



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

(21) **PI1001052-1 A2**

(22) Data de Depósito: 22/04/2010  
(43) Data da Publicação: 13/12/2011  
(RPI 2136)



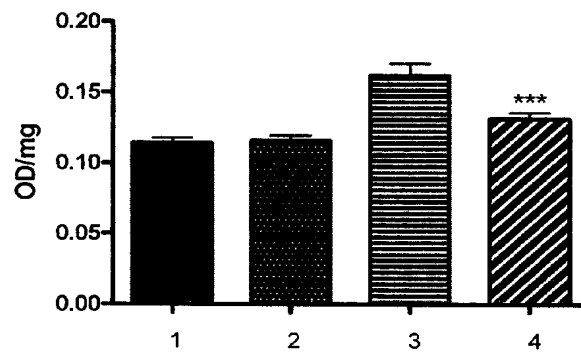
(51) *Int.Cl.:*  
A61K 31/05  
A61K 31/395  
A61K 31/4409

(54) **Título:** FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR HEPATOTOXICIDADE

(73) **Titular(es):** União Brasileira de Educação e Assistência - Mantenedora da PUC RS

(72) **Inventor(es):** André Arigony Souto, Diógenes Santiago Santos, Luiz Augusto Basso, Maria Martha Campos, Natália Fontana Nicoletti

(57) **Resumo:** FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR HEPATOTOXICIDADE. A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica e um processo para evitar e/ou reduzir a hepatotoxicidade associada ao tratamento da tuberculose diminuindo o tempo de tratamento e evitando cepas resistentes da *Mycobacterium tuberculosis*. A formulação farmacêutica da presente invenção compreende resveratrol, um composto tuberculostático e um veículo farmacêuticamente aceitável. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR HEPATOTOXICIDADE

#### 5 **Campo da Invenção**

A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica e um processo para evitar e/ou reduzir a hepatotoxicidade associada ao tratamento da tuberculose diminuindo o tempo de tratamento e evitando cepas resistentes da *Mycobacterium tuberculosis*. A formulação farmacêutica da presente invenção  
10 compreende resveratrol, um composto tuberculostático e um veículo farmacêuticamente aceitável. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.

#### **Antecedentes da Invenção**

15 A Tuberculose (TB) ativa é tratada com múltiplas drogas. O tratamento de primeira linha indicado para os casos de todas as formas de TB pulmonar e extrapulmonar consiste no uso de dois meses de rifampicina (RIF), pirazinamida (PZ) e isoniazida (INH), seguido de 4 meses de uso RIF e INH (RH). A RIF possui atividade bactericida contra *M. tuberculosis* pela inibição da  
20 RNA polimerase dependente do DNA bacteriano. A INH é um pró-fármaco ativado pela catalase-oxidase bacteriana (KatG) e reduz ativamente o crescimento dos bacilos pela inibição da biossíntese de ácidos micólicos, que é um componente essencial da parede celular do *M. tuberculosis*. Um outro pró-fármaco, a PZA, é ativado pela pirazinamidase bacteriana, o que ocorre apenas  
25 em condições ácidas (pH 5,5). O metabólito ativo é o ácido pirazinóico que inibe a síntese de ácidos graxos no *M. tuberculosis*. Esta droga é utilizada nos dois meses iniciais de tratamento, a fim de reduzir a duração da terapia, não sendo utilizada de forma isolada.

Os efeitos adversos mais freqüentes relacionados ao uso de  
30 tuberculostáticos são: hepatotoxicidade, manifestações cutâneas variadas e distúrbios neurológicos e gastrointestinais, sendo a hepatotoxicidade o mais

sério destes efeitos. As drogas usadas nos esquemas de tratamento de TB apresentam interações entre si e com outras drogas, o que aumenta o risco de toxicidade. Os fármacos anti-TB sofrem metabolização e a incidência de hepatotoxicidade durante o tratamento com a utilização múltiplas drogas varia entre 2% e 28%. As reações adversas causadas pelas drogas antituberculose contribuem significativamente para a não aderência ao tratamento, o que diminui sua efetividade e aumenta o surgimento de resistência às drogas. A hepatotoxicidade induzida por drogas anti-TB está associada com morbimortalidade significativa e pode diminuir a efetividade do tratamento. Elevações assintomáticas das transaminases são comuns durante o tratamento, mas a hepatotoxicidade pode ser fatal quando não diagnosticada precocemente e quando a terapia não é interrompida a tempo.

A presente invenção consiste em uma formulação farmacêutica para evitar a hepatotoxicidade no tratamento da tuberculose diminuindo o tempo de tratamento e evitando cepas resistentes da *Mycobacterium tuberculosis* e o uso dessa formulação farmacêutica.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir.

