



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

(21) BR 102015018285-6 A2



(22) Data do Depósito: 30/07/2015

(43) Data da Publicação: 31/01/2017

(54) **Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS, NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS OBTIDAS E USO DAS MESMAS

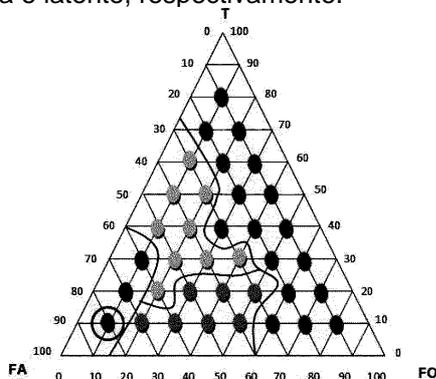
(51) **Int. Cl.:** A61K 47/44; A61K 9/51; A61K 33/34; A61P 31/06

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** PATRÍCIA BENTO DA SILVA; REGINA CÉLIA GALVÃO FREM; ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO; ANTONIO EDUARDO MAURO; ANA MARIA DA COSTA FERREIRA; FERNANDO ROGÉRIO PAVAN; CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE; MARLUS CHORILLI

(74) **Procurador(es):** FABÍOLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** RESUMO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS, NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS OBTIDAS E USO DAS MESMAS A presente invenção faz referência a um processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida. Adicionalmente, a presente invenção se refere às nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, bem como seu uso no preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral. Em uma modalidade preferida, a invenção proposta se refere ao uso das nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, preferencialmente a MEB-I3 e MEB-I1, para o preparo de medicamentos para tratamento de tuberculose ativa e latente, respectivamente.



**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS,
NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS OBTIDAS E USO DAS MESMAS**

Campo da invenção:

[001] A presente invenção se aplica no campo da ciência médica, de forma mais específica na área de nanotecnologia farmacêutica e faz referência a um processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida.

[002] Adicionalmente, a presente invenção se refere às nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, bem como seus usos no preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral.

[003] Em uma modalidade preferida, a invenção proposta se refere ao uso das nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, preferencialmente a MEB-I3 e MEB-I1, para o preparo de medicamentos para tratamento de tuberculose ativa e latente, respectivamente.

Fundamentos da invenção:

[004] A tuberculose (TB), causada pela micobactéria aeróbica *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), é a principal doença infecciosa de origem bacteriana no mundo. A MTB é uma bactéria de crescimento lento, com intervalo de tempo de duplicação de 18-48 horas, dependendo da quantidade de O₂ fornecido, pH e nutrientes disponíveis no meio onde elas se encontram.

[005] Quando a micobactéria é corada pela técnica de Ziehl Neelsen, ela não se deixa descorar pela solução de álcool e ácido, sendo classificada, portanto, como bacilo

álcool-ácido-resistente. Esta característica se deve à sua espessa parede celular, rica em lipídios com alto conteúdo de ácidos micólicos (cadeia longa de ácidos graxos ligados à parede celular), os quais desempenham papel importante na virulência do MTB.

[006] A resistência natural do MTB aos fármacos hidrofílicos e à desidratação é também exemplo da ação protetora dos ácidos micólicos presentes na parede celular.

[007] Outra consideração importante é o fato de o agente etiológico ter habilidade em permanecer por longo período de tempo no interior dos macrófagos do hospedeiro no estado denominado latência ou dormência sem causar doença.

[008] Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de um terço da população mundial apresenta a infecção por *M. tuberculosis* e estima-se que um em cada dez indivíduos contaminados irá desenvolver a doença. Outros 60-90%, apesar de terem sido infectados, mantém a infecção sob controle, pois desenvolvem uma resposta imune eficaz. Nestes, as células dendríticas, monócitos e macrófagos, responsáveis pela imunidade celular, envolvem os bacilos, dando origem aos granulomas.

[009] No interior dos granulomas, devido à baixa oxigenação e escassez de nutrientes, os bacilos não se reproduzem e entram em estado de latência. Nesta fase, os pacientes estão infectados e não apresentam o quadro da doença. Os bacilos dormentes aguardam por uma situação de debilidade do hospedeiro, fato que possibilita o rompimento dos granulomas e sua reativação.

[010] Embora o maior número de casos seja da forma

pulmonar, existe a possibilidade do desenvolvimento do quadro de TB extrapulmonar, que pode coexistir com o primeiro. Neste caso, a micobactéria pode infectar diferentes tecidos humanos podendo, inclusive, levar à disseminação generalizada, a qual é chamada de tuberculose miliar, que é extremamente grave.

[011] O tratamento da TB é longo, com efeitos adversos, e demanda disciplina do paciente. Como há uma melhora significativa logo no início do tratamento, é comum o paciente abandoná-lo antes do período recomendado, o que estimula o desenvolvimento de resistência bacteriana aos fármacos utilizados. A atual terapia recomendada pelo Ministério da Saúde no Brasil preconiza dois esquemas de tratamentos: o regime básico e o regime TB-MDR e TB-XDR (tuberculose multi-droga-resistente e tuberculose extensivamente resistente, respectivamente).

[012] O regime básico é destinado aos pacientes diagnosticados com infecção sensível aos fármacos de primeira-linha {isoniazida (INH), rifampicina (RMP), pirazinamida (PZA), estreptomicina (EST) e etambutol (EMB)}. Considera-se como TB-MDR o paciente com infecção resistente pelo menos aos fármacos INH e RMP. Já a TB-XDR refere-se à infecção resistente a INH, RMP como também as fluoroquinolonas {moxifloxacina (MXF), gatifloxacina (GTX), levofloxacina (LVFX), ofloxacina (OFX) e ciprofloxacina (CIPRO)} e a um dos fármacos injetáveis de segunda-linha {capreomicina (CP), canamicina (CM) e amicacina (AM)}.

[013] Fatores citados anteriormente propiciaram o surgimento de MTB-MDR e MTB-XDR. Semelhantemente, o tratamento disponível para a TB latente, presente em pelo

menos dois bilhões de indivíduos espalhados pelo mundo, é inadequado. Diante dessas circunstâncias, essa doença tornou-se um dos maiores desafios da medicina moderna.

[014] Reconhece-se que há urgência de novos fármacos para tratar TB. A expectativa é de que os novos fármacos possam encurtar regimes de tratamento, pois os agentes atuais tem duração de no mínimo 6 meses. Ainda, espera-se que os novos fármacos possam ser empregados no tratamento de TB-MDR e de TB latente e compatíveis com terapia antiretroviral.

[015] A pesquisa de novos fármacos tem recebido especial atenção da química medicinal, inclusive em se tratando de compostos inorgânicos, representados principalmente pelos metalofármacos, que têm apresentado potencial ação contra *M. tuberculosis*. É sabido que muitas substâncias orgânicas não possuem um modo de ação puramente orgânico em se tratando de atividade antimicobacteriana: algumas são ativadas ou biomodificadas por íons metálicos, incluindo metaloenzimas, enquanto outras têm um efeito direto ou indireto sobre o metabolismo do íon metálico no organismo.

[016] Além disso, a relação estrutura-atividade (REA) não apenas evidencia que a complexação com o metal pode aumentar a atividade antimicobacteriana do ligante, principalmente se este já for um fármaco, mas também indica que o metal desempenha um papel relevante por si só.

[017] O cobre (Cu) é o terceiro elemento de transição mais abundante no corpo humano (80-120 mg) e está presente no sítio ativo de enzimas que participam de reações oxidativas, como a citocromo oxidase ou a

superóxido dismutase.

[018] O íon Cu(II) possui uma tendência para formar complexos com outros íons ou moléculas, envolvendo ligações covalentes entre os mesmos e, assim, formando um composto de coordenação que consiste, sobretudo, em um átomo central, rodeado por um certo número de outros átomos, íons ou moléculas, que têm a propriedade de doar elétrons ao átomo central, e são chamados ligantes.

[019] As propriedades biológicas do cobre estimularam o desenvolvimento de numerosos complexos de Cu(II) compreendendo ligantes biologicamente ativos, com aplicabilidades nas áreas de tratamento do câncer e doenças cardiovasculares, anti-inflamatórios e antimicrobianos. Recentemente, tem-se observado grande potencial da Química Inorgânica Medicinal como ferramenta para o desenvolvimento de possíveis fármacos tuberculostáticos.

[020] Entretanto, a grande dificuldade dos compostos inorgânicos, em particular, os complexos metálicos, está relacionada à baixa solubilidade desses compostos em água, o que inviabiliza os estudos da atividade biológica em animais.

[021] Dessa forma, as estratégias tecnológicas que apresentam a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de princípios ativos e de modificar suas propriedades e comportamento em meio biológico, são promissoras para veiculação desses complexos metálicos.

[022] Assim, o desenvolvimento de sistemas de liberação para estes princípios ativos é uma alternativa.

[023] Diante disso, a nanotecnologia farmacêutica

é uma ferramenta que vem sendo muito utilizada, pois os sistemas terapêuticos estudados por ela são capazes de melhorar a solubilidade de substâncias hidrofílica e lipofílica e melhorar a biodisponibilidade.

[024] Em vista disso, a presente invenção se refere a um processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida, assim como as nanoestruturas lipídicas obtidas e seu uso no preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral, preferencialmente *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), para tratamento de tuberculose.

Estado da técnica:

[025] Alguns documentos do estado da técnica descrevem os detalhes da interação isoniazida-cobre no combate ao *M. tuberculosis*.

[026] Em "*The binding characteristics of isoniazid with copper-zinc superoxide dismutase and its effect on enzymatic activity*" de Nana Du *et al.* (2013), é relatado que as pontes de hidrogênio e as forças de *van der Waals* desempenham um papel importante na estabilização do complexo 1:1 INH-SOD. Ainda, é comprovado que após a adição de INH durante o intervalo do experimento, a conformação e o microambiente de Cu/Zn-SOD são alterados, mas a atividade de Cu/Zn-SOD não.

[027] O artigo "*Studies on isoniazid-copper interaction*" de M. Rieber e G. Bemski descreve que o complexo isoniazida-cobre possui considerado elevado combate ao *M. tuberculosis* ao comparar com o efeito desses compostos sozinhos na referida micobactéria MTB.

[028] Deste modo, é evidente que o uso desse tipo

de composto contra micobactérias é amplamente conhecido no estado da técnica. No entanto, não foram encontrados documentos que relatam a associação dos compostos isoniazida-cobre com nanoestruturas lipídicas tal como proposto pela presente invenção.

[029] Ainda, diferentemente dos documentos citados, a presente invenção demonstra que a associação dos compostos de isoniazida-cobre com nanoestruturas lipídicas possui aumento significativo no efeito antimicobacteriano frente à ação dos compostos isolados.

[030] Outro diferencial é o fato das referidas nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida não serem tóxicas frente a células eucarióticas, propondo assim, o uso dessas formulações para o preparo de medicamentos para tratamento de micobactérias em geral, preferencialmente *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), para tratamento de tuberculose.

