



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

(21) BR 102016003408-6 A2

(22) Data do Depósito: 18/02/2016

(43) Data da Publicação: 03/04/2018



\* B R 1 0 2 0 1 6 0 0 3 4 0 8 A

**(54) Título:** FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF'S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS DRUG DELIVERY

**(51) Int. Cl.:** A61K 31/4168; A61K 47/02; A61K 9/00; A61P 33/02

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE, UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO-UNIVASF

**(72) Inventor(es):** PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; LESLIE RAPHAEL DE MOURA FERRAZ; SALVANA PRISCYLLA MANSO COSTA; LARISSA ARAÚJO ROLIM; CYBELLY MARQUES DE MELO; SEVERINO ALVES JÚNIOR; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA

**(57) Resumo:** FORMULAÇÕES FARMACEUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF'S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS DRUG DELIVERY A presente patente de invenção aborda as formulações farmacêuticas contendo associação de Benznidazol e MOF's, como carreadores de fármacos, na obtenção dos Drug Delivery Systems. Foi utilizada, como exemplo de MOF, a ZIF-8 que possui como metal de transição o zinco. O processo de obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8 foi realizado com base no método de co-precipitação. A presente invenção possibilitou a formação de sistemas BNZ:ZIF-8, que foram, posteriormente, caracterizados através de diferentes técnicas analíticas, confirmando a incorporação do fármaco à rede da ZIF-8, pela observação da redução das características cristalinas do fármaco quando associado à rede organometálica. Foi evidenciada a redução do tamanho dos cristais de BNZ, o que promove um aumento da solubilidade do mesmo, visto que há um aumento da sua área superficial e, conseqüentemente, sua solubilização pelos fluidos biológicos. A presente patente de invenção confirma a eficácia do sistema desenvolvido no tocante da modulação(...)

## **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF'S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS *DRUG DELIVERY***

01. A presente patente de invenção aborda as formulações farmacêuticas contendo associação de Benznidazol e Redes Organometálicas de Coordenação, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOF's), como carreadores de fármacos, na obtenção dos *Drug Delivery Systems*.

02. Devido a sua toxicidade e baixa solubilidade em água, o Benznidazol (BNZ), tem sido utilizado como único agente antichagásico, embora apresente ressalvas na terapia atual da doença de Chagas. Logo, é papel da inovação em tecnologia farmacêutica desenvolver técnicas capazes de incrementar a solubilidade aquosa de fármacos, tendo como consequência um aumento na biodisponibilidade do mesmo. Isso é extremamente importante para a redução da incidência de efeitos adversos e manutenção das concentrações plasmáticas dentro do índice terapêutico seguro, concedendo ao paciente um medicamento de maior qualidade para tratamento da doença e promovendo uma maior qualidade de vida à população acometida (SOUZA-JUNIOR et al., 2009).

03. Foi utilizada, como exemplo de MOF, a *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF). A ZIF é uma classe de MOF semelhantes aos zeólitos, composta por íons metálicos de transição de coordenação tetraédrica, conectados através de ligantes imidazolatos. Mais especificamente, foi utilizada a ZIF-8 que possui como metal de transição o zinco.

04. ZIF-8 tem se mostrado um excelente carreador de fármaco, incorporando uma quantidade substancial de insumo farmacêutico ativo, mostrando ser estável em condições orgânicas importantes, com valores de pH diferentes. Assim, tanto em ambientes neutros (fisiológica) ou ácidos (células infectadas pelo *T. cruzi*), atua como um veículo eficiente de fármacos.

05. A síntese da ZIF-8 foi realizada através de parceria firmada com o Laboratório de Síntese: Laboratório de Terras Raras (BSTR), do Departamento de Química Fundamental, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O processo de obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8 (proporção 1:1) foi realizado no Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da UFPE, com base no método de co-precipitação.

06. O procedimento foi utilizado para a produção de sistemas em diferentes razões molares, tendo como base os pesos moleculares do BNZ e da ZIF-8, como sendo 260,25 e 229,61 g.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Inicialmente o fármaco foi adicionado a erlenmeyers e solubilizado em acetona.