O documento PI 0514026-9 A2 descreve uma combinação compreendendo pelo menos um ácido graxo ômega-3, opcionalmente esterificado ou salificado, pelo menos uma estatina, coenzima Q10, resveratrol, pelo menos um policonasol, pantetina, selênio e zinco. Essa combinação é favorecida com um efeito sinérgico e é útil no tratamento de formas de doença devido à resistência a insulina e em doenças cardiovasculares. A presente invenção difere do documento citado pelo fato de utilizar o resveratrol para evitar a hepatotoxicidade causada por medicamentos utilizados no tratamento da tuberculose.

O documento US 2009/0163580 A1 descreve formulações e processos de tratamento e prevenção putativos para envelhecimento (composição anti-envelhecimento) e para doenças ou condições de todas as doenças espécies dependente reativas de oxigênio, como a doença de Alzheimer, doença de

Parkinson, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, câncer, hepatite e doenças associadas à deficiência de estrogênio, incluindo osteoporose e câncer de mama e para melhorar o desempenho atlético dos seres humanos, incluindo resveratrol e dois ou mais das seguintes funcionalidades ou ingredientes ativos adicionais: formulação de lenta liberação de resveratrol, pterostilbeno; quercetina, fisetina e naringenina. A presente invenção difere desse documento por descrever uma formulação baseada em resveratrol para evitar a hepatotoxicidade causada pelo tratamento da tuberculose, resultando assim em um tratamento mais rápido e evitando-se, assim, o surgimento de cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.

O documento CN101259107 descreve uma formulação com resveratrol para o tratamento de fibroses hepáticas quando geradas por hepatites crônicas. A presente invenção difere desse documento por prevenir efeitos hepatotóxicos durante o tratamento com agentes tuberculostáticos.

Os documentos US2007212395-A1, US2006205679-A1, US2004029871 (A), WO2009089011-A2, WO2007149865-A2, WO2009089011-A2 descrevem o uso do resveratrol como possível agente tuberculostático. A presente invenção difere desses documentos por utilizar uma formulação farmacêutica para prevenção da hepatotoxicidade no tratamento da tuberculose.

O artigo intitulado "Resveratrol ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice" de Fan, Guijuan et al. National Laboratory of Applied Organic Chemistry, Lanzhou University, Lanzhou, Peop. Rep. China. Environmental Toxicology and Pharmacology (2009), 28(3), 350-356. Publisher: Elsevier B.V., CODEN: ETOPFR ISSN: 1382-6689, descreve a avaliação do potencial hepatoprotetor do resveratrol (30 mg / kg, via oral) em ratos após 2 rotas diferentes (por via oral e sc) de exposição ao tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>, 1,0 mL / kg). A administração de CCl<sub>4</sub> causou um aumento significativo na liberação de transaminases, desidrogenase lactato, transpeptidase  $\gamma$ -glutamina, quinase de creatinina, bilirrubina total, uréia e ácido úrico no soro. Lesão hepática foi mais grave nos animais que receberam CCl<sub>4</sub> por via oral do que aqueles que foram expostos a CCl<sub>4</sub> por via (sc). O

tratamento com resveratrol foi capaz de atenuar os danos hepáticos induzidos por intoxicação aguda de CCl<sub>4</sub> e mostrou grande efeito curativo contra peroxidina lipídica e desviou de soro enzimático variáveis, bem como manteve o status de glutatona para controle. Tratamento do resveratrol diminuiu danos induzidos por CCl<sub>4</sub> no fígado. Aparentemente, o resveratrol tem potencial para exercer efeitos curativos contra lesões no fígado. No entanto, esse trabalho não sugere que esse efeito esteja também presente quando da administração de agentes úteis no tratamento da tuberculose.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

#### **Breve Descrição das Figuras**

A Figura 1 descreve a reversão da atividade aspartato aminotransferase (AST) após o tratamento com resveratrol (RSV) isoniazida (INH)+ rifampicina (RIF), onde: 1- Salina; 2- Resveratrol (RSV); 3- Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF) e 4- Resveratrol (RSV) + Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF).

A Figura 2 mostra a reversão da atividade da alanina aminotransferase (ALT) após o tratamento com resveratrol (RSV)+ isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), onde: onde: 1- Salina; 2- Resveratrol (RSV); 3- Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF) e 4- Resveratrol (RSV) + Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF).

A Figura 3 mostra a reversão da atividade mieloperoxidase (MPO) após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), onde: onde: 1- Salina; 2- Resveratrol (RSV); 3- Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF) e 4- Resveratrol (RSV) + Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF).