Breve descrição da invenção:

[031] A presente invenção faz referência a um processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida.

[032] Adicionalmente, a presente invenção se refere às nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, bem como seus usos no preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral.

[031] Em uma modalidade preferida, a invenção proposta se refere ao uso das nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, preferencialmente a MEB-I3 e MEB-

I1, para o preparo de medicamentos para tratamento de tuberculose ativa e latente, respectivamente.

Breve descrição das figuras:

[033] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se fazem referências, conforme se segue.

[034] A Figura 1 representa graficamente os espectros vibracionais no IV do ligante livre INH e dos complexos I1-I3.

[035] A Figura 2 representa o diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema MEB.

[036] A Figura 3 representa o diagrama de fases segundo regiões observadas no sistema MEC.

[037] A Figura 4 representa a estrutura química da fosfatidilcolina de soja.

[038] A Figura 5 representa a estrutura do oleato de sódio.

[039] A Figura 6 representa a estrutura química do colesterol.

[040] A Figura 7 representa a fotomicrografia da MEB com aumento de 40X.

[041] As Figuras 8A-C representam as fotomicrografias das amostras MEB com aumento 40X, em que (A) é MEB-I1, (B) é MEB-I2 e (C) é MEB-I3.

[042] A Figura 9 representa graficamente o reograma das formulações MEB, MEB-I1, MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3.

[043] A Figura 10 representa graficamente a variação do módulo de armazenagem G' (símbolo cheios) e de perda G'' (símbolos vazios) em função da frequência para

MEB, MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3.

Descrição detalhada da invenção:

[044] A presente invenção se refere ao processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida, o qual compreende as etapas de:

a) Síntese dos compostos de Cu(II),
b) Síntese dos sistemas lipídicos nanoestruturados,
e

c) Incorporação dos compostos de Cu(II) nos sistemas lipídicos nanoestruturados;

em que:

a etapa "a" compreende as subetapas de:

a.1) Dissolução do cloreto de cobre dihidratado em metanol,

a.2) Gotejamento da solução metanólica compreendendo o ligante isoniazida, sob agitação magnética e temperatura ambiente;

a.3) Filtração, lavagem e secagem dos compostos;

a etapa "b" compreende as subetapas de:

b.1) Mistura da fase oleosa (FO) e do sistema tensoativo (T),

b.2) Titulação com a fase aquosa (FA),

b.3) Sonicação da solução com banho de gelo seguida de centrifugação; e

a etapa "c" compreende as subetapas de:

c.1) Adição do composto de Cu(II) na ME lipídica para obter uma concentração de 10 mg/mL; e

c.2) Homogeneização da mistura, com banho de gelo.

A seguir, as etapas e subetapas do processo descrito são mais bem explicadas e detalhadas.

- Síntese dos compostos de Cu(II):

[032] Na subetapa "a.1", a concentração de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que deve ser dissolvido em metanol é 0,05 g (0,293 mmols), em que a concentração de metanol varia de 10 a 20 mL, preferencialmente 15 mL.

[033] Na subetapa "a.2", é gotejada uma solução metanólica compreendendo o ligante isoniazida (INH) em uma concentração de 0,0804 g (0,586 mmols), para a síntese do composto $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I1) e de 0,161 g (1,17 mmols), para a síntese dos complexos $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I3).

[034] Este processo é realizado sob agitação magnética que varia de 200 a 600 rpm, com duração de tempo de 3 horas, em temperatura ambiente, conduzindo, assim, à formação de uma suspensão de cor verde clara.

[035] Para os complexos (I2) e (I3), é gotejada uma concentração que varia de 2 a 10 mL, preferencialmente 5,0 mL, de uma solução aquosa compreendendo 0,0475 g (0,0586 mmols), de tiocianato de sódio e 0,0476 g (0,0587 mmols), de cianeto de sódio, respectivamente.

[036] Na subetapa "a.3", para a formação dos compostos (I1), (I2) e (I3), os referidos compostos obtidos na subetapa "a.2" são isolados por filtração, lavados com metanol e secos sob vácuo.

[037] Assim, os compostos de cobre obtidos foram nomeados da seguinte maneira: $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I1), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I3).

- Síntese dos sistemas lipídicos nanoestruturados:

[038] Na subetapa "b.1", a fase oleosa (FO) é selecionada do grupo que consiste em colesterol, ácido

micólico ou a mistura dos dois, preferencialmente colesterol.

[039] O sistema tensoativo (T) é selecionado do grupo que consiste em polioxietileno 20 cetil éter, fosfatidilcolina de soja, óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado, oleato de sódio, polieoxietileno 20 oleil éter ou a mistura desses em diversas razões, conforme descrito na Tabela 1.

[040] Em uma modalidade preferida, utiliza-se uma mistura de oleato de sódio, fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7; e uma mistura de polioxietileno 20 oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1.

Tabela 1 - Constituintes dos sistemas lipídicos nanoestruturados desenvolvidos.

Constituintes Sistema	Tensoativo	Fase aquosa	Fase oleosa
MEA1	Brij®58	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (9:1)
MEA2	Brij®58 : Epikuron® 200 (1:1)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (9:1)
MEA3	Brij®58 : Epikuron® 200 (1:2)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (9:1)
MEA4	Brij®58 : Epikuron® 200 (2:1)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol : ácido micólico (9:1)
MEB	Oleato de sódio : Epikuron® 200 : Eumulgin® HRE 40 (2:1:2,7)	tampão fosfato pH 7,4	colesterol
MEC	Brij®98 : Epikuron® 200 (2:1)	tampão fosfato pH 7,4 : dispersão polimérica de poloxamer 407 a 5% (9:1)	colesterol

Em que: Brij®58 = polioxietileno 20 cetil éter;
Epikuron® 200 = fosfatidilcolina de soja;

Eumulgin® HRE 40 = óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado; e
Brij®98 = polioxietileno 20-oleil éter

[041] Na subetapa "b.2", a fase aquosa é selecionada do grupo que consiste em tampão fosfato pH 7,4, dispersão polimétrica de poxamer 407 a 5%, ou a mistura dos dois em uma razão de 9:1, preferencialmente solução em tampão fosfato pH 7,4.

[042] Na subetapa "b.3", a sonicação da mistura é realizada por sonicador de haste com potência de 700 watts, amplitude de 15%, modo descontínuo, por 8 a 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos, com banho de gelo durante todo o processo.

[043] Deste modo, após a sonicação, as microemulsões foram centrifugadas à força centrífuga de 11.180 (x g) por tempo que varia de 15 a 25 min, preferencialmente 15 minutos, para eliminar os resíduos de titânio liberados pela haste do sonicador. Todas as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistemas viscosos ou líquidos opticamente transparentes, viscosos ou líquidos opacos ou, ainda, separação de fases.

[044] Assim, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases, em que os sistemas lipídicos nanoestruturados escolhidos para incorporar os compostos obtidos na etapa "a" foram os sistemas B (MEB) e C (MEC), em que o tamanho das suas partículas varia de 168,6 a 170,3nm e de 123,6 a 127,5 nm, respectivamente.

- Incorporação dos compostos de Cu(II) nos sistemas lipídicos nanoestruturados:

[045] Na subetapa "c.1", adicionou-se 0,02 g de compostos de Cu(II) em 2 mL da ME lipídica, a fim de se obter uma concentração de 10 mg/mL.

[046] Desse modo, na subetapa "c.2", essa mistura é homogeneizada através de sonicação durante 2 minutos, amplitude de 15% em modo descontínuo, com banho de gelo, para que ocorra a incorporação do material na microemulsão lipídica na concentração de 10 mg/mL, em que o tamanho das nanoestruturas lipídicas compreendendo cobre-isoniazida varia de 10 a 250 nm, preferencialmente 190 nm, o índice de polidispersidade varia de 0,1 a 0,3, e o potencial zeta varia de -0,0069 a -8,430 mV.

[047] Cabe ressaltar que, após a incorporação dos compostos ao sistema, é possível observar que as amostras ficam mais viscosas.

[048] Em vista disso, os compostos obtidos na etapa "a" foram incorporados nos sistemas lipídicos nanoestruturados obtidos na etapa "b" (sistemas MEB e MEC), e, portanto, as nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito foram nomeadas da seguinte maneira: $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, MEB-I1 e MEC-I1, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MEB-I2 e MEC-I2, e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MEB-I3 e MEC-I3, respectivamente.

[049] Adicionalmente, a presente invenção se refere às nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, em que:

- MEB-I1 compreende 0,02 g de $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ na mistura constituída:
 - 10% de colesterol como fase oleosa;
 - 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-

hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

- MEB-I2 compreende 0,02 g de [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

- MEB-I3 compreende 0,02 g de [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

- MEC-I1 compreende 0,02 g de [CuCl₂(INH)₂]·H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo; e

- 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.

- MEC-I2 compreende 0,02 g de [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;
 - 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo; e
 - 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.
- MEC-I3 compreende 0,02 g de [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;
- 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo; e
- 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.

[050] Ainda, cabe ressaltar que as referidas nanoestruturas lipídicas possuem tamanho das partículas que variam de 10 a 250 nm e índice de polidispersão que varia de 0,1 a 0,3.

[051] Além disso, salienta-se que a massa dos compostos cobre-isoniazida depende do volume da ME, ou seja, a porcentagem de massa irá variar de acordo com o volume requerido, conforme já dito anteriormente.

[052] Adicionalmente, a presente invenção se refere ao uso das referidas nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida para o preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral.

[053] Em uma modalidade preferida, a invenção proposta se refere ao uso das nanoestruturas lipídicas

compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, preferencialmente a MEB-I3 e MEB-I1, para o preparo de medicamentos para tratamento de tuberculose ativa e latente, respectivamente.

[054] Os testes físico-químicos das referidas nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida se encontram a seguir, assim como os testes referentes ao uso das mesmas para o tratamento de tuberculose.

- Testes Realizados:

- Espectroscopia vibracional na região do infravermelho:

[045] A Figura 1 apresenta os espectros vibracionais no IV do ligante livre isoniazida (INH) e dos complexos $[CuCl_2(INH)_2] \cdot H_2O$ (I1), $[Cu(NCS)_2(INH)_2] \cdot 5H_2O$ (I2) e $[Cu(NCO)_2(INH)_2] \cdot 4H_2O$ (I3) cujas frequências e atribuições estão contidas na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequências vibracionais no IV (cm⁻¹) referente ao ligante livre e os complexos I1-I3 e suas respectivas atribuições.

