, intitulado “SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MUCO DE PEIXE, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USO”. A presente tecnologia trata de uma composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante contendo sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe, do processo de preparação dos sistemas nanoestruturados e do uso da composição na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas, na preparação de enxertos e como veículo para carregar drogas.

[02] A cicatrização de uma lesão consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reestruturação original do tecido. Nas últimas décadas, o tratamento de feridas vem ganhando um grande avanço tecnológico e científico, visando à redução no tempo de cicatrização e diminuição dos riscos de infecção. Assim, a biotecnologia introduz novas alternativas como o uso de muco epidérmico de peixe, visando avaliar se a aplicação do muco promove uma melhor cicatrização dos tecidos dérmicos.

[03] Os peixes nativos do Brasil são pouco estudados. No entanto, são considerados uma enorme fonte de compostos biologicamente ativos naturais e com grande potencial para a descoberta de novos tratamentos adjuvantes para feridas crônicas. Nos últimos anos, o interesse no muco epidérmico de peixe como estimulador pro-cicatrizante aumentou muito entre os pesquisadores. Estudos recentes mostraram que o muco que cobre o corpo de peixes contém moléculas com atividade de interesse farmacológico, como pró-cicatrizante e antibacteriana. Suas propriedades

naturais facilitam o fluxo de sangue para a região e a migração das células inflamatórias, tais como neutrófilos, linfócitos, macrófagos e proteínas do plasma sanguíneo. O uso do muco epidérmico de peixe é viável por mostrar grande tropismo para o local lesionado e gerenciar o processo de cicatrização através de interações diretas e indiretas, pela secreção de múltiplos fatores de crescimento e citocinas, devido à grande quantidade de agentes ativos secretados e à sua poderosa atividade imunoreguladora.

[04] Algumas formulações antimicrobianas e pró-cicatrizantes já foram descritas no estado da técnica utilizando muco epidérmico de algumas espécies de peixe. Por exemplo, Momoh et al. (2013) descrevem o uso de mucina de peixe em formulação contendo parafina macia à base de nitrofurazona (0,2% p/p) para produzir composições farmacêuticas lipofílicas semi-sólidas para cicatrização de feridas. (MA Momoh, SA Brown, and CC Muogbo –“Formulation and Evaluation of Cat Fish Slim Mucin Ointment for Wound Healing” Tropical Journal of Pharmaceutical Research December 2013; 12 (6): 885-890; M.A. Momoh, A.T. Mora, J.D.N. Ogbonna and A.A. Agboke - “In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Cat Fish Slime Mucin on Selected Micro-organisms by Agar Diffusion Method” -Pakistan J. Zool., vol. 46(6), pp. 1747-1751, 2014).

[05] O documento de patente BR102015021435-9 A2, cuja data de prioridade é 03/09/2015, intitulado “Processo de beneficiamento da pele da tilápia e seu uso na cobertura de lesões cutâneas”, descreve a utilização da pele da Tilápia, processada em várias etapas, em formulação à base de glicerol, como curativo biológico oclusivo em lesões cutâneas, como queimaduras e feridas agudas ou crônicas.

[06] O documento de patente BR102018010322-9 A2, cuja data de prioridade é 21/05/2018, intitulado “Processo de obtenção de curativo biológico de pele de peixe de couro e produto obtido”, descreve um

processo de obtenção de curativo biológico de pele de peixe de couro da espécie *Pseudoplatystoma coruscans*, popularmente conhecido como pintado, surubim-caparari, brutelo, caparari ou moleque, sendo as peles tratadas e armazenadas sob refrigeração, até o momento do uso.

[07] O documento de patente WO2009149554, cuja data de prioridade é 11/06/2008, intitulado “Componentes antimicrobiais do mucus e slime extrudida de hagfish (mixina glutinosa)”, descreve a atividade antimicrobiana de um composto isolado do muco epidérmico ácido de hagfish.