A Figura 4 mostra a manutenção dos níveis de atividade da catalase após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), onde onde: 1- Salina; 2- Resveratrol (RSV); 3- Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF) e 4- Resveratrol (RSV) + Isoniazida (INH) + Rifampicina (RIF).

A figura 5 mostra secções de fígado dos camundongos nos grupos salina (A) e RSV (B) apresentaram arquitetura histológica hepática normal. O grupo tratado com as drogas INH + RIF (C) apresentou esteatose moderada, enquanto o grupo pré-tratado com RSV apresentou histologia hepática normal (D).

### **Sumário da Invenção**

Em um aspecto, a presente invenção tem como objeto uma formulação farmacêutica útil no tratamento da tuberculose e que apresenta reduzida hepatotoxicidade quando comparada às formulações já existentes. Essa formulação tem como vantagem a diminuição do tempo de tratamento e também evita o surgimento de cepas resistentes da *Mycobacterium tuberculosis*.

É um objeto da presente invenção uma formulação farmacêutica que compreende:

- a) resveratrol;
- b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
- c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

É um adicional objeto da presente invenção uma formulação farmacêutica útil na manufatura de um medicamento útil no tratamento da tuberculose.

É um objeto adicional da presente invenção um processo para reduzir a hepatotoxicidade associada à administração de pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose compreendendo a etapa de administrar uma composição compreendendo:

- a) resveratrol;
- b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
- c) um veículo farmacêuticamente aceitável;

a um mamífero necessitando de tratamento.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

5 **Descrição Detalhada da Invenção**

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

**Formulação Farmacêutica**

10 A formulação farmacêutica da presente invenção é uma formulação útil no tratamento da tuberculose e apresenta reduzidos efeitos colaterais quando comparada com as formulações existentes, além de diminuir o tempo de tratamento através do aumento da dose dos fármacos indicados para tuberculose e evitar o surgimento de cepas resistentes da *Mycobacterium*  
15 *tuberculosis*. Essa formulação compreende:

- a) resveratrol;
- b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
- c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

Exemplos de compostos úteis no tratamento da tuberculose incluem,  
20 sem limitações, etambutol, rifampicina, pirazinamida, isoniazida, streptomina, ciprofloxacina, morfloxacina, corticosteróides, e combinações dos mesmos. Os efeitos adversos mais freqüentes relacionados ao uso desses agentes são: hepatotoxicidade, manifestações cutâneas variadas e distúrbios neurológicos e gastrointestinais, sendo a hepatotoxicidade o mais sério destes efeitos. As  
25 drogas usadas nos esquemas de tratamento de TB apresentam interações entre si e com outras drogas, o que aumenta o risco de toxicidade. Os fármacos antituberculose sofrem metabolização e a incidência de hepatotoxicidade durante o tratamento com a utilização múltiplas drogas varia entre 2% e 28%. As reações adversas causadas pelas drogas antituberculose  
30 contribuem significativamente para a não aderência ao tratamento, o que diminui sua efetividade e aumenta o surgimento de resistência às drogas.

Embora, de acordo com a presente invenção, o uso de resveratrol, e preferivelmente de *trans*-resveratrol, seja preferencial na preparação da composição da invenção, os técnicos no assunto também irão identificar que o processo de redução da hepatotoxicidade da invenção pode ser aplicado aos derivados de resveratrol, como seus derivados metilados e/ou acetilados. Exemplos de derivados metilados incluem *trans*-3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-estilbeno, *trans*-3,5,4'-trimetoxi-estilbeno e *trans*-3,5-hidroxi-4'-metoxi-estilbeno, enquanto exemplos de derivados acetilados incluem *trans*-3,5-diacetil-4'-hidroxi-estilbeno, *trans*-3,5,4'-triacetil-estilbeno e *trans*-3,5-hidroxi-4'-acetil-estilbeno.

Preferencialmente, a proporção de resveratrol: composto útil no tratamento da tuberculose varia entre 0,4:1 a 2:1.

Para os efeitos da presente invenção, por "composições farmacêuticas" entende-se toda e qualquer composição com um princípio ativo, com finalidade profilática, paliativa e/ou objetivos curativos, e um veículo/transportador farmacêuticamente aceitável, a dita composição agindo através da administração oral, tópica, parenteral, enteral e/ou intratecal.

#### Processo de Redução da Hepatotoxicidade

O processo para reduzir a hepatotoxicidade associada à administração de pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose é um processo que compreende a etapa de administrar uma composição compreendendo:

- a) resveratrol;
  - b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
  - c) um veículo farmacêuticamente aceitável;
- a um mamífero necessitando de tratamento.

