



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

(21) BR 102020018651-5 A2



(22) Data do Depósito: 12/09/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 22/03/2022

---

(54) **Título:** FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

(51) **Int. Cl.:** A61K 47/24; A61K 31/7048; A61P 35/00.

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

(72) **Inventor(es):** PEDRO JOSÉ ROLIM NETO; EMANUELLA CHIARA VALENÇA PEREIRA; LARISSA ARAÚJO ROLIM; PEDRITA ALVES SAMPAIO; PEDRO GUILHERME SOUSA DE SÁ; JOSÉ MARCOS TEIXEIRA DE ALENCAR FILHO; ROSALI MARIA FERREIRA DA SILVA; MARCELO MONTENEGRO RABELLO; PAULO CÉSAR DANTAS DA SILVA.

(57) **Resumo:** FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS. A presente patente de invenção refere-se ao uso da Metal Organic Frameworks (MOF) como carreador na obtenção de sistema de liberação modificada à base de hesperetina, com a finalidade de aumentar a taxa de dissolução. Foi utilizada como exemplo de MOF, a Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIF)-8, que possui como metal de transição o zinco e como ligante o 2-metilimidazol. O processo de obtenção dos sistemas HSPT: ZIF-8 consistiu na incorporação da hesperetina à ZIF-8 em meio aquoso (10% metanol) por meio do processo de adsorção. O sistema obtido foi caracterizado através de diferentes técnicas analíticas, o que confirmou a incorporação pela observação da redução das características cristalinas do hesperetina quando associado ao carreador. O incremento de solubilidade foi evidenciado através dos testes de liberação realizados em pH ácido e neutro, comparando o perfil de dissolução da hesperetina pura com o perfil de dissolução da hesperetina a partir do sistema HSPT:ZIF-8.

## **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

1. A presente patente de invenção aborda formulações farmacêuticas que contenham a associação entre a hesperetina e as *Metal organic frameworks* (MOF's), na obtenção de sistemas de liberação modificada de fármacos.
2. A hesperetina é uma flavonona não glicosilada que apresenta atividades biológicas já bem descritas na literatura como atividade antioxidante (HIRATA et al. 2005; LEE E KIM, 2010), atividade neuroprotetora (HWANG; YEN, 2008), antibacteriana (DUDA-CHODAK, 2012) e com destaque, a atividade anticâncer e quimiopreventiva (ARANGANATHA; NALINI, 2009; HUANG; LIU; CHIOU, 2012; NALINI; ARANGANATHAN; KABALIMURTHY, 2012; SHIRZAD et al., 2017). Apesar de apresentar atividades biológicas relevantes à hesperetina, esta não é utilizada como fármaco tendo como um dos motivos sua baixa biodisponibilidade.
3. A dissolução é o passo limitante para a absorção de fármacos com baixa solubilidade em água, pois produz um baixo gradiente de concentração entre o intestino e a corrente sanguínea, limitando o transporte através das membranas biológicas e a absorção (TAMBOSI et al., 2018).
4. A literatura demonstra que hesperetina não apresenta a sua permeação através pelas membranas como um problema na sua biodisponibilidade. A permeabilidade celular da hesperetina foi medida usando monocamadas de caco-2, sendo demonstrada sua eficiente absorção a partir do intestino (KOBAYASHI et al., 2008). E recentemente, um estudo realizado por Wang e colaboradores (2017) confirmou essa boa permeação pelas membranas intestinais.
5. Assim, o desenvolvimento do sistema de liberação modificado de hesperetina à base da MOF ZIF-8 (*Zeolitic imidazolate framework*) permitiu o aumento da taxa de dissolução da hesperetina em meio aquoso, resolvendo o principal problema relacionado a sua biodisponibilidade insatisfatória.
6. A síntese da ZIF-8 foi realizada utilizando uma proporção de 1:4 (M:M) de Zinco e 2-metilimidazol. O processo de obtenção do sistema de liberação modificada da

hesperetina a partir da ZIF-8 (HSPT:ZIF-8) foi através do processo de adsorção. Para os cálculos, foram utilizados os valores de massa molecular de 302,27 g/mol para a hesperetina e 227,58 g/mol para a ZIF-8.

7. Os sistemas HSPT:ZIF-8 foram desenvolvidos realizando um planejamento fatorial  $2^2$  que avaliou a porcentagem de metanol em água no meio de incorporação (10% ou 50%) e a proporção molar de ZIF-8 em relação à hesperetina (1:3 ou 1:6). Inicialmente, a ZIF-8 foi dispersa em água a uma rotação de 290 rpm, sendo a hesperetina, por sua vez, solubilizada no metanol e em seguida adicionada a dispersão da ZIF-8 em água. Os sistemas permaneceram sob agitação constante (290 rpm) durante os 7 dias. Ao final do processo, todo o meio de incorporação foi filtrado a vácuo e o precipitado lavado com metanol. Em seguida, foi colocado para secar em estufa de circulação de ar por 6 horas a 40°C.