Composto				Atribuição
INH	I1	I2	I3	
-	3437 <i>m</i>	3434 <i>m</i>	3449 <i>f</i>	ν_{OH}
3306 <i>m</i> , 3213 <i>om</i>	3222 <i>F</i>	3241 <i>F</i>	3236 <i>f</i>	$\nu_{as}NH_2$
3112 <i>F</i>	3098 <i>F</i>	3101 <i>om</i>	3108 <i>f</i>	ν_sNH_2
3035 <i>m</i> , 3014 <i>m</i>	3048 <i>F</i> , 3019 <i>m</i>	3057 <i>om</i>	3061 <i>om</i> , 3017 <i>f</i>	ν_{CH}
-	-	-	2212 <i>F</i>	$\nu_{as} NCO$
-	-	2130 <i>F</i>	-	ν_{N-CS}
1667 <i>F</i>	1653 <i>m</i>	1606 <i>f</i>	1615 <i>m</i>	$\nu_{C=O}$
1635 <i>m</i>	1648 <i>F</i>	1648 <i>m</i>	1655 <i>om</i>	Scissoring NH_2
1603 <i>m</i>	1590 <i>F</i>	1603 <i>F</i>	1589 <i>om</i>	$\nu_{anel} + \delta_{CH} + \delta_{HOH}$

1556 <i>F</i>	1547 <i>F</i>	1554 <i>m</i>	1537 <i>m</i>	ν_{anel}
1492 <i>f</i>	1494 <i>f</i>	1498 <i>f</i>	1499 <i>f</i>	$\delta\text{CH} + \nu_{\text{anel}} + \delta\text{NH}$
1412 <i>m</i>	1415 <i>m</i>	1415 <i>m</i>	1416 <i>m</i>	$\delta\text{CH} + \nu_{\text{anel}}$
-	-	-	1317 <i>f</i>	$\nu_{\text{s}}\text{NCO}$
1335 <i>F</i>	1332 <i>m</i>	-	-	Rocking NH_2
-	1284 <i>f</i>	1268 <i>f</i>	1283 <i>f</i>	ν_{anel}
1221 <i>m</i>	1225 <i>m</i> , 1202 <i>F</i>	1233 <i>f</i> , 1208 <i>f</i>	1239 <i>f</i>	$\delta\text{CH} + \nu_{\text{anel}}$
1141 <i>m</i>	1139 <i>m</i>	1131 <i>f</i> , 1098 <i>f</i>	1131 <i>f</i> , 1103 <i>f</i>	$\delta\text{CH} + \nu_{\text{anel}} + \nu_{\text{CN}}$
1060 <i>f</i>	1065 <i>f</i>	1058 <i>m</i>	1058 <i>f</i>	$\nu_{\text{anel}} + \delta\text{CH} + \delta_{\text{anel}}$
996 <i>m</i>	996 <i>f</i>	988 <i>f</i>	987 <i>om</i>	$\nu_{\text{anel}} + \delta_{\text{anel}}$
943 <i>f</i>	-	941 <i>f</i> , 919 <i>f</i>	945 <i>f</i> , 924 <i>f</i>	$\nu_{\text{NN}} + \text{twisting } \text{NH}_2 + \nu_{\text{NH}_2}$
888 <i>f</i> , 845 <i>m</i>	906 <i>f</i> , 881 <i>f</i> , 858 <i>m</i>	876 <i>f</i>	868 <i>om</i>	$\gamma\text{CH} + \gamma\text{C-CO-NH-NH}_2$
747 <i>f</i>	761 <i>f</i>	755 <i>f</i>	775 <i>f</i> , 756 <i>f</i>	$\gamma\text{CH} + \tau_{\text{anel}} + \gamma\text{CO} + \nu \text{ NC-S}$
-	712 <i>m</i>	715 <i>m</i>	719 <i>f</i>	$\tau_{\text{anel}} + \gamma\text{CO} + \gamma\text{CH}$
675 <i>F</i>	-	690 <i>m</i>	692 <i>f</i>	$\delta_{\text{anel}} + \nu\text{C-CO-NH-NH}_2$
659 <i>F</i>	-	664 <i>om</i>	658 <i>f</i>	$\delta_{\text{anel}} + \delta\text{CH}$
-	-	-	620 <i>f</i>	δNCO
504 <i>f</i>	538 <i>f</i>	504 <i>f</i>	501 <i>om</i>	$\tau\text{HNNH} + \gamma\text{NH} + \delta\text{NCC} + \delta\text{C-CO-NH-NH}_2 + \delta\text{OCC}$
436 <i>f</i>	463 <i>f</i>	466 <i>f</i> , 430 <i>f</i>	420 <i>f</i>	$\gamma\text{NH} + \tau\text{HNNH} + \gamma\text{CH} + \tau_{\text{anel}} + \delta\text{NCS}$

ν_{as} =estiramento assimétrico, ν_{s} =estiramento simétrico, ϕ =respiração do anel, β =deformação no plano, δ_{as} =deformação angular assimétrica no plano, γ = deformação fora do plano. Intensidades: F = forte, m = média, f = fraca, om=ombro

[046] A molécula de isoniazida (INH) pode se coordenar pelos átomos de nitrogênio do grupo $-\text{NH}_2$ e/ou do anel piridínico bem como através do oxigênio da carbonila.

[047] A espectroscopia no IV permite obter informações valiosas no que diz respeito à participação destes grupos na coordenação. Quando o nitrogênio do grupo

-NH₂ está envolvido na coordenação, observa-se um deslocamento negativo do modo ν_{NH} ($\Delta = \nu_{\text{ligante}} - \nu_{\text{complexo}}$). Já a coordenação via oxigênio do grupo carbonila é sugerida pelo deslocamento positivo do modo $\nu(\text{C}=\text{O})$ ($\Delta = \nu_{\text{ligante}} - \nu_{\text{complexo}}$). Algumas vibrações do anel da piridina observadas no intervalo de 1600-1400 cm^{-1} sofrem pequenos deslocamentos para frequências mais altas após a formação do complexo.

[048] A análise dos espectros no IV do ligante livre e dos compostos I1-I3 permitiu obter informações relevantes a respeito da coordenação do ligante isoniazida (INH) ao centro metálico.

[049] No espectro no IV do complexo I1 observa-se que a banda ν_{NH} apresentou um deslocamento de 3213 para 3222 cm^{-1} ($\Delta\nu = -9 \text{ cm}^{-1}$). Essa alteração é típica da coordenação do metal ao nitrogênio do grupo -NH₂.

[050] As absorções no IV relacionadas às vibrações associadas ao anel piridínico da isoniazida (Tabela 2) não sofrem deslocamentos significativos para frequências mais altas após a coordenação, sugerindo a não participação do átomo de nitrogênio heterocíclico na coordenação. Observa-se, ainda, um deslocamento da banda $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ para frequências mais baixas, de 1667 (ligante livre) para 1653 cm^{-1} , sugerindo a coordenação também pelo átomo de oxigênio da carbonila. Cabe mencionar que a presença de água de hidratação no composto 3 foi confirmada pelo aparecimento de uma banda larga em 3437 cm^{-1} (ν_{OH}).

[051] No espectro no IV do complexo I2, no que diz respeito ao grupo -NH₂, nota-se que a banda ν_{NH} apresentou um deslocamento de 3213 para 3241 cm^{-1} ($\Delta\nu = -28 \text{ cm}^{-1}$). Essa

alteração é típica da coordenação do metal ao nitrogênio do grupo -NH₂.

[052] A banda referente ao modo vibracional ν_{anel} (1554 cm⁻¹) não sofre deslocamento significativo quando comparada a do ligante livre (1556 cm⁻¹), sugerindo que o nitrogênio piridínico da isoniazida não participa da coordenação. Nota-se ainda que a banda $\nu_{\text{C=O}}$ (1606 cm⁻¹) sofre um deslocamento significativo para frequências mais baixas quando comparada a do ligante livre (1667 cm⁻¹), sugerindo que a carbonila participa da coordenação do ligante ao centro metálico.

[053] A banda ν_{asNCS} , característica do grupo tiocianato, foi observada em 2130 cm⁻¹ e encontra-se no intervalo espectral típico da coordenação terminal pelo átomo de enxofre. A banda ν_{OH} em 3434 cm⁻¹ junto da banda em 1603 cm⁻¹ (δ_{HOH}) indica a presença de moléculas de água de hidratação.

[054] No espectro no IV do complexo I3, observa-se que a banda ν_{NH} apresentou um deslocamento de 3213 para 3236 cm⁻¹ ($\Delta\nu = -23$ cm⁻¹). Essa alteração é típica da coordenação do metal ao nitrogênio do grupo -NH₂.

[055] A banda referente aos modos vibracionais $\nu_{\text{anel}} + \delta_{\text{CH}} + \delta_{\text{anel}}$ (1060 cm⁻¹) não sofre deslocamento significativo para frequências mais altas quando comparada a do ligante livre (1058 cm⁻¹), sugerindo que o nitrogênio piridínico da isoniazida não participa da coordenação. A banda $\nu_{\text{C=O}}$ (1615 cm⁻¹) sofre um deslocamento significativo para frequências mais baixas quando comparada a do ligante livre (1667 cm⁻¹), sugerindo que a carbonila participa da coordenação do ligante ao centro metálico. O deslocamento

das bandas do grupo cianato referente aos modos vibracionais $\nu_{as}(\text{CN})$, $\nu_s(\text{CO})$ e $\delta(\text{NCO})$ para 2212, 1317 e 620 cm^{-1} , respectivamente, confirma a coordenação do pseudo-haleto de forma terminal, via átomo de nitrogênio. A banda ν_{OH} em 3449 cm^{-1} junto da banda em 1589 cm^{-1} (δHOH) indica a presença de moléculas de água de hidratação.

[056] Conforme, a análise dos espectros no IV dos complexos I1-I3, pode-se concluir que houve a formação dos compostos de Cu(II) esperados.

- Detalhamento dos sistemas lipídicos nanoestruturados (MEs: MEB e MEC):

[057] Para o desenvolvimento do sistema MEA, testou-se um tensoativo (polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58)) e quatro misturas de tensoativos (Brij® 58 e fosfatidilcolina de soja (FS - Epikuron® 200)) variando a proporções, além do tempo de sonicação e amplitude.

[058] Neste sistema, empregou-se como fase oleosa uma mistura de colesterol e ácido micólico (9:1). Em nenhuma das tentativas foi possível obter um sistema líquido transparente para ser utilizado na técnica de microdiluição. Diante disso e do alto custo do ácido micólico, não foram realizados ensaios de caracterização para este sistema.

[059] O sistema MEB foi desenvolvido utilizando os componentes: óleo (colesterol), água (tampão fosfato pH 7,4) e a mistura de tensoativo (35,3% de oleato de sódio, 17,6% de fosfatidilcolina de soja e 47,1% do óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado) em diferentes concentrações.

[060] Foram obtidos pontos com diferentes características estruturais de acordo com a variação do

óleo e água. O diagrama de fases (Figura 2) mostra as características de pontos com SLT (azul), SVT (amarelo), SF (rosa) e SVO (verde).