[08] Na presente tecnologia utiliza-se o muco epidérmico de peixe, preferencialmente de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), para obtenção de sistemas nanoestruturados que serão utilizados em composições farmacêuticas antimicrobianas e pró-cicatrizantes. As composições farmacêuticas da presente tecnologia são hidrofílicas e contêm nanopartículas produzidas a partir das proteínas contidas no muco de peixe. A composição não necessita de adição de nenhum outro composto em sua formulação. A composição levou a um aumento significativo na migração de leucócitos em animais tratados, indicando sua atividade pro-cicatrizante, promovendo a defesa inata do hospedeiro contra patógenos eucarióticos e procarióticos. A composição pode ser aplicada em feridas, a fim de auxiliar na cicatrização das mesmas.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[09] A **figura 1** mostra o perfil cromatográfico por HPLC do NPmucus de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

[010] A **figura 2** representa os resultados da análise microscópica. Houve redução no tamanho da ferida do grupo tratado comparado com o grupo controle (A – coluna vermelha representa o tratado com NPmucus e coluna preta representa o controle). As imagens histológicas mostram que não houve diferenças nos padrões histológicos das lesões dos

grupos (B - carragenina (CG) sem tratamento; C - CG com DMSO%; D - CG com DMSO 10% tratado com NPmucus). Tecido de granulação (asteriscos) e derme com infiltrados inflamatórios neutrófilos discretos na margem da lesão (seta), coloração H & E.

[011] A **figura 3** representa os efeitos do NPmucus do pacamã *Lophiosilurus alexandri* no recrutamento total de leucócitos em resposta à injeção de carragenina (CG) na cavidade peritoneal de ratos. Os resultados são expressos como a média \pm SEM de 6 animais em cada grupo (controle sem CG, CG sem tratamento, CG com DMSO%, CG com DMSO 10% tratado com NPmucus). Letras iguais não diferem entre os tratamentos ($p < 0,05$, ANOVA + teste de Bonferroni).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA TECNOLOGIA

[012] A presente tecnologia trata de uma composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante contendo sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe, do processo de preparação dos sistemas nanoestruturados e do uso da composição na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas, na preparação de enxertos e como veículo para carregar drogas.

[013] A composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante compreende sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe e excipientes farmacêuticamente aceitáveis. O muco pode ser obtido do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

[014] O processo de obtenção dos sistemas nanoestruturados da composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante compreende as seguintes etapas:

- a. Coleta do muco externo do peixe e dispersão em solução de solvente orgânico;
- b. Centrifugação da dispersão obtida na etapa "a";
- c. Liofilização do sobrenadante obtido na etapa "b";

- d. Hidratação do muco liofilizado obtido na etapa “c”;
- e. Ajuste de pH para 6 a 8, preferencialmente 7,5;
- f. Sonicação da suspensão obtida em “e”;
- g. Centrifugação da suspensão obtida em “f”;
- h. Coleta do sobrenadante obtido em “g”, contendo as nanopartículas.

[015] Na etapa “a”, a coleta do muco externo do peixe pode ser realizada através do uso de lâmina de vidro ou lâmina de bisturi e o muco pode ser dispersado em solução de solvente orgânico, como a acetonitrila 5 a 10%.

[016] Na etapa “d”, a hidratação pode ser realizada em água deionizada contendo uma molécula bioativa hidrofílica, anfifílica ou lipofílica no seu limite de solubilidade aquosa.

[017] Na etapa “f”, a sonicação pode ser realizada através de equipamento sonicador ultrassônico de ponteira ou de banho, por 5 a 10 minutos.

[018] Na etapa “g”, caracterizado pela centrifugação poder ser realizada através de centrífuga de tubos de bancada, por 10 a 15 minutos, a uma faixa de 2000 a 4000g.

[019] A composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante pode ser usada na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas, na preparação de enxertos e como veículo para carregar drogas.

[020] A presente tecnologia pode ser mais bem compreendida através dos exemplos que se seguem, não limitantes.