Preferencialmente, o mamífero é o homem.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados em dose oral, como comprimidos, cápsulas (cada um inclui formulações de liberação sustentada ou liberação programada), pílulas, pós, grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Eles também podem ser administrados por infusão e injeção subcutânea ou intramuscular, todos eles usando doses

conhecidas para técnicos no assunto na área farmacêutica. Eles podem ser administrados isoladamente, mas em geral, são administrados com um veículo farmacologicamente aceitável, selecionados com base na via de administração escolhida e no padrão da prática farmacêutica.

5 O regime de dose para os compostos da presente invenção irão variar, é claro, de acordo com os fatores conhecidos, tais como: características farmacodinâmicas de um agente específico e modalidade e via de administração, raça, idade, sexo, saúde, condição médica e peso do receptor, natureza e extensão dos sintomas, tipo de tratamento simultâneo, frequência  
10 de tratamento, via de administração, função hepática e renal do paciente/usuário e do efeito almejado. Por exemplo, formas sólidas orais, preferencialmente possuem, além do princípio ativo, um veículo farmacologicamente aceitável compreendendo um ou mais solventes, tais como, lactose, dextrose, sacarose, celulose, amido de milho ou fécula de batata; um  
15 ou mais lubrificantes, como sílica, pó, ácido esteárico, estearato de magnésio ou cálcio, ou de polietileno glicol, um ou mais agentes de ligação (aglutinantes), tais como, amidos, mucilagem, gelatina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou polivinilpirrolidona; um ou mais agentes desagregadores, tais como, amido, ácido algínico, alginatos ou glicolato de amido sódico; misturas efervescentes;  
20 corantes; agentes açucarados; um ou mais agentes umectantes, como a lecitina, polissorbato, lauril sulfato e substâncias farmacologicamente inativas e não-tóxicas geralmente utilizadas em formulações farmacêuticas e amplamente conhecidas pelos técnicos da área.

As composições da presente invenção podem ser fabricadas de maneiras  
25 conhecida, por exemplo, por meio de mistura, granulação, prensagem de comprimido, revestimento de açúcar, ou processos de revestimento por filme. Xaropes podem ter veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como, sacarose ou sacarose com glicerina e/ou manita (manitol) e/ou sorbitol. Suspensões e emulsões podem ter veículo farmacologicamente aceitável, como por exemplo,  
30 uma goma natural, ágar, alginato de sódio, pectina, metilcelulose, carboximetilcelulose ou álcool polivinílico. As formas destinadas a injeções

intramusculares podem ter, além do princípio ativo, veículo farmacologicamente aceitável, tais como, água estéril, azeite, oleato de etila, propilenoglicol e uma quantidade adequada de cloridrato de lidocaína. Na presente invenção, as formas orais são as preferenciais.

5 A seguir a presente invenção será ilustrada pelo exemplo abaixo, que não deve ser considerado como limitante da técnica.

#### Realização preferencial

**Animais:** Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos BALB/c machos, de aproximadamente 4 semanas, pesando entre 25 e 30g.

#### 10 **Etapas:**

Os animais foram mantidos, até atingirem o peso desejado, em estantes equipadas com filtros de entrada e saída de ar, com temperatura controlada ( $22 \pm 1$  °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h; luzes apagadas às 19 h). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus (troçadas 3 vezes por semana), em número de 6 animais por gaiola. Os animais receberam ração peletizada e água filtrada *ad libitum*. Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental.

20 Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em  $22 \pm 1$  °C. Não foram utilizados métodos analgésicos, pois os mesmos poderiam interferir nos parâmetros a serem avaliados. Para eutanásia, foi utilizado o método de deslocamento cervical – método altamente recomendado, que apresenta a rapidez, a eficácia e a facilidade necessárias, para animais com menos de 100 g. A coleta de sangue foi realizada por punção da aorta abdominal (400 a 500 µl de sangue) e, posteriormente, o fígado dos animais foi coletado para as análises descritas abaixo. Destaca-se que os mesmos animais foram utilizados para as análises sanguíneas e hepáticas, a fim de reduzir o número total de animais no estudo.

Para a realização dos experimentos foram utilizados 4 grupos de 6 animais, totalizando um N de 24 animais. Os grupos foram divididos em 1) grupo salina; 2) grupo RSV; 3) grupo RSV+INH+RIF; 4) grupo INH+RIF.