[061] Observaram-se regiões chamadas SLT (Sistemas Líquido-Transparentes), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10-30%), SVT (Sistemas Viscosos Transparentes) com a concentração de tensoativo entre 20 a 65% e a fase de óleo com 10-40%, SVO (Sistemas Viscosos e Opacos) encontrados na região inferior e central do diagrama com baixa concentração de óleo de (20-50%), tensoativo (10-20%), e SF (Separação de Fases) em concentrações baixas de água (10-30%) e independente da concentração do tensoativo nas formulações.

[062] O ponto escolhido para o estudo foi a formulação F1 (destacada com um círculo vermelho, Figura 2), que é composta de 10% de colesterol, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa. Essa formulação foi escolhida para a incorporação dos compostos de coordenação devido ser a mais líquido-transparente, ou seja, a mais adequada para a presente invenção.

[063] Outro sistema desenvolvido foi o MEC, utilizando os componentes: colesterol como fase oleosa, tampão fosfato pH 7,4 com dispersão polimérica de poloxamer 407 a 5% na proporção 9:1 como fase aquosa e a mistura de tensoativo (Brij98® e fosfatidilcolina na proporção 2:1) em diferentes concentrações. Foram obtidos pontos com diferentes características estruturais de acordo com a variação do óleo e água. O diagrama de fases (Figura 3) mostra as características de pontos com SLT (azul), SLO (roxo), SVT (amarelo), SVO (verde) e SF (rosa).

[064] Observaram-se regiões chamadas SLT (Sistema Líquido-Transparente), onde há baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo (10%), SLO (Sistema líquido opaco), com baixa concentração de óleo (10%) e tensoativo entre 20-30%, SVT (Sistema Viscoso Transparente) com a concentração de tensoativo de 60% e a fase de óleo em 10%, SVO (Sistema Viscoso e Opaco) encontrado na maior região do diagrama de fases com concentração de óleo entre 20-60% e independente da concentração de tensoativo e SF (Separação de Fases) encontrados em duas regiões distintas do diagrama de fases, a primeira com concentrações de óleo entre 60-80% e tensoativo entre 10-30%, e a segunda região de SF com baixa concentração de óleo (10-30%) e alta concentração de tensoativo (50-70%) nas formulações.

[065] O ponto escolhido para a presente invenção também foi a formulação F1, sistema líquido transparente (Figura 3), que é composta de 10% de fase oleosa, 10% de tensoativo e 80% de fase aquosa. Essa formulação foi escolhida para a incorporação dos compostos de coordenação devido ser a mais líquido-transparente, ou seja, a mais adequada para a invenção proposta, entretanto, mais viscosa que a F1 do sistema MEB.

- Caracterização dos sistemas lipídicos nanoestruturados (MEs: MEB e MEC):

- Dispersão de luz dinâmica:

[066] A determinação do diâmetro das gotículas foi realizada através da correlação de fótons, usando equipamento de espalhamento dinâmico de radiação laser.

[067] Deste modo, a Tabela 3 apresenta os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e o

índice de polidispersidade (IPD) para os sistemas lipídicos nanoestruturados, MEB (sistema B) e MEC (sistema C), bem como para os compostos de coordenação incorporados nos respectivos sistemas: $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, MEB-I1 e MEC-I1, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MEB-I2 e MEC-I2, e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MEB-I3 e MEC-I3, respectivamente.

[068] O IPD mede a homogeneidade entre a média dos tamanhos das partículas em relação ao desvio-padrão, onde quanto menor for o IPD maior é a uniformidade apresentada pelas partículas.

Tabela 3 - Valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos das partículas e IPD para os sistemas lipídicos nanoestruturados, MEB e MEC, bem como para os compostos de coordenação incorporados nos respectivos sistemas: $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$, MEB-I1 e MEC-I1, $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, MEB-I2 e MEC-I2, e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, MEB-I3 e MEC-I3.

Formulação	Tamanho das Partículas (nm)	Índice de Polidispersão
MEB	169,5 ± 0,7095	0,135 ± 0,013
MEB-I1	211,1 ± 0,8963	0,200 ± 0,009
MEB-I2	205,5 ± 1,652	0,226 ± 0,015
MEB-I3	209,8 ± 0,8083	0,236 ± 0,001
MEC	125,6 ± 1,804	0,246 ± 0,008
MEC-I1	158,0 ± 1,060	0,228 ± 0,011
MEC-I2	212,6 ± 1,539	0,284 ± 0,034
MEC-I3	171,7 ± 1,947	0,218 ± 0,007

[069] De acordo com a Tabela 3, o tamanho das partículas da microemulsão (ME) dos sistemas B e C foi 169,5 ± 0,7095 e 125,6 ± 1,804, respectivamente.

[070] A incorporação dos compostos de coordenação

em ambos os sistemas causou uma pequena variação no tamanho das partículas, sem exceção, variando de $158,0 \pm 1,060$ a $212,6 \pm 1,539$. Todos os valores obtidos estão na faixa de 10-250 nm (100-2500 Å), intervalo ideal para MEs.

[071] Quando se compara as MEs bases (MEB e MEC) e as formulações compreendendo os compostos de coordenação nos respectivos sistemas, observa-se um pequeno aumento no tamanho das partículas, sendo esse um forte indício de que realmente ocorreu a incorporação dos respectivos compostos no sistema lipídico.

[072] O índice de polidispersidade (IPD) é o índice que mostra a homogeneidade relativa entre os tamanhos das partículas distribuídos na amostra medida. Os valores de IPD variaram entre $0,135 \pm 0,013$ e $0,284 \pm 0,034$ apresentando uma média faixa de variação entre a base e as formulações com os compostos incorporados, esses dados permite inferir que as amostras apresentam certa homogeneidade.

[073] A formulação F1 do sistema MEC apresentou maior viscosidade em relação à formulação F1 do sistema MEB, o que dificultou a pipetagem da amostra; portanto, a caracterização para esse sistema foi realizada apenas por dispersão de luz dinâmica.

- Análise do potencial zeta:

[074] O potencial zeta foi determinado a partir da mobilidade eletroforética, utilizando equipamento Zetasizer Nano NS, sendo que as análises foram realizadas 24 horas após o preparo das formulações.

[075] As amostras foram previamente diluídas (10 µL/mL) com solução aquosa de KCl para manter uma constante

de força iônica durante a análise. As amostras foram colocadas na célula eletroforética e foram realizadas, para cada amostra, 3 determinações do potencial de superfície, calculando-se a média e o desvio padrão.

[076] A Tabela 4 apresenta a média e desvio padrão do pontecial zeta da microemulsão base do sistema B (MEB) bem como das formulações compreendendo os compostos de coordenação incorporados nesse sistema, $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MEB-I1), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MEB-I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (MEB-I3).

Tabela 4 - Média e desvio-padrão do potencial zeta da microemulsão base do sistema B (MEB) e das formulações compreendendo os compostos de coordenação incorporados nesse sistema.

Formulação	Potencial Zeta (mV)
MEB	- 0,100 ± 0,103
MEB-I1	- 0,0433 ± 0,214
MEB-I2	- 0,0069 ± 0,0896
MEB-I3	- 8,430 ± 1,630

[077] Analisando a Tabela 4, observa-se que os resultados das amostras para o potencial zeta variaram entre os valores de $-0,0069 \pm 0,0896$ mV a $-8,430 \pm 1,630$ mV. Esta carga negativa é proveniente dos componentes das formulações.

[078] A fosfatidilcolina de soja (Figura 4) possui grupamentos ésteres livre $[-\text{O}-\text{C}=\text{O}-]^-$ que contribuem para a carga negativa do sistema, bem como o oleato de sódio (Figura 5) que também possui o grupo éster associado ao átomo de sódio que se dissocia $[-\text{O}-\text{C}=\text{O}-]^-$ e o colesterol (Figura 6) que em sua estrutura possui um grupamento

hidroxila livre $[\text{OH}^-]$.

- Microscopia de luz polarizada:

[079] Uma pequena quantidade das formulações foi colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas com auxílio de microscópio de luz polarizada. Analisou-se a homogeneidade das dispersões e, com auxílio de polarização, observou a presença de área de anisotropia.

[080] O ponto 1 do diagrama de fases do sistema B (MEB), bem como as formulações com os compostos de Cu(II) incorporados: $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MEB-I1), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MEB-I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (MEB-I3) foram analisados por microscopia de luz polarizada.

[081] A Figura 7 mostra a fotomicrografia do ponto 1 do diagrama, formulação sistema líquido transparente (SLT), sistema MEB.

[082] Nota-se que a amostra (Figura 7) que apresenta 10% de fase oleosa um comportamento isotrópico (campo escuro), ou seja, sob o plano de luz polarizada, não desvia luz sugerindo a formação de sistema microemulsionado uma vez que a viscosidade aparente da fase cúbica é extremamente elevada.

[083] As Figuras 8A-C apresentam as fotomicrografias das amostras compreendendo os compostos incorporados na MEB, em que a (A) é a MEB-I1, (B) é a MEB-I2 e (C) é a MEB-I3.

[084] Analisando as Figuras 8A-C que apresentam as fotomicrografias após a incorporação dos compostos I1, I2 e I3 na MEB, observa-se campo escuro em ambas as amostras, ou seja, as microemulsões compreendendo os compostos de

coordenação mantém característica de sistema microemulsionado, entretanto, é possível verificar certa anisotropia nessas amostras, ou seja, o desvio da luz polarizada, resultando no aparecimento de cristais, característico de estrutura de uma fase cristalina.

[085] A anisotropia observada pode estar relacionada com o grau de cristalinidade apresentada pelos complexos metálicos, que conseqüentemente interferiu na estruturação das fases do sistema, o que pode inclusive ter influenciado no aumento da viscosidade dessas amostras.

- Análise reológica contínua:

[086] Uma pequena amostra das formulações foi colocada, cuidadosamente, na placa inferior do reômetro, e esperou-se o tempo de repouso de 3 minutos para o início da análise. A taxa de cisalhamento utilizada foi de 0 a 100 s⁻¹ para a curva ascendente e de 100 a 0 s⁻¹ para a curva descendente, durante 120 segundos cada.

[087] Os reogramas das formulações estão dispostos na Figura 9, na qual a relação entre a tensão de cisalhamento (Pa) e taxa de cisalhamento (1/s) evidencia que todas as formulações se comportaram como fluídos não newtonianos do tipo pseudoplástico.

[088] A partir dos dados obtidos através da Equação 2 e mostrados na Tabela 5, confirma-se que essas formulações se comportaram como fluídos pseudoplástico, uma vez que os valores de n foram menores que a unidade (n<1).

$$\text{Equação 2} - \tau = k \cdot \dot{\gamma}^n$$

em que: τ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência, $\dot{\gamma}$ é a tensão de cisalhamento e n é o comportamento de fluxo.

Tabela 5 - Comportamento de fluxo (n) e índice de consistência (K) dos sistemas.