EXEMPLO 1 – OBTEÇÃO DO SISTEMA NANOESTRUTURADO DE MUCO DE PEIXE

[021] Para obtenção do sistema nanoestruturado de muco de peixe, aqui denominado NPmucus, a pele do peixe *Lophiosilurus alexandri* foi

raspada suavemente com uma espátula de plástico de 12x12 cm e o muco foi transferido para um tubo de 100mL e diluído em uma solução de acetonitrila a 6% por 24 horas, e armazenado a -80°C. Depois disso, a dispersão do muco foi centrifugada 15000x G por 2 horas e o sobrenadante foi coletado para liofilização.

[022] O NPmucus liofilizado foi diluído em água Milli-Q, homogeneizado e centrifugado a 15.000X G por 2 horas (4°C) para coleta do sobrenadante. O sobrenadante (100 µl) foi aplicado a um sistema de HPLC (DIONEX 3000 Ultra, Thermo Scientific - EUA) para a separação da amostra. A amostra foi carregada em uma coluna C18 (5µ, 4,6 X 150 mm, DIONEX) em um sistema de dois solventes: (A) ácido trifluoroacético (TFA) / H₂O (1: 1000) e (B) TFA / acetonitrila (ACN) / H₂O (1: 900: 100). A coluna foi eluída a uma taxa de fluxo de 1,0 mL / min com um gradiente de 10 a 90% de solvente B ao longo de 20 min. As frações obtidas por HPLC foram monitoradas e coletadas por sua absorvância a 214 nm e 280 nm.

[023] A caracterização do muco foi realizada por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida a 10% contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando o sistema de eletroforese vertical.

[024] O perfil do NPmucus quando submetido à cromatografia em fase reversa na coluna C18 apresenta cinco frações principais (**figura 1**). As duas primeiras frações são eluídas com baixa concentração de acetonitrila, indicando alta hidrofobicidade. Além disso, a segunda fração apresenta uma leitura considerável a 280 nm, indicando a presença de anéis aromáticos.

[025] Após fracionamento e caracterização, 30mg de muco total liofilizado foram diluídos em 20mL de água deionizada e mantidos sob agitação magnética por 24h para hidratação. Em seguida, o pH do meio foi ajustado para 7,5 com solução de hidróxido de sódio 0,01 M. A

suspensão formada foi centrifugada 15.000X G por 2 horas (4°C). O sobrenadante foi coletado e os parâmetros coloidais analisados. A estabilidade das formulações foi avaliada utilizando medidas de diâmetro médio e índice de polidispersividade. Os nanossistemas apresentaram tamanho médio variando de 210 e 268nm, índice de polidispersidade (PDI) abaixo de 0,2 e potencial zeta negativo.

EXEMPLO 2 – TESTES *IN VIVO*

[026] Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em ratos Wistar machos (≥ 2 meses), com idade entre 160-200 g, fornecidos pelo CEBIO-UFMG. Os animais foram alojados em sala com temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ$ C) em um ciclo automático de 12 horas claro / escuro (06: 00-18: 00 h). Todos os testes foram realizados durante a fase de luz (08: 00-17: 00 h). Ração comercial e água limpa estavam disponíveis à vontade até o início dos experimentos. Todos os procedimentos e protocolos dos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

[027] O ferimento foi ocasionado por seção de 1cm quadrado com bisturi cirúrgico. O tratamento foi realizado com inoculação de 30mg do extrato bruto de NPmucus diluído em DMSO 10% a cada administração. Todos os ratos de cada grupo (controle sem CG, CG sem tratamento, CG com DMSO%, CG com DMSO 10% tratado com NPmucus) foram eutanasiados com subdosagem de anestésicos no dia 7 pós-ferimento.

[028] Na análise macroscópica das feridas ocasionadas por seção de 1cm quadrado com bisturi cirúrgico foi verificada a ocorrência de hemorragia, a presença e extensão de crostas (total, parcial ou ausente), a presença de secreção e a reepitelização (completa, parcial ou ausente). Além disso, as áreas afetadas foram mensuradas e registradas nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 pós-ferimento usando um paquímetro digital.

