



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

(21) BR 102021004785-2 A2



(22) Data do Depósito: 13/03/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 20/09/2022

(54) **Título:** USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE SS- LAPACHONA

(51) **Int. Cl.:** A61K 31/352; A61K 31/315; A61K 47/02; A61K 47/16.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; ALINE SILVA FERREIRA; ALINNE ÉLIDA GONÇALVES ALVES TABOSA; NATÁLIA MILLENA DA SILVA; SEVERINO ALVES JUNIOR; MARCELO MONTENEGRO RABELLO; JOSÉ YAGO RODRIGUES SILVA; YURI JOSÉ DE ALBUQUERQUE SILVA; CAMILA GOMES DE MELO; LESLIE RAFAEL DE MOURA FERRAZ; ALESSANDRA CRISTINA SILVA BARROS; EMERSON DE OLIVEIRA SILVA.

(57) **Resumo:** USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA. A presente patente de invenção refere-se ao uso da Metal Organic Framework em escala nanométrica (nMOF) como agente modulador de liberação e promotor de solubilidade em formulações farmacêuticas à base do fitofármaco β -lapachona (β -LAP). Foi utilizada como exemplo de nMOF, a nano Zeolic Imidazolic Framework 8 (nZIF-8), que tem como metal de transição o zinco. O processo de obtenção dos Drug Delivery Systems (DDS) β -LAP:nZIF-8 consistiu na incorporação da β -LAP na rede de coordenação da nZIF-8, a partir de um método ex situ. Esses DDS foram caracterizados por diferentes técnicas e avaliados por docking molecular e ensaios de dissolução, que corroboraram com a incorporação da β -LAP, por redução das características cristalinas do fármaco, quando associado à nMOF. Dessa forma, foi evidenciado incremento de solubilidade e modulação da liberação da β -LAP, quando associada à nZIF-8.

USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA

01. Esta invenção refere-se ao uso da *Metal Organic Framework* em escala nanométrica (nMOF) como agente modulador de liberação e promotor de solubilidade em formulações farmacêuticas, contendo associação com o fitofármaco β -lapachona (β -LAP).

02. As *Metal Organic Frameworks* (MOF) são materiais híbridos, orgânico-inorgânicos, que apresentam propriedades promissoras para serem utilizados como carreadores de fármacos. Dentre as subclasses de MOF, as *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF), já foram utilizadas para diversos fins, tais como: constituintes de membranas, troca e armazenagem de gases, biossensores, agentes de catálise e carreadores de fármacos.

03. A ZIF-8 é composta pelo metal zinco com parte inorgânica e pelo ligante orgânico, imidazol. Está disponível em microescala (ZIF-8) e, mais recentemente, em nanoescala (nZIF-8). A nZIF-8 foi a utilizada nessa invenção por apresentar vantagens indiscutíveis, tais como: seu tamanho com mais ampla superfície externa, porosidade, alta estabilidade térmica, maior permeabilidade, biocompatibilidade, grande aporte de substâncias químicas, redução de citotoxicidade e, em alguns casos, entrega direcionadas de fármacos.

04. A β -LAP, conhecida quimicamente como 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol[1,2-b] pirano-5,6-diano, é uma ortonaftoquina com significado potencial terapêutico de ocorrência natural, isolada do ipê roxo, ou pau d'arco roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor), da família Bignoneaceae. Trata-se de um fitofármaco que vem sendo exaustivamente estudado, devido ao seu excelente potencial antineoplásico *in vitro*, principalmente frente às linhagens de câncer refratárias aos tratamentos convencionais, como o câncer de próstata, mama, ovário, leucemias, melanoma, pâncreas e cólon, além de apresentar atividades antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antileishmania, antiesquistossômico e antitripanossoma.

05. A partir do sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), a β -LAP é classificada como classe II (baixa solubilidade e alta permeabilidade). Dessa forma, apresenta-se como um fármaco fracamente solúvel em água e fluidos aquosos, levando a uma absorção limitada devido à baixa

velocidade de dissolução, que pode prejudicar sua eficácia terapêutica.