Formulações	n	K
MEB	0,45	1,09
MEB-I1	0,20	9,41
MEB-I2	0,37	4,73
MEB-I3	0,20	9,57

[089] Neste modelo, $n > 1$ representa um fluido dilatante, $n < 1$ representa um fluido pseudoplástico e $n = 1$ representa um fluido newtoniano. Além disso, o grau de "pseudoplasticidade" pode ser medido pelo comportamento de fluxo (n), que aumenta com a diminuição da pseudoplasticidade. Já a viscosidade dinâmica das formulações pode ser avaliada com o índice de consistência (K) que aumenta com o aumento da viscosidade da formulação.

[090] Desse modo, o comportamento pseudoplástico pode ser devido à quebra de estruturas organizadas quando se aplica uma tensão, o que afinará o fluxo, facilitando a administração do sistema, o que é desejável para formulações.

[091] Através da Equação 2 também foi possível obter os valores de K, mostrados na Tabela 5. Observa-se que a incorporação dos compostos de Cu(II) na MEB aumentou o índice de consistência das formulações, sobretudo nas formulações MEB-I1 e MEB-I3, o que pode ser devido à interação desses complexos metálicos com os componentes da MEB.

[092] Pode-se sugerir que o íon metálico presente na esfera de coordenação desses compostos possa sofrer alguma interação com os componentes da formulação, e

consequentemente formar uma estrutura secundária, entretanto, para se discutir com maiores propriedades essa alteração de consistência, outros estudos serão realizados.

[093] A tixotropia das formulações também foi investigada. Observa-se através dos reogramas da Figura 9 que as formulações MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3 são tixotrópicas, uma vez que a curva de ida não se sobrepõe com a curva de volta, diferentemente da MEB que as duas curvas se sobrepuseram.

[094] Esse dado demonstra novamente a influência dos compostos de cobre(II) na MEB, uma vez que a presença dos diferentes complexos na MEB favoreceu a formação de novas estruturas quando se aumentou a taxa de cisalhamento, o que resulta na necessidade de um tempo maior para as formulações voltarem a sua estrutura inicial.

- Análise reológica oscilatória:

[095] Primeiramente, foi realizado o teste de varredura de tensão para determinação da região viscoelástica. Para esse teste foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1 Hz. Após a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, realizou-se o teste de varredura de frequência para determinação do módulo elástico (G') e módulo viscoso (G''). Para esse teste foi utilizada a faixa de frequência de 0 a 10 Hz, à tensão de 1 Pa.

[096] A análise oscilatória das formulações está ilustrada na Figura 10.

[097] Observa-se que o módulo de armazenamento das formulações MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3 é superior que o módulo de perda ($G' > G''$), demonstrando que a essas formulações tem

caráter elástico. Já a formulação MEB apresentou G'' maior que G' revelando uma ME com caráter viscoso.

[098] Esses dados corroboram os dados obtidos pela análise reológica contínua, uma vez que demonstram que a presença dos complexos metálicos influencia a estrutura da MEB, formando MEB com estruturas mais organizadas.

[099] Além disso, observa-se também através da Figura 10 que a formulação MEB-I3 e MEB-I2 apresentam valores maiores para G' , demonstrando que os compostos de Cu(II) presentes nessas formulações aumentam a elasticidade da formulação, sugerindo que tais formulações estão estruturadas por ligações químicas secundárias mais fortes.

- Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos:

- Avaliação visual:

[0100] A avaliação visual das MEBs (MEB, MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3) foram feitas periodicamente em um intervalo de 1 mês, visando à verificação de instabilidade nas formulações preparadas, mostraram-se estáveis frente ao tempo, pois não foram constatados precipitações dos compostos, separações de fases e contaminações por fungos durante o período observado.

- Determinação do pH das formulações envolvidas na presente invenção:

[0101] A determinação do pH das MEBs (MEB, MEB-I1, MEB-I2 e MEB-I3) foi realizada, diluindo-se as formulações a 5% em água MiliQ. Todas as formulações apresentaram pH próximo a 7,0.

- Ensaios biológicos frente ao Mycobacterium tuberculosis (MTB) para as amostras da MEB:

- Ensaio in vitro:

- Determinação da CIM dos compostos utilizando REMA, da citotoxicidade (IC₅₀) em células Vero (ATCC CCL81) e o índice de seletividade (IS):

[0102] Os resultados da CIM dos compostos de Cu(II) em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10000 µg/mL e incorporados na MEB, frente a cepa de MTB H₃₇Rv, da citotoxicidade (IC₅₀) sobre células epiteliais normais - Vero (ATCC CCL81) e o valor do IS da razão entre esses dois resultados, estão sumarizados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da CIM contra o MTB H₃₇Rv, da citotoxicidade (IC₅₀) sobre células Vero e o valor do IS da razão entre esses dois resultados dos compostos de Cu(II) em DMSO e incorporados na MEB.

Composto	Rema (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
I1	20,46	109,5	5,35
I2	5,913	314,3	53,15
I3	1,459	325,3	223
MEB	> 12,5	62,6	5,00
MEB-I1	0,397	367,6	831,2
MEB-I2	0,219	> 500	1639
MEB-I3	0,313	> 500	1597
INH	0,00348	> 500	143.678
RMP	< 0,004	145,2	36.300

[0103] Inicialmente foi determinada a CIM de cada composto, frente ao MTB H₃₇Rv ATCC 27294 utilizando a técnica de *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). Os compostos I2 e I3 em DMSO foram considerados ativos, pois, apresentaram atividade anti-MTB ≤ 10 µg/mL. Entretanto,

quando os complexos de Cu(II) foram incorporados na MEB, a atividade foi melhor. A CIM do complexo I1 foi de 20,46 para 0,397 µg/mL, do I2 de 5,913 para 0,219 µg/mL e do I3 de 1,459 para 0,313 µg/mL. Logo, a atividade foi potencializada em 52, 27 e 4,7 vezes para esses compostos, respectivamente.

[0104] Cabe mencionar que a MEB não apresentou atividade frente ao MTB, ou seja, não inibiu o crescimento antimicobacteriano, garantindo dessa forma que a atividade apresentada tenha sido exclusivamente exibida pelos compostos de coordenação e não por quaisquer outras interferências, como pelos componentes que constituem o sistema nanoestruturado.

[0105] No que diz respeito ao índice de citotoxicidade, o composto I1 em DMSO apresentou um IC₅₀ menor em relação aos demais complexos de cobre(II), ou seja, foi um pouco mais tóxico. Entretanto, após a incorporação na MEB, todos os complexos tiveram IC₅₀ maiores, ou seja, foram menos tóxicos.

[0106] A segurança terapêutica dos complexos foi calculada através da determinação do índice de seletividade (IS) que consistiu na razão entre o IC₅₀ e a CIM. Compostos que apresentam IS ≥10 podem ser aplicados na concentração de 10 ou mais vezes acima do valor de CIM sem apresentar citotoxicidade.

[0107] Quando o cálculo foi realizado para os compostos em DMSO, apenas os compostos I2 e I3 tiveram IS > 10, enquanto, após a incorporação, todos os complexos apresentaram a segurança terapêutica, como pode ser observado na Tabela 6.

[0108] Esses resultados mostraram que o sistema lipídico nanoestruturado (MEB) foi capaz de reduzir a citotoxicidade dos complexos, além de melhorar a atividade antimicobacteriana. Essas melhoras podem ser explicadas pela presença do colesterol na microemulsão, que pode promover a interação com a membrana celular, que é constituída por uma bicamada fosfolipídica.

- Determinação da CIM frente aos 5 isolados clínicos sensíveis, mono e MDR à INH e RMP com perfil fenotípico e genotípico de resistência determinados:

[0109] A CIM dos compostos frente aos isolados clínicos foi determinada empregando a metodologia do REMA e substituindo a cepa padrão H₃₇Rv por um painel de isolados clínicos sensíveis e MDR (Tabela 7).

Tabela 7 - Painel de isolados clínicos com perfil de resistência fenotípica determinada pela metodologia do REMA e resistência genotípica através do sequenciamento de genes detectados inicialmente pelo polimorfismo no DNA PCR-SSCP (PCR-Single Strand Conformation Polymorphism).

ISOLADOS	BACTEC MGIT 960		PERFIL FENOTÍPICO		PERFIL GENOTÍPICO												
	INH	RMP	REMA (µg/mL)		isoniazida			katG			ahpC			RIFAMPICINA			
			0,1 µg/mL	1,0 µg/mL	INH	RMP	Nucl.	códon	aa	Nucl.	códon	aa	Nucl.	códon	aa	Nucl.	códon
46	R Y	R Y	> 50 Y	> 50 Y		n.d.		G > C	315	Ser > Thr		n.d.			CA > TG	526	His > Cys
100	S X	S X	> 50 Y	< 0,195 X		n.d.			n.d.			n.d.			C > G	531	Ser > Trp
110	R Y	R Y	> 50 Y	0,4 X		n.d.			n.d.			n.d.			C > T	531	Ser > Leu
158	R Y	R Y	> 50 Y	> 50 Y		n.d.			n.d.			n.d.				n.d.	
169	R Y	R Y	> 50 Y	> 50 Y	C > T	15	Arg > Stop	T > A	337	Tyr > Asn	C > T	81	Hys > Tyr	C > T	531	Ser > Leu	

INH: Isoniazida; RMP: Rifampicina; Nucl.: nucleotídeo; aa: aminoácido; n.d. não detectado; X: sensível; Y: resistente

[0110] Os valores da CIM dos compostos de Cu(II) em DMSO e incorporados na MEB frente ao painel de isolados clínicos sensíveis, e resistentes a isoniazida (INH) e rifampicina (RMP) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) para amicacina (AM), capreomicina (CP), gatifloxacina (GTX), isoniazida (INH), canamicina (CM), moxifloxacina (MFX), ofloxacina (OFX) e rifampicina (RMP) e dos compostos I1, I2 e I3 em DMSO e incorporados na MEB, e a MEB, utilizando como metodologia o REMA (*Resazurin Microtiter Plate Assay*) frente aos isolados clínicos de MTB sensíveis e resistentes a INH e RMP.

Composto	46 ($\mu\text{g/mL}$)	100 ($\mu\text{g/mL}$)	110 ($\mu\text{g/mL}$)	158 ($\mu\text{g/mL}$)	169 ($\mu\text{g/mL}$)
I1	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5
I2	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5
I3	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5
MEB	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5	> 12,5
MEB-I1	> 12,5	12,2	> 12,5	> 12,5	12,3
MEB-I2	> 12,5	5,9	> 12,5	> 12,5	> 12,5
MEB-I3	> 12,5	0,10	> 12,5	> 12,5	12,4
Amicacina	0,9	0,7	0,5	0,6	0,6
Capreomicina	2,2	5,8	3,0	1,7	1,4
Gatifloxacina	1,4	0,5	< 0,049	0,2	1,2
Isoniazida	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
Canamicina	4,3	7,8	2,8	2,8	1,5
Moxifloxacina	2,1	0,4	< 0,049	0,2	1,6
Ofloxacina	3,8	0,9	0,3	0,7	11,5
Rifampicina	> 50	< 0,195	0,4	> 50	> 50

[0111] Dentre os 80 isolados de *M. tuberculosis* que compõem o painel, 5 foram selecionados e utilizados para análise. Assim, 1 isolado era sensível a INH e RMP, e 4 TB-MDR, segundo a técnica do BACTEC™ MGIT™ 960.