[029] Em relação aos ensaios de cicatrização (**figura 2A**), para todos os grupos, as taxas de cicatrização aumentaram com o tempo. No entanto, observamos um aumento significativo na atividade de cicatrização de feridas após tratamento com NPmucus quando comparado ao grupo controle, sem tratamento. 7 dias após o ferimento, os efeitos de cicatrização foram bons para o tratamento com NPmucus, e as taxas médias de cicatrização de feridas foram maiores que a taxa de cicatrização do grupo controle ($p < 0,5$).

[030] Para análise microscópica, a pele lesionada foi dissecada, com uma margem de 1cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal, sendo a peça cirúrgica colocada em recipiente plástico com formol a 10%. A pele foi corada com H & E (5 μ m) e examinada por meio de um microscópio de luz Zeiss Axiophot (Zeiss, Oberkochen, Alemanha), para avaliar o processo de cicatrização. As imagens histológicas da **figura 2B, 2C e 2D** mostram que não houve diferenças nos padrões histológicos das lesões dos grupos de tratamento (B - CG; C - CG + DMSO%; D - CG + DMSO 10% com NPmucus).

[031] Conforme demonstrado na **figura 2B, 2C e 2D**, todos os animais induzidos por carragenina (CG), através do contato direto do composto com o ferimento, apresentaram aumento no recrutamento de leucócitos na cavidade peritoneal. A indução foi realizada com contato direto do ferimento ao composto carragenina (CG), que causa o processo inflamatório desejado. O maior recrutamento foi observado com os tratamentos NP-Mucus (**figura 2D** $p < 0,05$).

[032] Os cortes histológicos de todos os grupos não demonstraram diferenças entre os tratamentos. Após 7 dias, todo o fragmento de pele cabeluda apresentava áreas focalmente extensas de perda do epitélio com exposição da derme (úlceras) (**figura 2B, 2C e 2D**). Havia uma

quantidade intensa de detritos celulares, fibrina, infiltrado inflamatório neutrofílico, hemorragia e poucas colônias bacterianas (crosta) sobre a área de ulceração. Alguns queratinócitos adjacentes à úlcera tinham vacuolização citoplasmática discreta (degeneração hidrópica discreta). Na derme superficial e profunda subjacente à úlcera, houve intensa fibroplasia e neovascularização (tecido de granulação). Os fibroblastos foram predominantemente organizados paralelamente à epiderme. Os novos vasos sanguíneos estavam dispostos perpendicularmente à epiderme e eram revestidos por endotélio reativo. Dentro do tecido de granulação, havia um infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal discreto. Na derme profunda, na região periférica da lesão, havia um infiltrado inflamatório linfo-histiocítico com algumas células gigantes multinucleadas envolvendo material alongado e refrescante (corpo estranho). O mesmo material também foi encontrado no citoplasma de algumas células gigantes multinucleadas.

[033] Quanto à contagem diferencial de células, granulócitos, linfócitos e monócitos após o estímulo, não houve diferença entre os tratamentos observados na **figura 3** ($p < 0,05$). Os ratos estimulados e tratados com NPmucus apresentaram maiores porcentagens de granulócitos e linfócitos no foco inflamatório. Ao analisar a contagem de granulócitos, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) em todos os tratamentos após a indução por carragenina (CG) (**figura 3**).

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE, caracterizada por compreender sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe e excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

2. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo muco ser obtido do peixe pacamã (*Lophiosilurus alexandri*).