8. A variável dependente utilizada no planejamento fatorial para escolher qual o melhor sistema foi o percentual de incorporação da hesperetina. Todo o processo foi realizado em triplicata, a fim de verificar a reprodutibilidade dos experimentos com base no desvio-padrão.

9. A presente invenção possibilitou o desenvolvimento de um sistema otimizado HSPT: ZIF-8, que teve a sua formação confirmada por diferentes técnicas analíticas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratometria de raios-X (DRX), análise por termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

10. Para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras, estas foram dispersas em fita dupla face de carbono fixada no suporte (*stub*). Em seguida, foram metalizadas com ouro atômico em um metalizador, 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, chegando a um aumento de 5000x.

11. O difratômetro foi utilizado para verificar o perfil cristalino das amostras do sistema HSPT:ZIF-8. As amostras foram submetidas à difratometria de raios-X em um difratômetro, equipado com ânodo de cobre. Para análise por Difratometria de Raios-X (DRX), foi utilizado um difratômetro com emissão de cobre, sob as condições de 40 KV

e 40 mA. O intervalo de análise foi estabelecido, sendo de  $2\theta$  entre 5 e  $50^\circ$ , com  $D2\theta$  de  $0,01^\circ$ , fenda Soller de  $2,5^\circ$  de divergência, fenda de espalhamento de  $0,5^\circ$  e fenda de recepção de 0,6 mm.

12. As amostras do sistema HSPT:ZIF-8 foram submetidas às análises térmicas, utilizando a termogravimetria (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). As curvas DSC foram obtidas em calorímetro exploratório diferencial, com atmosfera de nitrogênio de 50 mL/min, a uma razão de aquecimento de  $2^\circ\text{C}/\text{min}$ , na faixa de temperatura de  $25\text{--}300^\circ\text{C}$ . Cerca de 2 mg de amostra foram colocadas em um cadinho de alumínio hermeticamente fechado. Índio ( $156,4^\circ\text{C}$ ) e Zinco ( $419,5^\circ\text{C}$ ) foram utilizados para calibrar a escala de temperatura e a resposta de entalpia do equipamento. A pureza da hesperetina foi calculada pelo software utilizando a equação de Van't Hoff. A análise por TG foi realizada utilizando uma termobalança, em atmosfera de nitrogênio em fluxo de 100 mL/min, sendo a massa das amostras cerca de 5 mg acondicionadas em cadinho de platina na faixa de temperatura de 25 a  $900^\circ\text{C}$ , a uma razão de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

13. As análises de FTIR das amostras foram realizadas utilizando o dispositivo de reflectância total atenuada (ATR). As amostras analisadas foram transferidas diretamente para o compartimento do dispositivo de ATR com seleneto de zinco. A varredura foi realizada na faixa de  $4000$  a  $600\text{ cm}^{-1}$  com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  e 150 *scans*.

14. A microscopia demonstrou que houve um processo de amorfização da estrutura da hesperetina quando esta foi incorporada à ZIF-8 e evidenciou que houve uma diminuição do tamanho das partículas. Ambas as mudanças observadas são indicativas de uma melhora no incremento de solubilidade da hesperetina.

15. A difratometria confirmou a formação do sistema HSPT: ZIF-8 uma vez que, no difratograma dessa amostra, pode-se observar a presença dos sinais da hesperetina e da ZIF-8. Percebeu-se uma diminuição na intensidade dos sinais dos ângulos refratados da hesperetina indicando que houve uma mudança no perfil cristalino desta molécula quando esta foi incorporada à ZIF-8.

16. Na análise por DSC, não foi possível observar nenhum evento até a temperatura de 400°C para o sistema HSPT: ZIF-8, não apresentando o ponto de fusão da hesperetina que, teoricamente, ocorreria em 227°C. O desaparecimento desse evento é um indício de que a hesperetina foi inserida nas cavidades da ZIF-8, corroborando com os dados de que houve a formação do sistema e indica que essa incorporação aumentou a estabilidade térmica da hesperetina.

17. A termogravimetria corroborou com os dados de aumento de estabilidade térmica que foram demonstrados na análise de DSC, revelando que o primeiro evento térmico do sistema HSPT:ZIF-8 ocorre apenas após os 325°C, sendo um evento discreto que leva a uma perda de massa menor do que 2%. O evento térmico de maior relevância ocorre apenas após a amostra ser aquecida a uma temperatura superior a 550°C e levando a uma perda de massa de 24%. Tais dados são condizentes com estudos encontrados na literatura que relatam que a ZIF-8 é um carreador de fármacos que pode conferir estabilidade térmica à molécula hospede (KAUR et al., 2017; LUZURIAGA et al., 2019).