07. A solução de BNZ foi sonicada por 10 minutos, a fim de garantir a completa solubilização do mesmo. Em seguida, a ZIF-8 foi adicionada à solução, seguido de agitação, com auxílio de barra magnética, durante 4 dias. Diariamente, o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação em espectroscopia por absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), com auxílio de uma curva de calibração previamente realizada para a construção de uma curva de incorporação do BNZ à rede da ZIF-8.

08. Após as referidas etapas, procedeu-se a secagem do material através de liofilização ou estufa de secagem com fluxo de ar a 30-35°C até completa secagem, para o sistema obtido.

09. Todo esse procedimento foi realizado em triplicata (afim de verificar o desvio padrão) e protegido da luz, devido à fotossensibilidade inerente à molécula do BNZ.

10. Os erlenmeyers foram vedados com rolhas, afim de reduzir a volatilidade do solvente. O solvente volatilizado foi repostado após verificação de perda de massa, tomando como base o valor de 0,75-0,85 g.mL<sup>-1</sup> para acetona.

11. O sistema foi lavado com acetona, seguido de centrifugação a 1500-2500 rpm por 15-25 minutos afim de retirar a quantidade residual de BNZ. O sobrenadante foi descartado e o mesmo procedimento foi repetido mais duas vezes sendo, na terceira vez, submetido à quantificação da eficiência de incorporação.

12. A presente invenção possibilitou a formação de sistemas BNZ:ZIF-8, que foram, posteriormente, caracterizados através de diferentes técnicas analíticas, confirmando a incorporação do fármaco à rede da ZIF-8, pela observação da redução das características cristalinas do fármaco quando associado à rede organometálica. A caracterização dos produtos obtidos foi realizada através de: microscopia de luz polarizada (MLP), espectroscopia por absorção na região de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise térmica por Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Termogravimetria (TG), Difração de Raios-X (DRX) e testes de liberação *in vitro* por meio de ensaio de dissolução.

13. Através da espectroscopia por absorção na região do UV-Vis, foi possível determinar o comprimento de onda de leitura a ser utilizado para a quantificação da incorporação do BNZ. Com base na varredura (200-1000 nm), o BNZ teve máxima absorção em 324-326 nm, enquanto a ZIF-8, em 242-244 nm. Embora a ZIF-8 também apresente pico de absorção na região do UV-Vis, o método não perdeu em seletividade, pois a mesma não absorve no mesmo comprimento de onda do BNZ em 324-326 nm. A ZIF-8 apresenta um valor de 0,003-0,005 de absorbância, insignificante. Em adição, a ZIF-8 é insolúvel em água e em solventes apolares, sendo excluída do analito no momento que a amostra é filtrada (Alves I. B., 2013).

14. Foi possível construir curvas de calibração diárias, tomando como base o método desenvolvido por Soares-Sobrinho e colaboradores (2007), possibilitando o cálculo da incorporação aparente do BNZ à rede da ZIF-8. O experimento visou o decaimento da concentração do fármaco, justificada pela sua incorporação à malha da ZIF-8. Tal decaimento foi avaliado diariamente e a porcentagem de BNZ incorporada foi mensurada subtraindo o valor da concentração real utilizada no experimento pela concentração dissolvida encontrada, representadas em termo de porcentagem.

15. A partir das curvas de incorporação, foi possível observar que, após quatro dias de agitação, o sistema obtido em acetona também apresentou, aproximadamente, 37-43% de incorporação. Os valores das concentrações inicial e final foram 18,00-22,00 e 12,00-15,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