### **Exemplo 1 - Indução de hepatotoxicidade**

5 Para a indução de hepatotoxicidade utilizou-se metodologia descrita previamente (Chowdhury A, Santra A, Bhattacharjee K, Ghatak S, Saha DR, Dhali GK. Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice. J Hepatol 2006;45(1):117-26). Os animais receberam uma combinação de 25-50 mg/kg de INH e 50-100 mg/Kg  
10 de RIF, por via oral, uma vez ao dia, durante três dias consecutivos. Os animais controle receberam veículo (DMSO 1 % em solução salina; 10 ml/kg, V.O.), nos mesmos intervalos de tempo. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 h após a administração da última dose dos agentes antituberculose. Imediatamente, foram coletados o sangue e o fígado dos  
15 camundongos para as análises bioquímicas.

### **Exemplo 2 – Tratamento com resveratrol (RSV) e agentes antituberculose**

Diferentes grupos de animais foram tratados com RSV (50-100 mg/kg), por via oral, 30 minutos antes da indução da hepatotoxicidade e mais duas vezes ao dia, de 6 em 6 horas, até o 3º dia após a primeira aplicação de INH + RIF  
20 (sempre no mesmo horário). Animais controle foram tratados com veículo (DMSO 1 % em solução salina; 10 ml/kg, V.O), nos mesmos períodos de tempo; um quarto grupo de animais foi tratado apenas com RSV (100 mg/kg), seguindo os mesmos intervalos de tempo já descritos. As doses e intervalos de administração do RSV foram selecionados com base em estudos prévios da  
25 literatura. Os animais foram submetidos à eutanásia 24 h após a administração da última dose dos agentes antituberculose. Imediatamente, foram coletados o sangue e o fígado dos camundongos para as análises bioquímicas.

### **Exemplo 3 – Determinação de AST (aspartato aminotransferase)**

Foram coletados cerca de 400 a 500 µl de sangue total através da  
30 punção da aorta abdominal. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 10000 rpm e o soro foi separado para posterior determinação da

função hepática, através da dosagem dos níveis séricos de AST em modo cinético, utilizando kits disponíveis comercialmente, de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest, Brasil). A absorvância foi medida em 490 nm e os resultados expressos em U/ml. A figura 1 demonstra a reversão da atividade da AST após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), apontando o efeito hepatoprotetor do resveratrol, um efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ).

#### **Exemplo 4 – Determinação da ALT (alanina aminotranferase)**

Foram coletados cerca de 400 a 500  $\mu$ l de sangue total através da punção da aorta abdominal. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min, a 10000 rpm e o soro foi separado para posterior determinação da função hepática, através da dosagem dos níveis séricos de ALT em modo cinético, utilizando kits disponíveis comercialmente, de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest, Brasil). A absorvância foi medida em 490 nm e os resultados expressos em U/ml. A figura 2 demonstra de forma significativa ( $p < 0,0001$ ), a reversão da atividade da ALT após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), indicado o efeito hepatoprotetor do resveratrol.

#### **Exemplo 5 - Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Uma porção do fígado ( $\pm$  350 mg) foi utilizada para a determinação da atividade da MPO, segundo a literatura (Souza DG, Cassali GD, Poole S, Teixeira MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. Br J Pharmacol 2001;134(5):985-94). O fígado foi removido e homogeneizado a 5 % em tampão EDTA/ NaCl (pH 4.7) e centrifugado a 10.000 rpm por 15 min, a 4°C. Após seguidas etapas de lavagem, o sobrenadante foi utilizado na reação enzimática para detecção da MPO, realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB, 1,6 mM),  $\text{NaPO}_4$  80 mM e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0,3 mM). A absorvância foi medida em 595 nm e os resultados expressos em densidade óptica (DO) por mg de tecido. A MPO é um indicativo indireto da migração de neutrófilos, parâmetro utilizado como indicador de

estresse oxidativo e resposta inflamatória. A figura 3 demonstra a reversão da atividade da mieloperoxidase (MPO) após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF). O efeito inibitório observado para o resveratrol foi estatisticamente significativo ( $p < 0,0001$ ).

#### 5 **Exemplo 6 - Determinação da atividade da catalase**

Uma porção do fígado ( $\pm 100$  mg) foi utilizada para a determinação da atividade da catalase, segundo a literatura (Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-126). Para tal, a degradação do  $H_2O_2$  foi monitorada a 240 nm, a cada 30 s, durante 2 min. O coeficiente de extinção de  $H_2O_2$  utilizado para determinar a atividade da catalase foi igual a  $43.6 M^{-1}.cm^{-1}$ . Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína. A determinação da atividade da catalase, enzima peroxissomal detoxificante responsável pela manutenção dos baixos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) nas células, é um parâmetro utilizado como indicador de estresse oxidativo. A figura 4 demonstra a manutenção dos níveis de atividade da catalase após o tratamento com resveratrol (RSV) + isoniazida (INH) + rifampicina (RIF), um efeito estatisticamente significante ( $P < 0,01$ ).