06. Foram obtidos *drug delivery systems* (DDS), capazes de promover incremento de solubilidade e modular a liberação do fármaco (β -LAP) visando à obtenção de formas farmacêuticas eficazes e com menores efeitos adversos, quando associado com a nZIF-8.

07. O método de obtenção dos DDS β -LAP:nZIF-8 foi baseado no trabalho de Soltani e Colaboradores (2017), que promove a incorporação/adsorção do fármaco a nZIF-8 já sintetizada; método este denominado *ex situ*.

08. A obtenção dos DDS foi realizada utilizando a proporção molar 3:1, com base nos pesos moleculares da β -LAP e da nZIF-8, que correspondem a 242,27 g/mol e 229,61 g/mol respectivamente, utilizando como solvente metanol e etanol.

09. Inicialmente, 75 mg de fármaco foram solubilizados em solventes adequados: etanol ou metanol, em balões com capacidade para 25 mL, obtendo concentrações iniciais de 3 mg/mL. A solução de β -LAP foi sonicada por 15 minutos em sonicador Limp Sonic[®] para garantir a completa solubilização da mesma. Dessa solução, 10 mL foram transferidos para balões de 10 mL, ainda com mesma concentração inicial de 3 mg/mL. Em seguida, a nZIF-8 foi adicionada ao balão contendo os 10 mL da solução de β -LAP, de acordo com a proporção 3:1 que utilizou 9,5 mg de nZIF-8. A mistura foi submetida à agitação intermitente com auxílio de barra magnética e agitador magnético M752A/6 Fisatom[®] por tempos determinados de 6 h para o DDS obtido em metanol e 24 h para o DDS obtido em etanol. Ao fim do processo, o material foi transferido a placas de Petri e procedeu-se a secagem do material por meio de estufa de circulação Ethiktechnology M420/5D com temperatura de 40°C, até completa evaporação do solvente (com duração em torno de 30 min). Após a raspagem das placas, foram obtidos os DDS que seguiram para lavagem.

10. O processo de lavagem dos DDS foi realizado para retirada do excesso de fármaco livre

que pudesse existir. Em tubo Falcon de 10 mL foi adicionado o pó do DDS e uma quantidade do solvente utilizado na sua síntese etanol ou metanol, que foi agitado e levado para centrifugação a 3000 RPM por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado levado para secagem em estufa de circulação Ethiktechnology M420/5D por 2 h, para obtenção do DDS lavado que daria continuidade aos experimentos.

11. Por fim, esses DDS foram doseados, onde em balões de 100 mL colocaram-se 20 mg de cada DDS lavado, junto a 0,2 mL de HCl 1M, para quebrar a nZIF-8 e liberar o fármaco, e completou-se com o solvente no qual o DDS foi sintetizado, e procedeu-se com a sonicação por 10 min. Uma alíquota correspondente ao ponto médio da curva de calibração (4 µg/mL) de 0,4 mL foi diluída para um balão de 10 mL com etanol:água (60:40 v/v), para posterior quantificação em espectroscopia por absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis). Utilizou-se uma curva de calibração previamente realizada (Equação da reta para o DDS etanol: $y = 0,1212x - 0,0246$; $R^2 = 0,9999$; e Equação da reta para o DDS metanol: $y = 0,1212x + 0,0022$; $R^2 = 0,9999$), obtida a partir da construção de uma curva de incorporação da β -LAP à rede de nZIF-8.

12. Os materiais foram caracterizados por UV-Vis, espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), para avaliar a formação dos DDS. Foram realizados estudo de *docking* molecular e ensaios de dissolução *in vitro* nas condições *sink* em diferentes pHs e *non-sink*, que evidenciaram o perfil de liberação da β -LAP da nZIF-8.

13. Os espectros de infravermelho da β -LAP, nZIF-8 e DDS foram obtidos utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR), com cristal de selênio. As amostras a serem analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR. Os resultados foram obtidos por meio de

varreduras de 4000 a 550 cm^{-1} .