[0112] A avaliação de compostos frente a isolados clínicos resistentes pode fornecer dados sobre a possível resistência cruzada dos novos compostos com os fármacos. Os compostos com atividade inferior ou igual a 10 µg/mL, são considerados potenciais agentes anti-TB.

[0113] Os resultados da atividade dos compostos de Cu(II) em DMSO e incorporados na MEB, frente às micobactérias do painel, foram:

[0114] Para I1, I2, I3 e MEB não apresentaram atividade promissora sobre os isolados clínicos, pois, apresentaram CIM acima de 10 µg/mL. Para todos os isolados apresentaram CIM > 12,5 µg/mL.

[0115] Para MEB-I1 não apresentou atividade promissora sobre 5 isolados (CIM > 10 µg/mL), entretanto, para os isolados 100 e 159, que são resistentes a INH e RMP, apresentou MIC de 12,2 e 12,3 µg/mL, respectivamente.

[0116] Para MEB-I2 apresentou atividade promissora sobre 1 isolado (CIM ≤ 10 µg/mL), 1 sensível com CIM de 5,9 µg/mL. Para todos os demais isolados apresentou CIM > 12,5 µg/mL.

[0117] Para MEB-I3 apresentou atividade promissora sobre 1 isolado (CIM ≤ 10 µg/mL), 1 sensível com CIM de 0,10 µg/mL. Para os isolados 46, 110 e 158, resistentes a INH e RMP apresentou CIM 12,5 µg/mL e para o 169 que também é resistente as duas drogas, teve uma CIM = 12,4 µg/mL.

[0118] Deste modo, os compostos de Cu(II), quando

incorporados no sistema MEB, demonstraram uma melhor atividade frente aos isolados clínicos testados, principalmente os complexos MEB-I2 e MEB-I3, quando comparada a atividade dos mesmos em DMSO.

[0119] O composto MEB-I2 apresentou uma CIM de 5,9 µg/mL para o isolado 100, atividade comparável a da capreomicina (5,8 µg/mL) e melhor que a da kanamicina (7,8 µg/mL) fármacos injetáveis de segunda linha.

[0120] A incorporação do composto I3 no sistema lipídico nanoestruturado (MEB-I3), melhorou em 125 vezes a sua atividade frente ao isolado 100 analisado quando comparado com a sua CIM em DMSO. Quando se compara a CIM do MEB-I3 (0,10 µg/mL) com a dos fármacos padrões também analisados, pode-se observar que o complexo metálico de Cu(II) é mais ativo que todos, exceto para rifampicina.

[0121] Analisando os resultados frente ao isolado 100 dos compostos I1, I2 e I3, verifica-se que há resistência cruzada com o fármaco INH. Entretanto, após a incorporação no sistema MEB, os compostos MEB-I2 e MEB-I3 não apresentaram essa resistência cruzada com a isoniazida, podendo sugerir que o mecanismo de ação/ ou alvos desses compostos são diferentes do fármaco quando se faz uso da nanotecnologia.

- Avaliação da atividade dos compostos incorporados em microemulsão lipídica, sistema B (MEB), frente ao MTB persistente sem replicação, empregando MTB recombinante H₃₇Rv (pFCA-luxAB) e ensaio de recuperação com baixa oxigenação (LORA-Low Oxygen Recovery Assay):

[0122] Na Tabela 9 são apresentados os resultados da CIM dos compostos de Cu(II) incorporados no sistema MEB

e dos fármacos padrão INH e RMP frente ao MTB H₃₇Rv (pFCA-luxAB) em estado de latência.

Tabela 9 - CIM dos compostos de Cu(II) incorporados no sistema MEB, e dos fármacos padrão INH e RMP frente ao MTB H₃₇Rv (pFCA-luxAB) em estágio de persistente sem replicação fase II (PSR II).

Composto	LORA (µg/mL)
MEB-I1	5,750
MEB-I2	20,01
MEB-I3	22,60
INH	15,74
RMP	3,120
SM	0,528
PA-824	0,388

[0123] Há ampla evidência circunstancial a partir da observação da história natural da TB em humanos e animais experimentais que MTB é capaz de se adaptar a períodos prolongados de dormência nos tecidos, e que estes bacilos latentes são responsáveis pela latência da doença em si. Além disso, os bacilos dormentes são resistentes à morte por agentes antimicobacterianos, o que dificulta o controle e a erradicação da TB.

[0124] MTB que requer abundância de O₂ para multiplicação ativa se torna microrganismo persistente sem replicação (PSR) quando submetido a uma depleção gradual e controlada das condições de O₂. A mudança de crescimento ativo aeróbio (CAA) para PSR, durante a depleção controlada de O₂ ocorre em 2 fases discretas, que inicia com microaerofilia fase I (PSR I) e finaliza com a fase anaeróbia II (PSR II).

[0125] O entendimento do estado fisiológico no MTB em estado de latência é importante porque possibilita sugerir estratégias para desenvolvimento de novos quimioterápicos em erradicar tais infecções já que há uma carência de fármacos ativos contra bactérias latentes na terapêutica atual. Alguns compostos novos atualmente na fase clínica, como por exemplo, TMC-207 e PA-824 apresentaram atividade *in vitro*, sobre infecção latente.

[0126] Desta forma, os compostos de Cu(II) incorporados no sistema MEB, como observado na Tabela 8, apresentaram atividade *in vitro* em bactérias PSR II pelo modelo do LORA, mais especificamente, o composto MEB-I1 que apresentou uma atividade melhor que um dos fármacos utilizados atualmente na terapia, a INH, podendo ser um possível candidato a fármaco no tratamento da TB da infecção latente.

- Avaliação da toxicidade aguda dos compostos de Cu(II) em DMSO frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae):

[0127] Os dados de concentração letal mediana (CL₅₀) dos compostos de Cu(II) solubilizados em DMSO frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae) estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentração letal mediana (CL₅₀) dos compostos de Cu(II) em DMSO frente à *Artemia salina* L. (Artemiidae).

Composto	CL ₅₀ (µg/mL)
I1	17,1
I2	7,80
I3	244,1
Solvente DMSO 2%	> 1500

[0128] *Artemia salina* L. (Artemiidae), o camarão de

água salgada, é um componente invertebrado da fauna dos ecossistemas aquáticos e marinhos salinos. Ela desempenha um papel importante no fluxo de energia da cadeia alimentar e pode ser utilizado em bioensaio de laboratório para determinar a toxicidade através da concentração letal mediana (CL₅₀).

[0129] Analisando a Tabela 10 observa-se que o composto I3 foi o menos tóxico frente à *Artemia salina* L., que está de acordo com os resultados obtidos para células epiteliais Vero.

- Ensaios in vivo:

- Coleta do plasma para a avaliação da biodisponibilidade oral, através do screening farmacocinético em camundongos BALB/c:

[0130] Os animais com idade entre 4-8 semanas foram divididos em grupos de 4 animais cada e receberam uma dose oral por gavagem de cada composto incorporado ou não na MEB, 300 mg/Kg.

[0131] Os compostos I1, I2 e I3 quando não incorporados na MEB foram administrados solubilizados em óleo de girassol, pois o mesmo não apresenta toxicidade. Os compostos foram administrados de acordo com a Tabela 11.

Tabela 11 - Grupos dos camundongos utilizados para a avaliação da biodisponibilidade.

Grupo	Composto
1	I1
2	I2
3	I3
4	Óleo de girassol
5	MEB-I1

6	MEB-I2
7	MEB-I3
8	MEB

[0132] Observou-se que 24 horas após a administração do composto I1 solubilizado em óleo de girassol, todos os camundongos desse grupo morreram, enquanto que para os grupos que receberam apenas o óleo de girassol e o composto I1 incorporado na MEB, não houve perda de nenhum animal.

[0133] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas **caracterizado** por compreender as etapas de:

a) Síntese dos compostos de Cu(II),

b) Síntese dos sistemas lipídicos nanoestruturados,

e

c) Incorporação dos compostos de Cu(II) nos sistemas lipídicos nanoestruturados;

em que:

a etapa "a" compreende as subetapas de:

a.1) Dissolução do cloreto de cobre dihidratado em metanol,

a.2) Gotejamento da solução metanólica compreendendo o ligante isoniazida, sob agitação magnética e temperatura ambiente, e

a.3) Filtração, lavagem e secagem dos compostos;

a etapa "b" compreende as subetapas de:

b.1) Mistura da fase oleosa (FO) e do sistema tensoativo (T),

b.2) Titulação com a fase aquosa (FA),

b.3) Sonicação da solução com banho de gelo seguida de centrifugação; e

a etapa "c" compreende as subetapas de:

c.1) Adição do composto de Cu(II) na ME lipídica para obter uma concentração de 10 mg/mL; e

c.2) Homogeneização da mistura, com banho de gelo.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "a.1", a concentração de cloreto de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ser 0,05 g (0,293 mmols), em que a concentração de metanol varia de 10 a 20

mL, preferencialmente 15 mL.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "a.2", a solução metanólica compreendendo o ligante isoniazida (INH) ser em concentração de 0,0804 g (0,586 mmols), para a síntese do composto $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I1), e de 0,161 g (1,17 mmols), para a síntese dos complexos $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I3).

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, **caracterizado** por, ainda na subetapa "a.2", a agitação magnética variar de 200 a 600 rpm, com duração de tempo de 3 horas, em temperatura ambiente.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 3 ou 4, **caracterizado** por, ainda na subetapa "a.2", para os complexos (I2) e (I3), ser gotejada uma concentração que varia de 2 a 10 mL, preferencialmente 5,0 mL, de uma solução aquosa compreendendo 0,0475 g (0,0586 mmols), de tiocianato de sódio e 0,0476 g (0,0587 mmols), de cianeto de sódio, respectivamente.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "a.3", os compostos obtidos na subetapa anterior serem isoladas por filtração, lavados com metanol e secos sob vácuo.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "b.1", a fase oleosa (FO) ser selecionada do grupo que consiste em colesterol, ácido micólico ou a mistura dos dois, preferencialmente colesterol.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 7, **caracterizado** por, na subetapa "b.1", o sistema tensoativo

(T) selecionado do grupo que consiste em polioxietileno 20 cetil éter, fosfatidilcolina de soja, óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado, oleato de sódio, polieoxietileno 20 oleil éter, ou mistura desses, preferencialmente a mistura de oleato de sódio, fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7; e mistura de polioxietileno 20 oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 7 ou 8, **caracterizado** por, na subetapa "b.2", a fase aquosa ser selecionada do grupo que consiste em tampão fosfato pH 7,4, dispersão polimérica de poloxamer 407 a 5%, ou a mistura dos dois em uma razão de 9:1, preferencialmente solução em tampão fosfato pH 7,4.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "b.3", a sonicação da mistura ser realizada por sonicador de haste com potência de 700 watts, amplitude de 15%, modo descontínuo, por 8 a 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada dois minutos, com banho de gelo durante todo o processo.

11. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 10, **caracterizado** por as microemulsões serem centrifugadas à força centrífuga de 11.180 (x g) por tempo que varia de 15 a 25 min, preferencialmente 15 minutos.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 1, 7, 8, 9, 10 ou 11, **caracterizado** por, preferencialmente, o sistema lipídico ser constituído de colesterol como fase oleosa, mistura de oleato de sódio, fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo e tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como

fase aquosa (sistema MEB); e colesterol como fase oleosa, mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo e solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa (sistema MEC).

13. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por, na subetapa "c.2", a homogeneização ser através de sonicação durante 2 minutos, amplitude de 15%, em modo descontínuo, com banho de gelo.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 1 ou 13, **caracterizado** por a incorporação do material na microemulsão lipídica ser na concentração de 10 mg/mL, em que o tamanho das nanoestruturas lipídicas compreendendo cobre-isoniazida varia de 10 a 250 nm, preferencialmente 190 nm, o índice de polidispersidade varia de 0,1 a 0,3, e o potencial zeta varia de -0,0069 a -8,430 mV.

15. Nanoestruturas lipídicas obtidas conforme o processo definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 14, **caracterizadas** por compreender compostos cobre-isoniazidas selecionadas dentre $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (I1), $[\text{Cu}(\text{NCS})_2(\text{INH})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (I2) e $[\text{Cu}(\text{NCO})_2(\text{INH})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (I3), incorporadas nos sistemas MEB e MEC.

16. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEB-I1 compreender 0,02 g de $[\text{CuCl}_2(\text{INH})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;
- 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-

hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

17. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEB-I2 compreender 0,02 g de [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

18. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEB-I3 compreender 0,02 g de [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de oleato de sódio (OS), fosfatidilcolina de soja e óleo de rícino polioxil-40-hidrogenado na proporção de 2:1:2,7 como tensoativo; e

- 80% de solução tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 como fase aquosa.

19. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEC-I1 compreender 0,02 g de [CuCl₂(INH)₂]·H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como

tensoativo; e

- 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.

20. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEC-I2 compreender 0,02 g de [Cu(NCS)₂(INH)₂]·5H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo; e

- 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.

21. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizadas** pelo fato da MEC-I3 compreender 0,02 g de [Cu(NCO)₂(INH)₂]·4H₂O na mistura constituída:

- 10% de colesterol como fase oleosa;

- 10% da mistura de polioxietileno 20-oleil éter e fosfatidilcolina de soja na proporção de 2:1 como tensoativo; e

- 80% de solução compreendendo tampão-fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,4 e dispersão polimérica de poloxamer 407 5% na proporção de 9:1 como fase aquosa.

22. Nanoestruturas lipídicas, de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 21, **caracterizadas** por o tamanho das partículas variar de 10 a 250 nm e o índice de polidispersão variar de 0,1 a 0,3.

23. Uso das nanoestruturas lipídicas, conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 15 a 22, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para combate a micobactérias.

24. Uso das nanoestruturas lipídicas, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento da tuberculose, preferencialmente a tuberculose ativa e latente.