#### 15 **Exemplo 7 - Avaliação histológica para a determinação de lesão hepática**

Para a avaliação histológica, uma porção do fígado foi fixada em formaldeído (10 %), durante 24 h. Posteriormente, os tecidos foram processados em parafina e secções seriadas de 5  $\mu m$  foram coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes foram analisados quanto à presença de esteatose e células necróticas. As imagens apresentadas na Figura 5 demonstram uma redução marcante da esteatose causada pela associação de INH e RIF, em camundongos tratados com resveratrol.

25 Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outros variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

**Reivindicações****FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR  
HEPATOTOXICIDADE**

- 5 1. Formulação farmacêutica caracterizada por compreender:
- a) resveratrol;
  - b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
  - c) um veículo farmacêuticamente aceitável.
- 10 2. Formulação, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo resveratrol ser escolhido do grupo que compreende trans-resveratrol, trans-3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-estilbeno, trans-3,5,4'-trimetoxi-estilbeno, trans-3,5-hidroxi-4'-metoxi-estilbeno, trans-3,5-diacetil-4'-hidroxi-estilbeno, trans-3,5,4'-triacetil-estilbeno, trans-3,5-hidroxi-4'-acetil-estilbeno e mistura dos mesmos.
- 15 3. Formulação, conforme reivindicação 2, caracterizada pelo resveratrol ser trans-resveratrol.
4. Formulação, conforme reivindicação 1, caracterizada pelo composto útil no tratamento da tuberculose ser escolhido do grupo que compreende etambutol, rifampicina, pirazinamida, isoniazida, streptomina, ciprofloxacina, morfloxacina, corticosteróides, e combinações dos mesmos.
- 20 5. Formulação, conforme reivindicação 2, caracterizada pelo composto ser isoniazida e rifampicina.
6. Formulação, conforme reivindicação 1, caracterizada pela proporção resveratrol:composto útil no tratamento da tuberculose estar compreendida na faixa que vai de 0,4:1 a 2:1.
- 25 7. Formulação farmacêutica compreendendo:
- a) resveratrol;
  - b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
  - c) um veículo farmacêuticamente aceitável;
- 30 caracterizada por ser utilizada no preparo de um medicamento útil no tratamento da tuberculose.

8. Formulação, conforme reivindicação 7, caracterizada pelo resveratrol ser escolhido do grupo que compreende trans-resveratrol, trans-3,5-dimetoxi-4'-hidroxi-estilbeno, trans-3,5,4'-trimetoxi-estilbeno, trans-3,5-hidroxi-4'-metoxi-estilbeno, trans-3,5-diacetil-4'-hidroxi-estilbeno, trans-3,5,4'-triacetil-estilbeno, trans-3,5-hidroxi-4'-acetil-estilbeno e mistura dos mesmos.

9. Formulação, conforme reivindicação 8, caracterizada pelo resveratrol ser trans-resveratrol.

10. Formulação, conforme reivindicação 7, caracterizada pelo composto útil no tratamento da tuberculose ser escolhido do grupo que compreende etambutol, rifampicina, pirazinamida, isoniazida, streptomina, ciprofloxacina, morfloxacina, corticosteróides, e combinações dos mesmos.

11. Formulação, conforme reivindicação 8, caracterizada pelo composto ser isoniazida e rifampicina.

12. Formulação, conforme reivindicação 7, caracterizada pela proporção resveratrol:composto útil no tratamento da tuberculose estar compreendida na faixa que vai de 0,4:1 a 2:1.

13. Processo para reduzir a hepatotoxicidade associada à administração de pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose caracterizado por compreender a etapa de administrar uma formulação farmacêutica compreendendo:

- a) resveratrol;
- b) pelo menos um composto útil no tratamento da tuberculose; e
- c) um veículo farmacêuticamente aceitável;

a um mamífero necessitando de tratamento.

14. Processo, conforme reivindicação 13, caracterizado pela formulação farmacêutica ser conforme descrita nas reivindicações de 1 a 6.