14. A análise de DRX foi realizada em difratômetro SmartLab da Rigaku[®], equipado com ânodo de cobre utilizando *step* de 0,01 grau com tempo de aquisição por *step* de 1 segundo, na faixa do ângulo 2θ de 5° - 50° .

15. As curvas TG foram realizadas por meio de termobalança Shimadzu[®], modelo DTG 60-H, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 100 mL/min, sendo a massa da amostra cerca de 5 mg ($\pm 0,05$) para todas as amostras, as amostras foram acondicionadas em porta amostra de platina na faixa de temperatura de 20 a 800°C , na razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$. Antes dos ensaios, a termobalança foi calibrada com oxalato de zinco.

16. A curvas de DSC foram obtidas utilizando Calorímetro Shimadzu[®] DSC-60 interligado ao software Shimadzu[®] TA-60WS com atmosfera de nitrogênio de 100 mL/min e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, na faixa de temperatura de 25 - 400°C . As amostras foram colocadas em porta-amostra de alumina hermeticamente fechada, com massa de 2 mg ($\pm 0,2$) para todas as amostras. As determinações foram realizadas em triplicata. Índio e zinco foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia.

17. Para o MEV as amostras foram preparadas sobre dupla fita de carbono contida em suporte (*stub*) de cobre e metalizada, sob vácuo, com a deposição de uma fina camada de ouro. As análises de MEV foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura da TESCAN[®], modelo Mira 3, com filamento de tungstênio e com acoplamento para dispersão de energia (EDS).

18. As coordenadas atômicas da estrutura cristalográfica da nZIF-8 foram obtidas a partir do Banco de Dados Estrutural de Cambridge (CSD) (GROOM et al., 2016), com número de identificação 602542 (PARK et al., 2006). As cargas parciais foram atribuídas aos átomos da nZIF-8 através de cálculos de teoria funcional de densidade, obtidas por Rana e colaboradores (2011). As coordenadas do modelo da β -LAP, assim como as cargas parciais, foram obtidas a partir da aplicação do método semiempírico de química quântica PM6 (STEWART, 2007), que

faz parte do *software* MOPAC (STEWART, 2016). Para a realização do estudo de *docking* molecular, foi utilizado o programa AutoDock4 (MORRIS et al., 1998), com o objetivo de avaliar a afinidade entre a β -LAP e a superfície da nZIF-8. O modelo molecular utilizado para representar a superfície da ZIF-8 foi tratado como rígido, uma vez que estas estruturas cristalinas apresentam flexibilidade limitada (ROUSELL; YAGHI, 2005). Por outro lado, o modelo da β -LAP foi tratado como flexível. O algoritmo genético lamarckiano foi utilizado para realizar a busca conformacional. Cada conformação amostrada foi avaliada e ranqueada de acordo com uma função de energia empírica (HUEY et al., 2007). Os *grid maps* foram definidos como uma caixa reticulada com $126 \times 126 \times 126$ pontos de dimensão e espaçamento de 0,14 Å. Foram criados dois diferentes mapas com as caixas centradas em dois pontos distintos, (25,5; 42,478; 40,725) e (33,982; 33,982; 43,519), a fim de amostrar toda a estrutura da nZIF-8 e aumentar a precisão das estimativas das energias de interação. Os parâmetros utilizados durante a busca conformacional foram: população inicial com 150 indivíduos aleatórios (conformações), um número máximo de $2,5 \times 10^6$ avaliações de energia, um número máximo de 27.000 gerações e taxas de mutação e crossover de 0,02 e 0,8, respectivamente. O número de indivíduos superiores a sobreviver até a próxima geração ajustado no valor 1 (GA_ELITISM = 1). Um máximo de 300 interações por busca local foram permitidas, sendo 0,06 a probabilidade de realizar a busca local.

