



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

**(21) BR 102019025109-3 A2**



**(22) Data do Depósito: 28/11/2019**

**(43) Data da Publicação Nacional: 08/03/2022**

---

**(54) Título:** SISTEMA DO TIPO DDS, FORMADO POR ESCOPOLETINA E ZIF-8, COM ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO

**(51) Int. Cl.:** A61K 31/295; A61K 31/30; A61K 31/315; A61K 31/353; A61K 31/4164; (...).

**(52) CPC:** A61K 31/295; A61K 31/30; A61K 31/315; A61K 31/353; A61K 31/4164; (...).

**(71) Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO; UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE.

**(72) Inventor(es):** PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; PEDRITA ALVES SAMPAIO; LARISSA ARAÚJO ROLIM; JAMES ALMADA DA SILVA; EMANUELLA CHIARA VALENÇA PEREIRA; PEDRO MODESTO NASCIMENTO MENEZES; PEDRO GUILHERME SOUSA DE SÁ; JOSÉ MARCOS TEIXEIRA DE ALENCAR FILHO; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA.

**(57) Resumo:** SISTEMA DO TIPO DDS, FORMADO POR ESCOPOLETINA E ZIF-8, COM ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO. Esta patente de invenção refere-se a um Sistema Drug Delivery contendo a associação da Escopoletina e ZIF-8 com atividade sobre o sistema respiratório O processo de obtenção do sistema ESC:ZIF-8 foi realizado por um método in situ. A presente patente de invenção traz evidências analíticas que comprovam a formação do sistema ESC:ZIF-8 e que este sistema apresenta atividade expectorante.

## SISTEMA DO TIPO DDS, FORMADO POR ESCOPOLETINA E ZIF-8, COM ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO

01. A presente patente de invenção refere-se a um *Drug Delivery Systems* (DDS), composto por Escopoletina (ESC) e ZIF-8 com atividade sobre o sistema respiratório.

02. A escopoletina (6- metoxi -7-hidroxycumarina), é uma cumarina fenólica que pode ser isolada de muitas espécies de plantas. As pesquisas demonstraram que a ESC possui atividade antioxidante, antitumoral, anti-hipertensiva e anti-hiperglicêmica. Outros estudos ainda relatam seu efeito anti-inflamatório, antidepressivo, antioxidante, inibidor de acetilcolinesterase, inibidor de aldose redutase e inibidor da gama-aminotransferase.

03. Além dessas atividades farmacológicas, outro importante estudo com a ESC evidenciou a influência desta cumarina sobre a liberação de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-8). Fato este que evidencia a possível relação de atividade da ESC sobre diferentes doenças inflamatórias, tais como a asma, osteoartrite e artrite reumatoide. Estudos mais recentes evidenciam outras atividades farmacológicas da ESC, tais como: anti-inflamatória, anti-câncer, anti-diabética; prevenção de acúmulo de gordura hepática; inibidor seletivo da monoamino oxidase e anti-envelhecimento.

04. A ESC apresenta baixa solubilidade em água, dificultando a sua dissolução e absorção.

05. Dentre os exemplos de novas tecnologias para melhorar a solubilidade de insumos farmacêuticos ativos, têm-se as Redes Metalorgânicas, do inglês *Metal Organic Frameworks* (MOF's). Dentre as MOFs, destaca-se a *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF) do tipo ZIF-8.

06. A ZIF-8 possui propriedades físico-químicas favoráveis para que seja utilizada no desenvolvimento de DDS, devido à sua alta

estabilidade química e térmica, mantendo-se íntegra até, pelo menos, 400°C.

07. Esta invenção fundamenta-se na obtenção de um Sistema *Drug Delivery*- ESC:ZIF-8, utilizando-se como molécula farmacologicamente ativa a cumarina escopoletina e, como carreador, a ZIF-8. Desse modo, o sistema foi desenvolvido utilizando-se uma metodologia de incorporação *in situ* e testado quanto à atividade expectorante em camundongos.

08. Utilizou-se como matéria-prima: 2-metilimidazol (2-MIM) ( $82,1 \text{ g.mol}^{-1}$ ), sulfato de zinco heptahidratado ( $\text{Zn (SO}_4\text{)}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ( $287,54 \text{ g.mol}^{-1}$ ) e escopoletina ( $192,17 \text{ g.mol}^{-1}$ ), na proporção molar de 70:1:1, respectivamente. Primeiramente, a ESC foi pré-solubilizada em 2,6 mL de DMSO, enquanto isso o 2-MIM foi solubilizado com uma mistura de 18 mL de H<sub>2</sub>O e 1 mL de DMSO, colocado sob agitação a 200 rpm, e o zinco heptahidratado foi solubilizado com 8,4 mL de H<sub>2</sub>O. À solução sob agitação de 2-MIM, foi adicionado lentamente a ESC e por fim a solução de zinco. Após 24 horas sob agitação constante e temperatura ambiente de 23°C, o sistema foi filtrado e lavado com metanol e água.

09. A presente invenção possibilitou a formação do sistema ESC:ZIF-8 e este foi caracterizado por diferentes técnicas, a fim de comprovar a incorporação da ESC à rede da ZIF-8.