16. Os termogramas dos sistemas BNZ:ZIF-8 em diferentes proporções, foram obtidos em Calorímetro de Varredura DSC Q200 (TA instruments), interligado ao software TA60 versão 2.20 (TA instruments), com atmosfera de nitrogênio de 40-60  $\text{mL.min}^{-1}$  e razão de aquecimento de 5-15 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ , na faixa de temperatura de 25-300 $^{\circ}\text{C}$  e 25-900 $^{\circ}\text{C}$ , para DSC e TG, respectivamente. Nas análises de DSC, as amostras foram colocadas em porta-amostras de alumínio hermeticamente fechados com 5-10 mg ( $\pm 0.2$ ) de BNZ. As determinações foram realizadas em triplicata. Para as análises de TG, as curvas foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu®, modelo DTG 60-H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 40-60  $\text{mL.min}^{-1}$ , sendo a massa da amostra cerca de 5,5-6,5mg, acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a 1000 $^{\circ}\text{C}$  na razão de aquecimento de 5-15 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ . Antes dos ensaios, a termobalança foi verificada com oxalato de zinco.

17. As difrações de Raios-X das amostras analisadas foram obtidas utilizando o equipamento Shimadzu® modelo XRD-7000, equipado com ânodo de cobre. As amostras foram analisadas em uma velocidade de varredura de  $1,2^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$ , na faixa do ângulo  $2\theta$  de  $5^{\circ}$ -  $45^{\circ}$ .

18. O teste de dissolução in vitro foi realizado com auxílio do equipamento Varian® VK 7010. Para isso, foram pesados o equivalente a 35-37 mg, do fármaco isolado para comparar com o fármacos contido nos sistemas de BNZ:ZIF-8. O ensaio foi realizado à temperatura de  $36,5$ - $37,5^{\circ}\text{C}$ , utilizando aparato pá e 500 mL de tampão fosfato (pH's 4,5 e 7,6) como meio de dissolução, durante 2 e 7 horas, respectivamente.

19. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), a amostra foi preparada sobre dupla fita de carbono contida em suporte (stub) de cobre e metalizada sob vácuo com a deposição de uma fina camada de ouro em equipamento BAL-TEC® modelo SCD 050.

20. Para a microscopia de luz polarizada (MLP), foi utilizado um microscópio petrográfico de marca Olympus®, modelo BX 51, com luz polarizada para a identificação das propriedades ópticas das amostras, com uso do software do próprio microscópio para a obtenção das imagens com escala para registro. Como meio isotrópico difuso de fundo, foi utilizado uma lamínula de vidro com 1 mm de espessura. Já como meio anisotrópico difuso de fundo foi utilizado uma lâmina polida de quartzo hialino, gerado através de um corte subparalelo a seção basal do cristal e apresentando uma espessura de 1,1 cm.

21. Os difratogramas mostraram informações sobre o grau de cristalinidade dos sistemas BNZ:ZIF-8. O sistema BNZ:ZIF-8 na proporção de 1:1 (p/p), obtido com acetona, também apresentou comportamento cristalino, resultando em somatório dos perfis difratométricos das substâncias isoladas. Porém, o sistema apresentou os picos mais característicos do BNZ ( $7,36$ ;  $10,88$ ;  $16,82$  e  $21,88^{\circ}$ ). Entretanto, os picos apresentaram intensidade menos intensos, em comparação com os perfis de DRX isolados. Isso indica que boa parte do BNZ está molecularmente disperso na rede da ZIF-8. Apesar de não se demonstrar amorfo, o DRX corroborou para a formação do sistema, mesmo que este seja apenas caracterizado pela adsorção física do BNZ à superfície da ZIF-8. Outro fato importante deve ser levado em consideração: a redução da intensidade dos picos característicos do fármaco sugerem uma discreta perda da natureza cristalina da amostra.

22. Na análise das curvas TG do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em acetona, foi evidenciado um evento de perda de massa, entre 50,13-87,94°C, com uma perda de 1,5-2,0%. Provavelmente, este evento está relacionado à volatilização da acetona que ainda está no interior das cavidades da ZIF-8, uma vez que o decaimento pode ser observado desde a temperatura ambiente, tendo a acetona baixa pressão de vapor e ponto de ebulição. Este valor, ainda menor que o encontrado para a ZIF-8 isolado, evidencia que há uma menor quantidade de água presente na cavidade da ZIF-8, e que esta, portanto, cede espaço para a ligação com as moléculas do fármaco. Foi observada uma antecipação da degradação térmica do fármaco em relação ao BNZ isolado (223,39-245,34°C). Entretanto, foi observada uma redução ainda mais significativa da perda de massa (25-27%). Tal resultado corrobora o fato de que o sistema pode influenciar positivamente na estabilidade térmica do fármaco em relação ao mesmo isolado.