15. Processo, conforme reivindicação 13, caracterizado pelo mamífero ser o homem.

**Figuras**

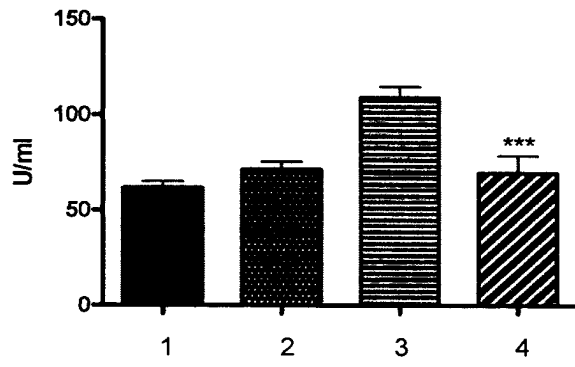


Figura 1

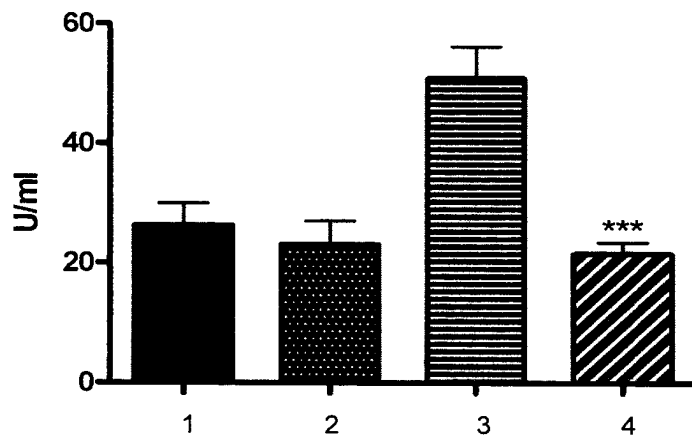


Figura 2

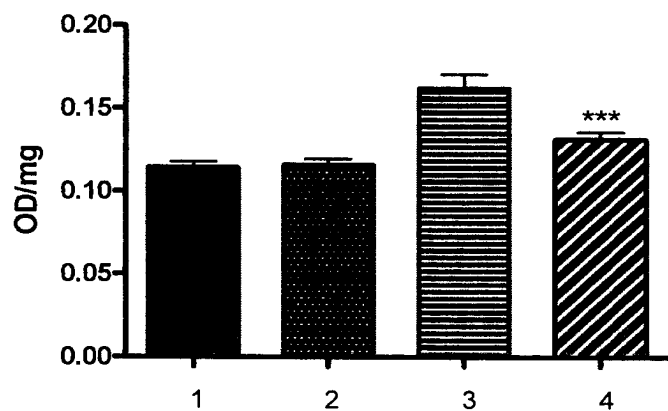


Figura 3

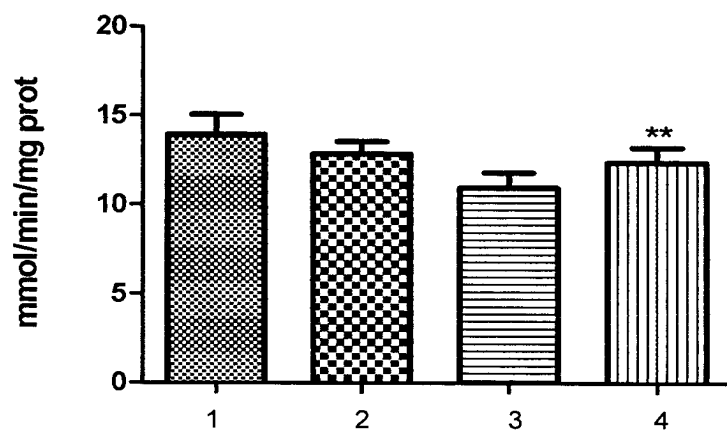


Figura 4

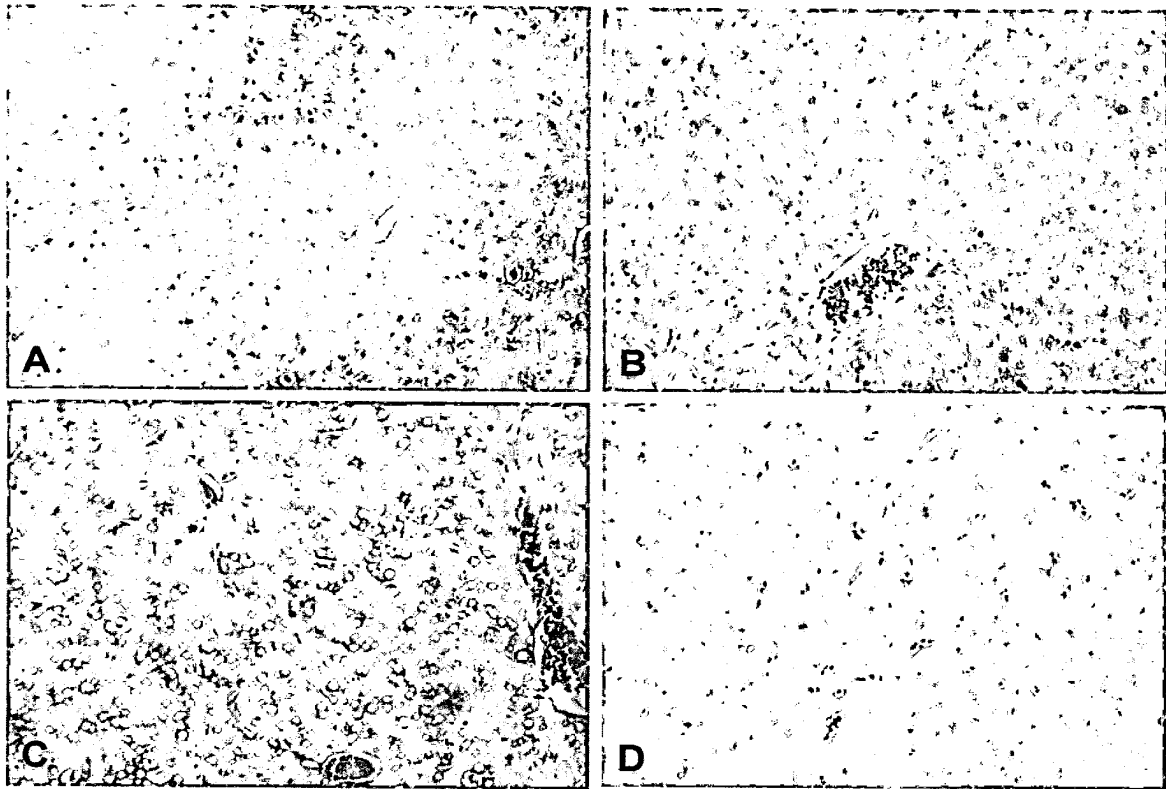


Figura 5

**Resumo****FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA REDUZIR  
HEPATOTOXICIDADE**