19. Os ensaios de dissolução foram realizados a fim de analisar a eficiência dos DDS em relação à liberação da β -LAP nos meios de dissolução com diferentes pHs (1,2; 4,5 e 6,8). Os ensaios foram feitos sob temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, utilizando 250 mL de tampão ácido clorídrico (pH 1,2), tampão acetato (pH 4,5) e tampão fosfato (pH 6,8) e água como meios de dissolução, aparato 2 (pá) e velocidade de rotação 75 rpm, utilizando dissolutor Varian[®] (Modelo VK 7010). Foram pesadas em balança Shimadzu[®] (Modelo ATY224) quantidades de amostras determinadas para manter a condição *sink* do ensaio, de 8x de acordo com o estudo de solubilidade. Em intervalos de tempo predefinidos de 5, 15, 30, 45 min 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4;

4,5; 5 e 6 h, 3 mL das amostras foram coletadas, filtradas em filtro de membrana 0,20 μm e, quando preciso diluídas, para quantificação do teor de β -LAP por espectroscopia no UV-Vis (Shimadzu® UVMMini 1240 PC) a 257 nm. Foi efetuada a reposição do meio de dissolução com o mesmo volume de cada alíquota retirada. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata. Os perfis de dissolução foram avaliados e comparados utilizando o parâmetro de área sob a curva (AUC), percentagem de fármaco dissolvido por tempo de coleta e eficiência de dissolução. A eficiência da dissolução (ED%) foi calculada nos tempos correspondentes a pontos iniciais, medianos e finais do ensaio de dissolução. A ED% é a área sobre a curva no tempo t da curva de dissolução expressa como porcentagem da área do retângulo em y 100% no mesmo tempo t (KHAN; RHODES, 1972; KHAN, 1975). O cálculo de área sob a curva (AUC) e ED% foi realizado com auxílio do *software* Origin® 8 da Origin Lab Solutions e Microsoft Excel® 2007.

20. Para avaliação da capacidade da nZIF-8 de manter a β -LAP solúvel em condições de supersaturação, fez-se uso da técnica de dissolução *non-sink*. Foi adotado um valor de *sink index* de 0,2 e fez-se uso da fórmula proposta por Sun e colaboradores (2012), utilizando os valores experimentais obtidos para no ensaio de solubilidade de equilíbrio da β -LAP em tampão fosfato pH 6,8. Esse cálculo refletiu em uma dose de 1,8 mg e volume de meio de 20 mL. A concentração teórica máxima de β -LAP pode ser calculada como sendo de 90 $\mu\text{g/mL}$. Essa condição numérica de SI significa que se trabalhou com volume de meio em torno de cinco vezes menos do que seria necessário para solubilizar toda a β -LAP inserida no meio. Os ensaios foram feitos sob temperatura de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, velocidade de rotação 100 rpm, utilizando dissolutor Erweka® (Modelo DT-60) com pás adaptadas para uma cuba de dissolução reduzida. Em intervalos pré-definidos de 5, 10, 15, 20, 25, 45 min 1; 2; 3; 4; 5; e 6 h foram coletadas alíquotas de 300 μL que em seguida foram centrifugadas (Eppendorf® Modelo 5417R) a 14000 RCF por 5 min, 200 μL sobrenadante (70% do sobrenadante) foram cuidadosamente coletados e diluídos com o respectivo tampão, para quantificação do teor de β -LAP por espectroscopia no UV-Vis

(Shimadzu® UVMini 1240 PC) a 257 nm. Não foi realizada reposição do meio de dissolução com o mesmo volume de cada alíquota retirada (nota: a soma do volume de todas as alíquotas coletadas totalizou em torno de 20% do meio de dissolução). Todos os ensaios foram efetuados em triplicata.

21. Os DDS obtidos β -LAP:nZIF-8 3:1 apresentaram percentuais de incorporação de 22,55% para o obtido em etanol e 15,88% para o obtido em metanol.

22. Por meio da técnica de DRX observou-se que os DDS tiveram significativa redução de cristalinidade, devido a intensa redução do pico principal e ausência dos demais picos relacionados ao fármaco, principalmente no DDS obtido em metanol.