23. A degradação da porção inorgânica da ZIF-8 ocorreu no intervalo entre 321,02-434,88°C, com uma perda de massa de 16,15%; seguida da decomposição térmica até óxido de zinco (568,51-613,31°C e 31-33% de perda de massa). Apesar de ter sido evidenciado que os valores de degradação da ZIF-8 foram antecipados, ambos mostraram uma redução significativa do teor decomposto. Este perfil térmico pode ser um grande indicativo da real formação de sistemas onde o fármaco está presente nas cavidades da ZIF-8.

24. Na curva DSC do sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido em solvente acetona, foi possível observar um evento endotérmico entre 54,17-62,85°C, referente à volatilização da acetona. Esse comportamento pode caracterizar a formação do sistema. Na fusão do fármaco, foi observada uma antecipação bem mais discreta (184,44-192,91°C) ( $T_{pico}=189,97$  °C). Esta variação, de aproximadamente 2%, é descrita por muitos autores como uma faixa aceitável da compatibilidade entre componentes de uma mesma formulação (COSTA, et al., 2013; FERRAZ, 2014). Entretanto, o valor para a variação de entalpia foi maior em comparação ao fármaco isolado ( $\Delta H=261,25$  mJ), o que pode indicar que o sistema foi formado, uma vez que um novo perfil térmico foi evidenciado. Em relação à degradação do fármaco, o evento exotérmico foi antecipado (216,72-244,86 °C) ( $T_{pico}=234,14$  °C), liberando uma energia de 1,8 J, idêntica ao apresentado pelo fármaco isolado.

25. O MEV dos sistemas obtidos em acetona (BNZ:ZIF-8 1:1 p/p) evidenciaram a redução do tamanho e alteração da morfologia dos cristais de BNZ.

26. A redução do tamanho do cristal corrobora os resultados do DRX no que tange à formação do *Drug Delivery System*. Além disso, isso pode indicar o incremento da solubilidade do BNZ, devido ao aumento da área de superfície e do consequente maior grau de solvatação do cristal do fármaco. Este incremento da solubilidade e da velocidade de dissolução podem ser confirmados através da elucidação da curva de DSC e do teste in vitro de dissolução do fármaco (WANG & SHMEIS, 2006).

27. Através do uso da MLP, os sistemas obtidos em acetona BNZ:ZIF-8 1:1 demonstraram as mesmas características iniciais das amostras analisadas em isolado. O comportamento anisotrópico do BNZ foi pouco observado, o que sugere que a natureza cristalina do fármaco foi reduzida, embora não o leve ao estado amorfo. O fato é corroborado pelas análises de MEV e indica que houve um incremento da solubilidade do fármaco, devido à transformação da sua estrutura cristalina. Isto, além de corroborar com as técnicas elucidadas até então, prova que a obtenção do sistema em acetona possibilita a formação de sistemas mais homogêneo.

28. Através das técnicas de caracterização supracitadas, foi possível corroborar o fato de que o sistema obtido em acetona possibilitou a incorporação mais eficiente do fármaco, explicada pela mudança do perfil térmico, pela compatibilidade entre os componentes utilizados e pela redução da cristalinidade do fármaco.

29. As técnicas de caracterização evidenciaram a formação de sistemas, pois apresentaram o somatório dos perfis individuais do fármaco e da ZIF-8, porém, sendo notória a redução do perfil cristalino do BNZ. Isto promove um aumento da solubilidade do mesmo, visto que o fato aumenta sua área superficial e, conseqüentemente, sua solvatação pelos fluidos biológicos.