3. PROCESSO DE OBTENÇÃO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE definida na reivindicação 1, caracterizado pelos sistemas nanoestruturados serem produzidos através das seguintes etapas:

- a. Coleta do muco externo do peixe e dispersão em solução de solvente orgânico;
- b. Centrifugação da dispersão obtida na etapa “a”;
- c. Liofilização do sobrenadante obtido na etapa “b”;
- d. Hidratação do muco liofilizado obtido na etapa “c”;
- e. Ajuste de pH para 6 a 8, preferencialmente 7,5;
- f. Sonicação da suspensão obtida em “e”;
- g. Centrifugação da suspensão obtida em “f”;
- h. Coleta do sobrenadante obtido em “g”, contendo as nanopartículas.

4. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 3, etapa “a”, caracterizado pela coleta do muco externo do peixe ser realizada através do uso de lâmina de vidro ou lâmina de bisturi e pelo muco ser dispersado em solução de solvente orgânico, como a acetonitrila 5 a 10%.

5. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, etapa “d”, caracterizado pela hidratação ser realizada em água deionizada

contendo uma molécula bioativa hidrofílica, anfifílica ou lipofílica no seu limite de solubilidade aquosa.

6. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, etapa “f”, caracterizado pela sonicação ser realizada através de equipamento sonicador ultrassônico de ponteira ou de banho, por 5 a 10 minutos.

7. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 2, etapa “g”, caracterizado pela centrifugação ser realizada através de centrífuga de tubos de bancada, por 10 a 15 minutos, a uma faixa de 2000 a 4000g.

8. USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE definida na reivindicação 1, caracterizado por ser na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas.

9. USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE definida na reivindicação 1, caracterizado por ser na preparação de enxertos.

10. USO DA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE definida na reivindicação 1, caracterizado por ser como veículo para carregar drogas.