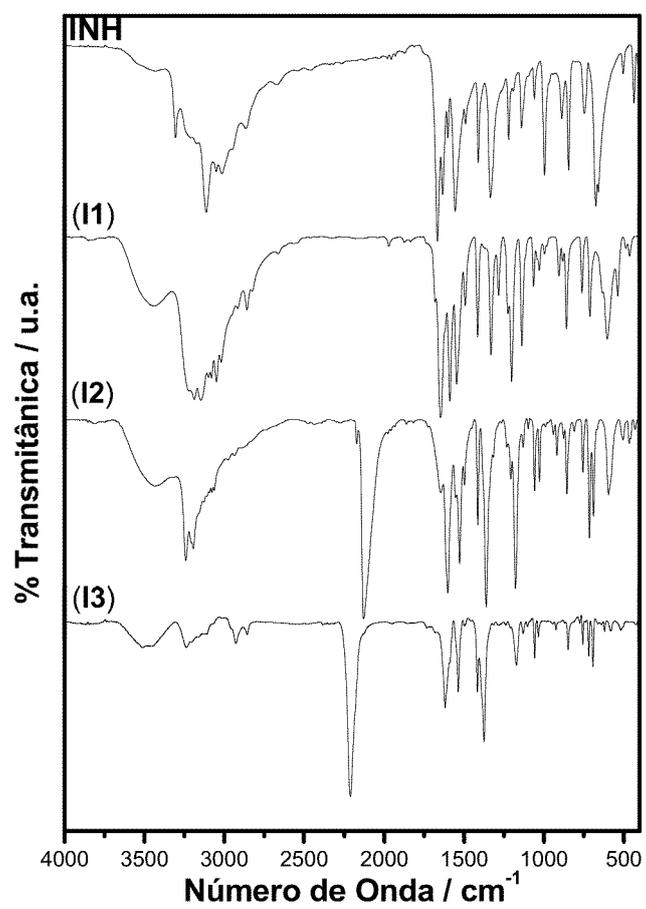


Figura 1

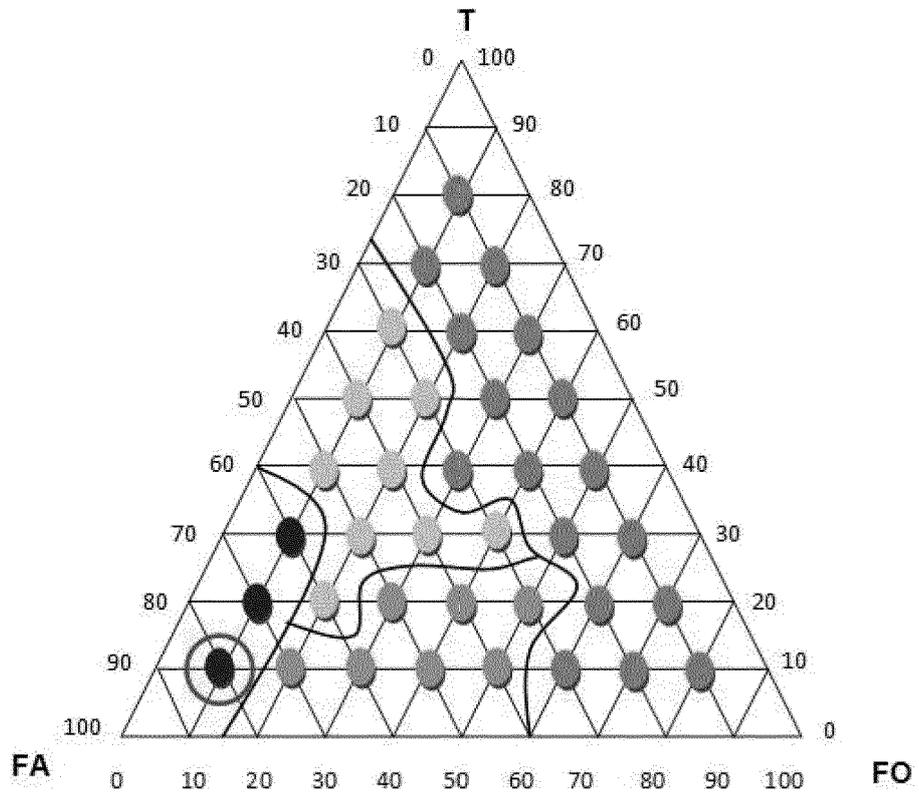


Figura 2

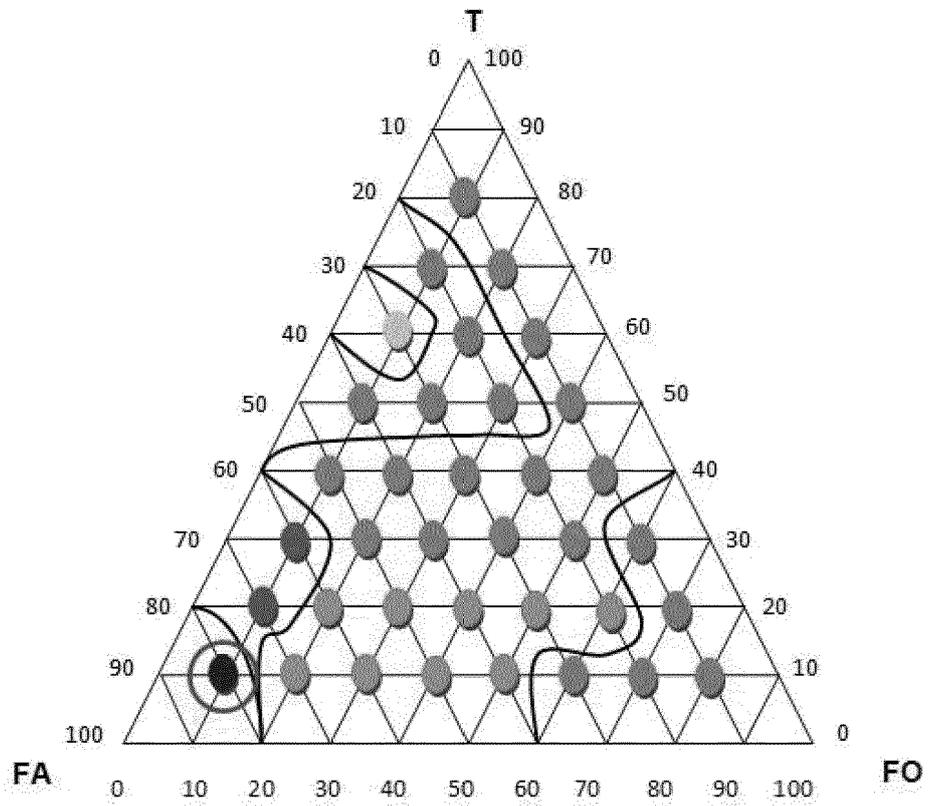


Figura 3

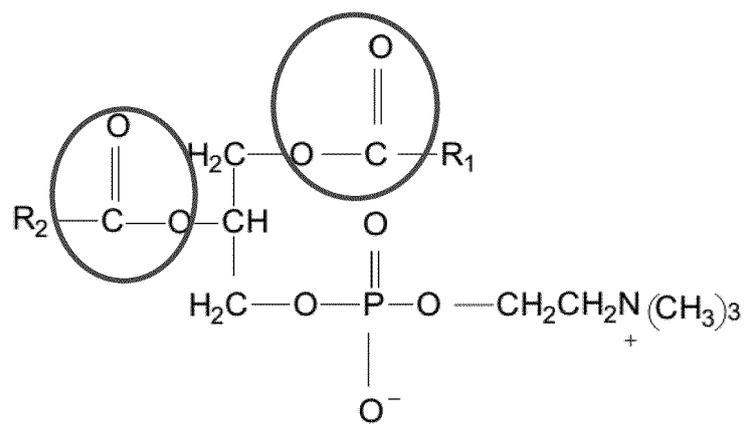


Figura 4

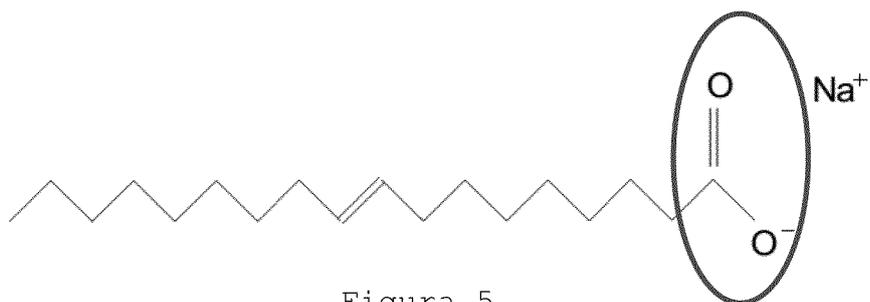


Figura 5

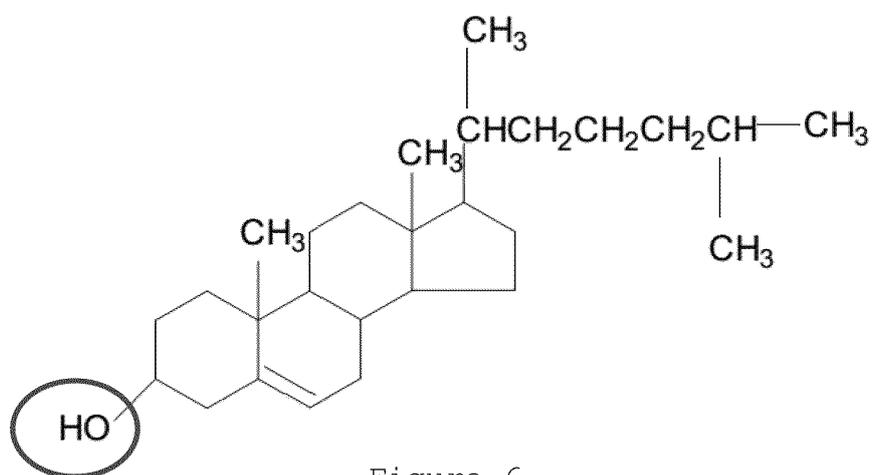


Figura 6

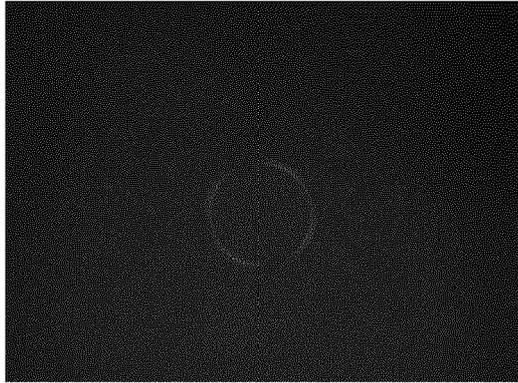


Figura 7

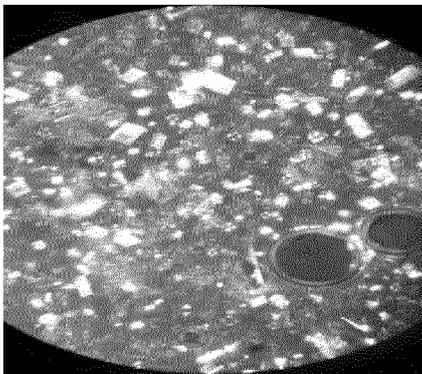


Figura 8A

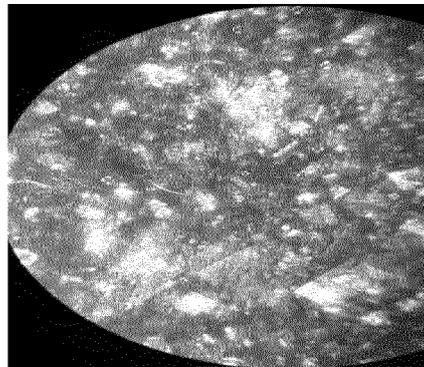


Figura 8B

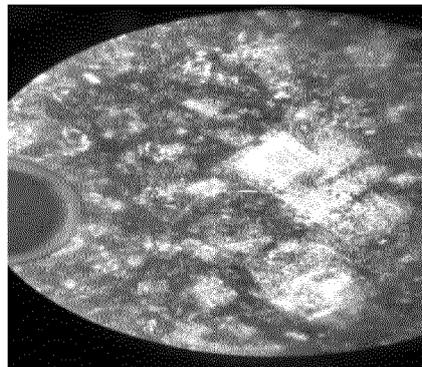


Figura 8C

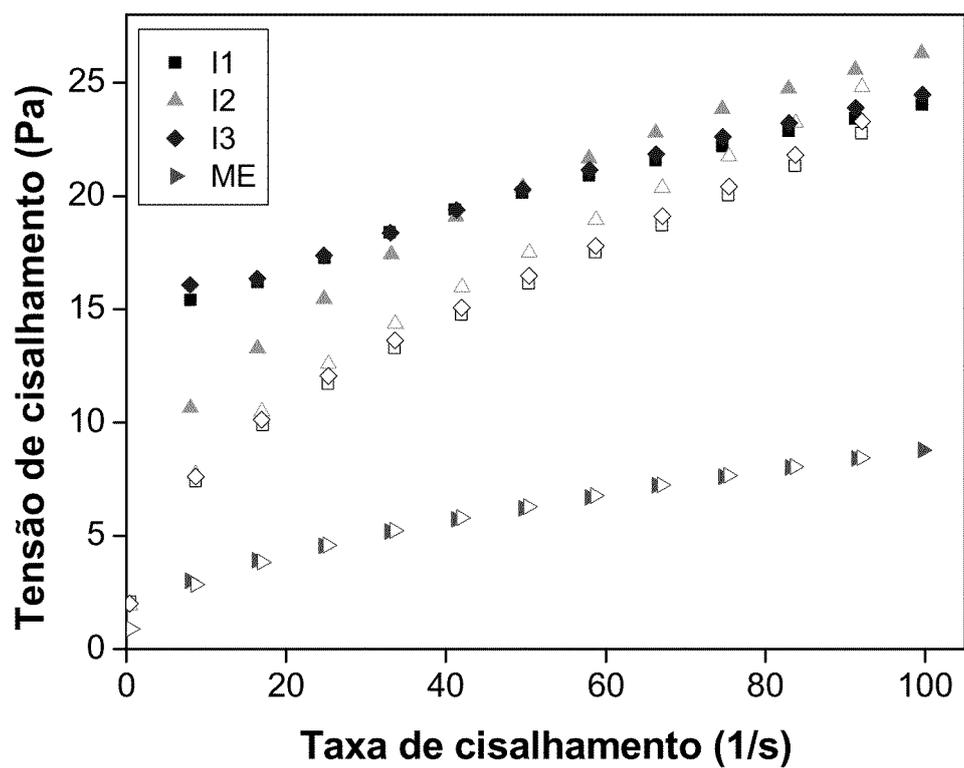


Figura 9

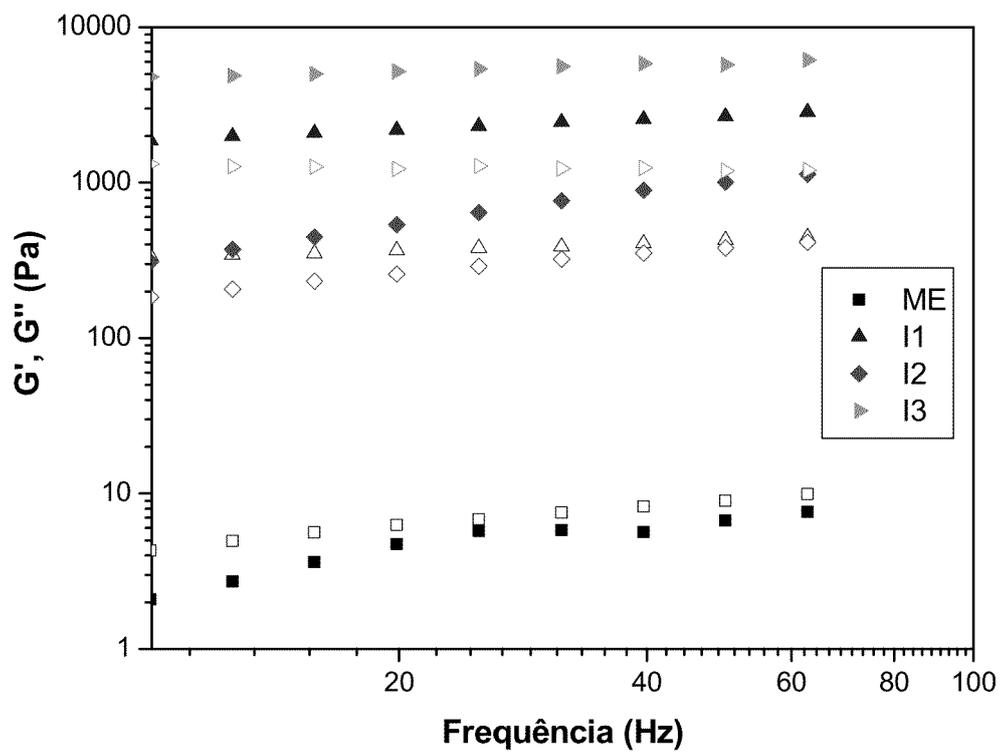


Figura 10

RESUMO

**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS,
NANOESTRUTURAS LIPÍDICAS OBTIDAS E USO DAS MESMAS**

A presente invenção faz referência a um processo de obtenção de nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida.

Adicionalmente, a presente invenção se refere às nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, bem como seu uso no preparo de medicamentos para combate a micobactérias em geral.

Em uma modalidade preferida, a invenção proposta se refere ao uso das nanoestruturas lipídicas compreendendo compostos cobre-isoniazida obtidas conforme o processo aqui descrito, preferencialmente a MEB-I3 e MEB-I1, para o preparo de medicamentos para tratamento de tuberculose ativa e latente, respectivamente.