18. Na análise por FTIR do sistema HSPT:ZIF-8, houve o aparecimento de uma banda larga em torno da região de 3300  $\text{cm}^{-1}$  que se refere ao estiramento O-H com ligação intermolecular de hidrogênio. O aparecimento desta banda sugere que há uma interação entre a molécula da hesperetina e a ZIF-8, confirmando que houve o processo de incorporação.

19. Essas técnicas de caracterização indicaram a interação entre a molécula-hóspede e o carreador, além de demonstrarem que houve uma diminuição das características cristalinas da hesperetina, sugerindo um incremento de solubilidade.

20. Para confirmar que houve uma melhora na taxa de dissolução da hesperetina foi realizado o teste de liberação comparando a hesperetina isolada e o sistema HSPT:ZIF-8. O teste foi realizado nos pHs: 4,5 e 6,5, sob temperatura de 37 °C e com agitação de 232 rpm.

21. No pH 4,5, houve um aumento na taxa de dissolução da hesperetina do sistema que foi de 56,61%, quando comparada à hesperetina pura que apresentou taxa de dissolução de 4,78 % em um tempo total 8 horas.

22. No pH 6,8, a taxa de dissolução da hesperetina isolada foi de 4,2 % enquanto que a hesperetina liberada do sistema apresentou uma taxa de dissolução de 74,6 % em um tempo total de 24 h.
23. Assim, confirma-se o desenvolvimento de um sistema farmacêutico carreador da hesperetina a partir da sua incorporação a ZIF-8, com a capacidade de modular a sua liberação, levando ao incremento da sua solubilidade em meio aquoso.
24. Esta patente abrange um produto farmacêutico que, independente da técnica ou processo tecnológico empregado na sua síntese e/ou obtenção, é possível de ser obtido por meio da técnica do solvente, co-precipitação, intercalação, mistura simples, malaxagem, rotaevaporação, liofilização e demais métodos de secagem.
25. Compreende um produto farmacêutico com aumento da velocidade de dissolução da hesperetina, em quaisquer meios de dissolução e/ou aumento do percentual do fármaco dissolvido nestes em relação ao fármaco isolado.
26. Trata-se de uma composição farmacêutica formulada com sistema de liberação imediata e/ou modificada para uso humano ou veterinário.
27. Posteriormente, poderão ser desenvolvidas formas farmacêuticas orais contendo o sistema HSPT:ZIF-8 como insumo farmacêutico ativo, para as atividades antioxidante, neuroprotetora e anticâncer.

## REIVINDICAÇÕES

1. **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**, caracterizado por abordar formulações contendo a associação da hesperetina e MOF's, para a obtenção de um sistema de liberação da hesperetina.
2. **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por abranger um produto farmacêutico que, independente da técnica ou processo tecnológico empregado na sua síntese e/ou obtenção, é possível de ser obtido por meio da técnica do solvente, coprecipitação, intercalação, mistura simples, malaxagem, rotaevaporação, liofilização e demais métodos de secagem.
3. **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**, de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado por compreender um produto farmacêutico com aumento da velocidade de dissolução da hesperetina, em quaisquer meios de dissolução e/ou aumento do percentual do fármaco dissolvido nestes em relação ao fármaco isolado.
4. **FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**, de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado por compreender uma composição farmacêutica formulada com sistema de liberação imediata e/ou modificada para uso humano ou veterinário.

**RESUMO****FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO ASSOCIAÇÃO DE HESPERETINA E MOFS PARA A OBTENÇÃO TECNOLÓGICA DE SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS**

A presente patente de invenção refere-se ao uso da *Metal Organic Frameworks* (MOF) como carreador na obtenção de sistema de liberação modificada à base de hesperetina, com a finalidade de aumentar a taxa de dissolução. Foi utilizada como exemplo de MOF, a *Zeolitic Imidazolate Frameworks* (ZIF)-8, que possui como metal de transição o zinco e como ligante o 2-metilimidazol. O processo de obtenção dos sistemas HSPT:ZIF-8 consistiu na incorporação da hesperetina à ZIF-8 em meio aquoso (10% metanol) por meio do processo de adsorção. O sistema obtido foi caracterizado através de diferentes técnicas analíticas, o que confirmou a incorporação pela observação da redução das características cristalinas do hesperetina quando associado ao carreador. O incremento de solubilidade foi evidenciado através dos testes de liberação realizados em pH ácido e neutro, comparando o perfil de dissolução da hesperetina pura com o perfil de dissolução da hesperetina a partir do sistema HSPT:ZIF:8.