DESENHOS

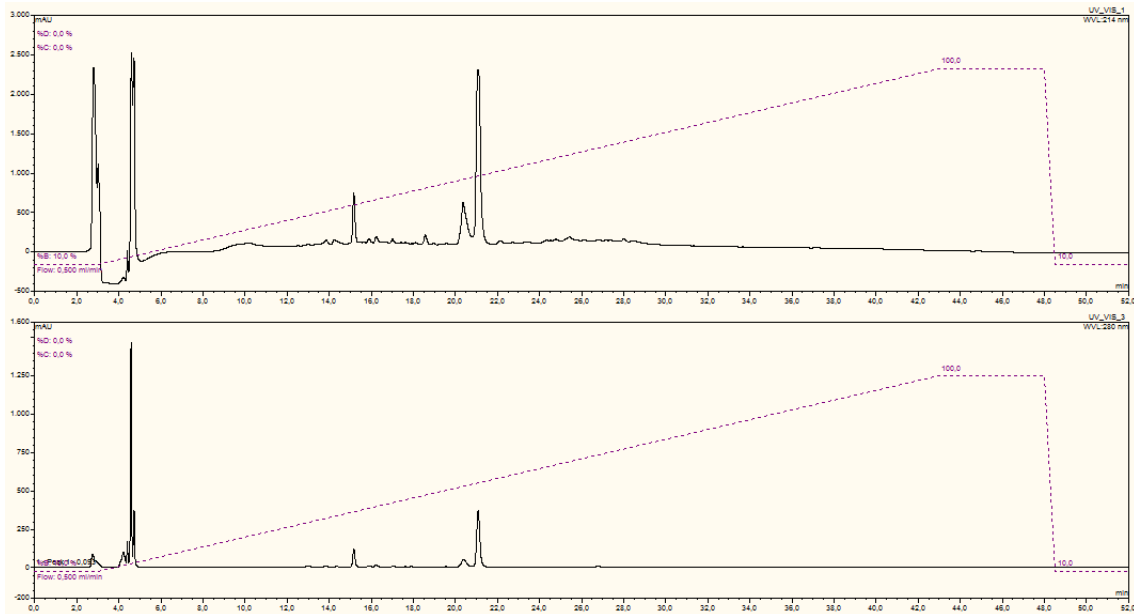


FIGURA 1

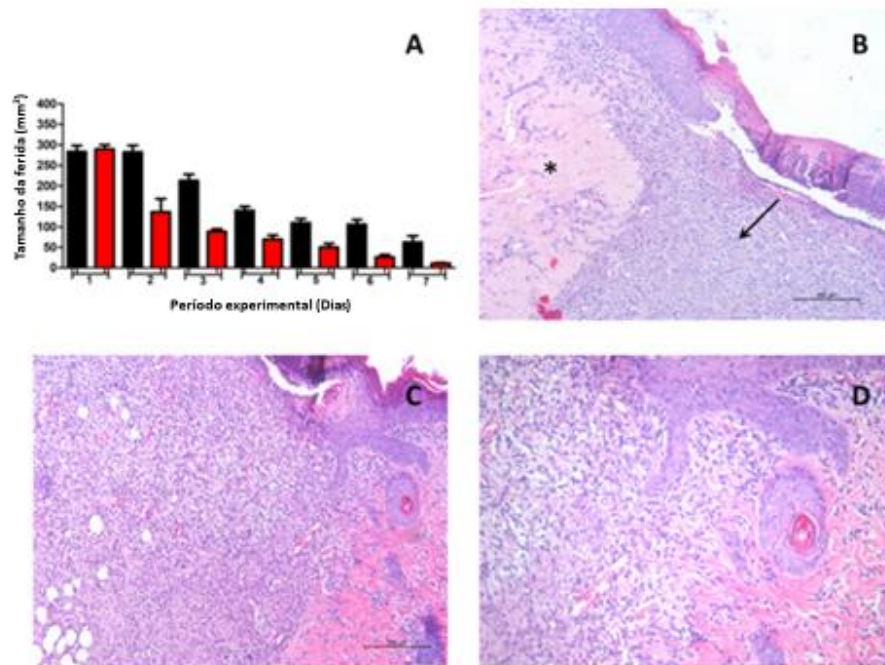


FIGURA 2

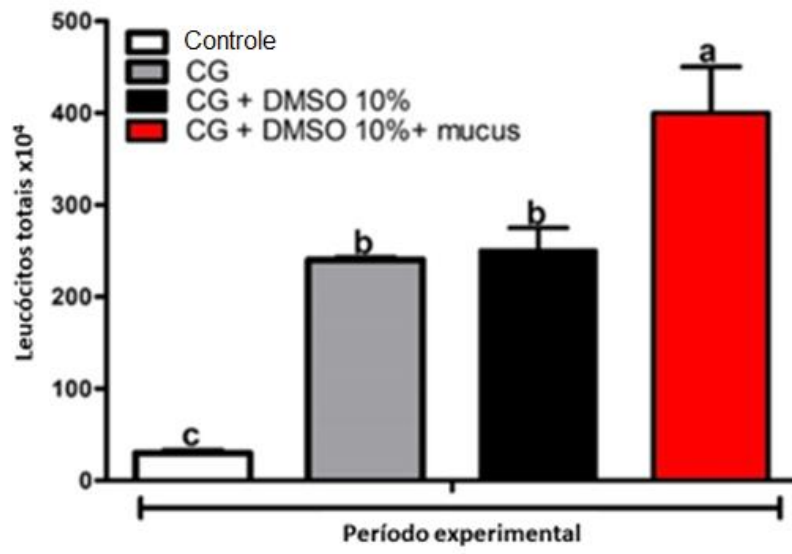


FIGURA 3

RESUMO

“COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA ANTIMICROBIANA E PRO-CICATRIZANTE CONTENDO SISTEMAS NANOESTRUTURADOS PRODUZIDOS A PARTIR DE MUCO DE PEIXE, PROCESSO E USOS”

A presente tecnologia trata de uma composição farmacêutica antimicrobiana e pro-cicatrizante contendo sistemas nanoestruturados produzidos a partir de muco de peixe, do processo de preparação dos sistemas nanoestruturados e do uso da composição na preparação de medicamentos para tratamento de feridas cutâneas, na preparação de enxertos e como veículo para carregar drogas.