23. Na análise de MEV dos DDS, foram notadas alterações significativas, os cristais do fármaco não são mais visualizados levando a acreditar que ele foi disperso nos poros da nZIF-8 ficando com aspecto semelhante ela, porém as partículas ficaram um pouco mais coesas e exibindo tamanhos em torno de 100 nm.

24. Ainda foi possível pelas análises de TG e DSC avaliar a influência que a nZIF-8 exerce sobre a β -LAP, caracterizadas pelo seu comportamento térmico, embora tenha sido notada uma leve antecipação dos picos de degradação, os DDS apresentaram picos de fusão bastante reduzidos diferente da β -LAP sozinha onde os picos de fusão estiveram presentes de maneira intensa. Sendo praticamente não visualizado e levemente antecipado no DDS obtido em metanol.

25. Os ensaios de dissolução *in vitro* sob condição *sink* demonstraram que em pH 6,8 foi obtido o maior perfil de liberação da β -LAP pelos DDS, com teores dissolvidos em 6 h de 49,3% pelo DDS obtido em etanol e de 63,4% pelo DDS obtido em metanol, com destaque para esse último, enquanto que o fármaco fica em torno de 21,26% no mesmo tempo. E nos demais pHs os percentuais de liberação obtidos foram um pouco menores, porém ainda assim superiores aos exibidos pelo fármaco isolado. Os DDS apresentaram valores mais elevados de AUC e ED% que o fármaco isolado, constatando a eficácia dos DDS desenvolvidos no tocante a modulação da

liberação da β -LAP e a obtenção do incremento de solubilidade dos mesmos, com melhora de sua taxa de dissolução.

26. E sob condição *non-sink* em pH 6,8, o perfil de dissolução dos DDS revelou a capacidade que o carreador apresenta de manter o fármaco em solução supersaturada, retardando seus eventos de nucleação e recristalização, permitindo sugerir maior biodisponibilidade.

27. Dessa forma, obtiveram-se DDS nanoparticulados adequados, capazes de superar as limitações de solubilidade da β -LAP, demonstrando a ação da nZIF-8 como agente para incremento de solubilidade de fármacos associado a melhores taxas de dissolução e modulação de liberação de fármacos pouco solúveis.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA, caracterizado carrear o fitofármaco β -lapachona (β -LAP), através de *Metal Organic Frameworks* (MOF), a exemplo da ZIF-8 em escala nanométrica (nZIF-8) para obtenção tecnológica de *drug delivery systems* (DDS).

2. USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por formar qualquer tipo de DDS, contendo associação de β -LAP e MOF, em escala micro e/ou manométrica, através de qualquer método de obtenção e do uso de quaisquer solventes e reagentes.

3. USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizada por incrementar a solubilidade da β -LAP em formulações farmacêuticas.

4. USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizada por modular a liberação *in vitro* da β -LAP em formulações farmacêuticas.

RESUMO**USO DA MOF COMO AGENTE MODULADOR DE LIBERAÇÃO E PROMOTOR DE SOLUBILIDADE EM FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À BASE DE β -LAPACHONA**

A presente patente de invenção refere-se ao uso da *Metal Organic Framework* em escala nanométrica (nMOF) como agente modulador de liberação e promotor de solubilidade em formulações farmacêuticas à base do fitofármaco β -lapachona (β -LAP). Foi utilizada como exemplo de nMOF, a nano *Zeolic Imidazolic Framework 8* (nZIF-8), que tem como metal de transição o zinco. O processo de obtenção dos *Drug Delivery Systems* (DDS) β -LAP:nZIF-8 consistiu na incorporação da β -LAP na rede de coordenação da nZIF-8, a partir de um método *ex situ*. Esses DDS foram caracterizados por diferentes técnicas e avaliados por *docking* molecular e ensaios de dissolução, que corroboraram com a incorporação da β -LAP, por redução das características cristalinas do fármaco, quando associado à nMOF. Dessa forma, foi evidenciado incremento de solubilidade e modulação da liberação da β -LAP, quando associada à nZIF-8.