A presente invenção descreve uma formulação farmacêutica e um processo para evitar e/ou reduzir a hepatotoxicidade associada ao tratamento da tuberculose diminuindo o tempo de tratamento e evitando cepas resistentes da *Mycobacterium tuberculosis*. A formulação farmacêutica da presente invenção compreende resveratrol, um composto tuberculostático e um veículo farmacêuticamente aceitável. A presente invenção se situa nos campos da química, farmácia e medicina.

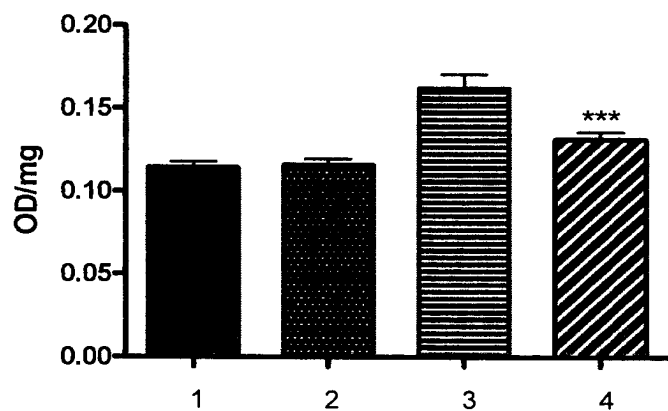


Figura 3

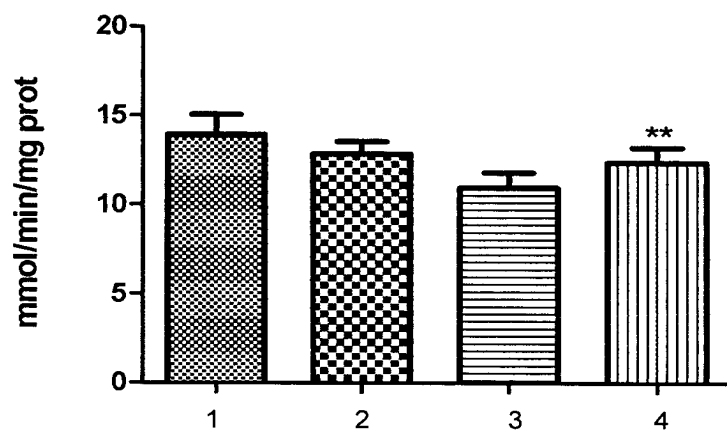


Figura 4