10. Analisou-se a taxa de carregamento do sistema ESC:ZIF-8 desenvolvido e verificou-se que 22,5% percentual massa: massa de ESC adicionado foi incorporada à rede metalorgânica.

11. A caracterização do produto e ESC foi realizada através de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), Difractometria de Raios-X (DR-X), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), teste de liberação *in vitro*

em condições *non sink* e avaliação da atividade expectorante do sistema ESC:ZIF-8.

12. A curva DSC foi obtida em calorímetro exploratório diferencial da Shimadzu® DSC-60 integrado ao software Shimadzu® TA-60WS, com atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup> na razão de aquecimento de 2° C.min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 25-300° C. Cerca de 2 mg de amostra foram colocadas em cadinho de alumínio hermeticamente fechado. Índio (156,4 °C) e Zinco (419,5 °C) foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia do equipamento.

13. Os espectros de infravermelho da ESC, ZIF-8 e sistema ESC:ZIF-8 foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400) com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. Os resultados foram obtidos por meio de varreduras de 4000 a 600 cm<sup>-1</sup>.

14. Para análise de DRX das amostras, utilizou-se o difratômetro da Shimadzu® (XRD 7000). A emissão utilizada foi a de cobre, sob as condições de 40 KV e 40 mA. Os difratogramas obtidos mostraram informações sobre o grau de cristalinidade da ESC e ESC:ZIF-8 obtidos. O cálculo do espaçamento basal para verificar se o fármaco foi inserido à molécula da ZIF-8 foi realizado através da equação de Bragg, onde:  $d$  - espaçamento basal;  $\sin \theta$  - seno do ângulo theta;  $n$  - constante; e  $\lambda$  - comprimento de onda do cobre.

15. Nas análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as amostras foram dispersas em fita carbono fixadas no suporte (*stub*). Em seguida, foram metalizadas com ouro atômico em um metalizador Quorum modelo Q150R ES com uma corrente de 15 mA por 5 minutos com um *tooling fator* de 2,30. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Vega3 SEM da Tescan.

16. O sistema ESC:ZIF-8 foi caracterizado também por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros unidimensionais de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz), foram obtidos com um espectrômetro Bruker Ascend 400. As amostras foram solubilizadas em DMSO (DMSO- $d_6$ ) e acidificadas anteriormente para quebra da rede metalorgânica formada.

17. A quantificação da ESC foi realizada pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Arranjo de Diodo (CLAE-DAD).

18. O teste de liberação foi realizado nos pHs de 1,2; 4,5 e 6,5. Esse teste foi realizado tanto com a ESC quanto com o ESC:ZIF-8. O teste foi avaliado por 7 horas e foram retiradas alíquotas em tempos pré-determinados para quantificação de ESC liberada. A partir dessas análises, evidenciou-se que o sistema apresentou um perfil de liberação diferente da ESC. Desse modo, foi necessária a realização do teste de liberação por mais tempo para o sistema desenvolvido. Neste caso, foi realizado o teste de teste de liberação com o sistema por 7 dias com alíquotas sendo retiradas a cada 24 horas e evidenciou-se que um perfil de liberação modificada do subtipo prolongada no pH de 6,5 em relação aos dados obtidos para a ESC.

19. A atividade expectorante foi avaliada tanto para ESC pura quanto para o sistema, utilizando-se o modelo experimental que avalia expectoração com indicador vermelho de fenol em camundongos.

20. Os animais (camundongos machos, *Mus musculus*) ficaram três dias para adaptação no local de experimentação (Laboratório de Farmacologia) com acesso a água e ração à vontade até 2 horas, no mínimo, do procedimento experimental, com administração de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1.500 mg/kg (controle positivo), NaCl 0,9% (controle negativo) e 1; 10 e 100 mg/kg de escopoletina e 10 mg/kg do ESC:ZIF-8, por via oral em 6 animais por grupo (n = 6).

21. Os animais foram pré-tratados de acordo com os grupos correspondentes e, após 30 minutos, realizou-se a administração de suspensão de vermelho de fenol (500 mg/kg - 12,5 mg/mL) por via intraperitoneal. Passados mais 30 minutos da administração do vermelho de fenol, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para, através de incisão cirúrgica para promover a recuperação do lavado bronco alveolar (LBA) com 2 mL de NaCl 0,9 %, recuperando-se 600 µL de LBA que foi colocado sob rotação a 2500 rpm por 10 minutos.

22. Após esse procedimento, foram adicionados 500 µL de sobrenadante em cubeta de quartzo e 0,05 mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 M) para quantificação do vermelho de fenol. A atividade expectorante foi determinada levando-se em consideração a curva de calibração do vermelho de fenol,  $y = 0.1741x + 0.0168$ .

23. As curvas de DSC do sistema ESC:ZIF-8 não apresentaram eventos térmicos. Isto significa que, na faixa de trabalho escolhida, não houve evento que requeresse ou produzisse energia, portanto o sistema nesta faixa de temperatura pode ser considerado termoestável.