30. Os resultados sugerem que o sistema BNZ:ZIF-8 1:1 obtido traz um benefício em relação à solubilidade do BNZ em meios tampão acetato e fosfato pH's 4,5 e 7,6, funcionando como sistema Drug Delivery, uma vez que em meio pH 4,5 (célula infectadas pelo T. cruzi) a liberação de 80% do fármaco é vista em 2 horas e, já em meio pH 7,6 (sangue), essa liberação ocorre em 7 horas de dissolução. Logo, a modulação da liberação do fármaco foi confirmada. Isto evitaria incidência de efeitos adversos, oscilações de concentração plasmática e ainda aumentaria a adesão do tratamento pelo paciente devido menor tomada de doses.

31. A presente patente de invenção confirma a eficácia do sistema desenvolvido no tocante da modulação da liberação do fármaco e a obtenção de incremento de solubilidade do mesmo. A consequência dessa invenção é a formulação de formas farmacêuticas mais seguras e eficazes destinadas ao tratamento alternativo da doença de Chagas.

## REIVINDICAÇÕES

### **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF'S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS *DRUG DELIVERY***

01. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, caracterizado por abordar as formulações farmacêuticas contendo associação de Benznidazol e Redes Organometálicas de Coordenação, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOF's), como carreadores de fármacos, na obtenção dos *Drug Delivery Systems*, em quaisquer proporções.
02. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por abranger um produto farmacêutico, independentemente da técnica e/ou processo tecnológico empregado em sua síntese e/ou obtenção, sendo este produto passível de ser obtido por meio da técnica do solvente, co-precipitação, intercalação, mistura simples, malaxagem, rotaevaporação, liofilização, demais métodos de secagem, dentre outras.
03. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender um produto farmacêutico que apresente maior velocidade de dissolução do benznidazol, em quaisquer meios de dissolução e/ou aumento do percentual de fármaco dissolvido neste em relação ao fármaco isolado.
04. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender uma composição farmacêutica formulada com sistema de liberação imediata e/ou modificada, para administração oral em formulações farmacêuticas de uso humano ou veterinário.

05. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado pela adição do sistema Benznidazol:MOF a um veículo ou mais, em qualquer concentração e combinação, diluente, solvente e/ou excipiente farmacêuticamente aceitável.
06. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pela adição sistema Benznidazol:MOF a um outros adjuvantes farmacêuticos visando a formação de sistemas multicomponentes, em qualquer concentração e combinação.
07. Formulações farmacêuticas contendo associação de benznidazol e MOF's para obtenção tecnológica de *Drug Delivery Systems*, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizado por compreender uma composição farmacêutica obtida tecnologicamente por qualquer técnica de produção de medicamento, e acondicionado em qualquer embalagem farmacêutica, com qualquer indicação terapêutica comprovadamente eficaz descrita na literatura.

**RESUMO****FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E MOF'S PARA OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMAS *DRUG DELIVERY***

A presente patente de invenção aborda as formulações farmacêuticas contendo associação de Benznidazol e MOF's, como carreadores de fármacos, na obtenção dos *Drug Delivery Systems*. Foi utilizada, como exemplo de MOF, a ZIF-8 que possui como metal de transição o zinco. O processo de obtenção dos sistemas BNZ:ZIF-8 foi realizado com base no método de co-precipitação. A presente invenção possibilitou a formação de sistemas BNZ:ZIF-8, que foram, posteriormente, caracterizados através de diferentes técnicas analíticas, confirmando a incorporação do fármaco à rede da ZIF-8, pela observação da redução das características cristalinas do fármaco quando associado à rede organometálica. Foi evidenciada a redução do tamanho dos cristais de BNZ, o que promove um aumento da solubilidade do mesmo, visto que há um aumento da sua área superficial e, conseqüentemente, sua solubilização pelos fluidos biológicos. A presente patente de invenção confirma a eficácia do sistema desenvolvido no tocante da modulação da liberação do fármaco e a obtenção de incremento de solubilidade do mesmo. A consequência dessa invenção é a formulação de formas farmacêuticas mais seguras e eficazes destinadas ao tratamento alternativo da doença de Chagas.