24. A análise do espectro do ESC:ZIF-8 apresentou picos característicos tanto da ESC quanto da ZIF-8 isoladas, demonstrando com isso a obtenção do sistema. Analisando-se o espectro do ESC:ZIF-8, foi observado que em  $3132\text{ cm}^{-1}$ , houve uma banda referente à ligação de C-H (aromáticos), e uma banda em  $2930\text{ cm}^{-1}$  C-H (alifáticos). Esta banda referente ao imidazol foi mais larga que a presente na ZIF-8. Isso deve-se ao fato de que novas ligações desse tipo foram formadas com a incorporação da ESC à rede da ZIF-8. Outros picos foram observados ( $1573$ ,  $1457$ ,  $1303$ ,  $978$ ,  $752$  e  $691\text{ cm}^{-1}$ ) e apresentam estiramentos semelhantes à ZIF-8 pura.

25. O perfil difratométrico da ESC comprovou o padrão de cristalinidade com picos intensos ( $12,48$  e  $13,30^\circ$ ) e outros de média

intensidade (7,64; 19,15 e 26,37°). O perfil difratométrico da ZIF-8 demonstrou um perfil de cristalinidade semelhante ao encontrado na literatura, com pico intenso (7,29°), outros de média intensidade (12,66; 17,97°) e de baixa intensidade (10,34; 16,39 e 26,63°), caracterizando o formato cúbico do cristal. Já o perfil difratométrico do sistema ESC:ZIF-8 apresentou um padrão de cristalinidade diferente com picos mais intensos (7,25; 12,65 e 17,35°) e outros de média intensidade (10,30; 16,37; 14,61 e 26,62°). Os dados do sistema e os DRX isolados demonstraram que a mudança no padrão de cristalinidade evidenciou a incorporação da ESC à rede da ZIF-8.

26. A análise das imagens do MEV do ESC:ZIF-8 mostrou o aspecto rômbico dodecaédrico uniforme (quase esférico). Essa morfologia assemelha-se à observada na ZIF-8, evidenciando a formação do sistema.

27. A análise do espectro de RMN do sistema mostrou deslocamentos químicos característicos tanto da ZIF-8 quanto da ESC.

28. Obteve-se a curva de calibração, na faixa de concentração de 50 a 200 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), e obteve-se a equação da reta:  $y = -0,000045 + 3,64 \cdot 10^{-7}x$ ;  $r^2 = 0,9918$ , com a qual foi possível quantificar ESC nas amostras retiradas dos testes de liberação *in vitro* em diferentes pHs e classificar o tipo de liberação da ESC da rede metalorgânica da ZIF-8.

29. Foi evidenciado um perfil de liberação modificada do subtipo prolongada no pH de 6,5 em relação aos dados obtidos para a escopoletina.

30. Os dados demonstraram que a ESC apresenta atividade expectorante e que há uma diferença significativa entre as doses administradas. Para a avaliação da atividade expectorante do sistema utilizou-se a dose intermediária de 10 mg/ kg e observou-se um incremento significativo de atividade farmacológica quando comparado a ESC pura.

31. Além da técnica de incorporação *in situ*, este sistema também pode ser obtido através da técnica de solubilização, co-precipitação, mistura simples, filtração e/ou secagem.

32. A presente patente de invenção traz evidências analíticas que comprovam a formação do sistema ESC:ZIF-8 e que este sistema apresenta atividade expectorante.

## REINVINDICAÇÕES

- 1) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, **caracterizado por** abordar o sistema contendo escopoletina e redes organometálicas de coordenação, do inglês *Metal Organic Frameworks (MOF's)*, como carreadores de moléculas bioativas, na obtenção de um *Drug Delivery System*.
- 2) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, **caracterizado por** utilizar como carreador a *Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF)* do tipo ZIF-8.
- 3) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** obter um sistema, que pode ser possível de ser produzido através das técnicas de incorporação *in situ*, de solubilização, co-precipitação, mistura simples, filtração e/ou secagem.
- 4) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ser um produto farmacêutico que apresenta um padrão diferente de liberação da escopoletina, em diferentes meios de dissolução.
- 5) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, de acordo com a Reivindicação 4, **caracterizado por** compreender um insumo farmacêutico ativo de liberação modificada do tipo prolongada, que pode ser incorporado em formulações farmacêuticas para uso humano e veterinário.
- 6) Sistema do tipo DDS, formado por escopoletina e ZIF-8, com atividade sobre o sistema respiratório, de acordo com a Reivindicação 4, **caracterizado por** compreender um sistema ESC:ZIF-8 com atividade expectorante em camundongos.

**RESUMO****SISTEMA DO TIPO DDS, FORMADO POR ESCOPOLETINA E ZIF-8, COM ATIVIDADE SOBRE O SISTEMA RESPIRATÓRIO**

Esta patente de invenção refere-se a um sistema *drug delivery* contendo a associação da escopoletina e ZIF-8 com atividade sobre o sistema respiratório. O processo de obtenção do sistema ESC:ZIF-8 foi realizado por um método *in situ*. A presente patente de invenção traz evidências analíticas que comprovam a formação do sistema ESC:ZIF-8 e que este sistema apresenta atividade expectorante.